Université Fédérale
Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par

Laure GIRAUD

Le 12 avril 2023

Surfaces antimicrobiennes à base de Nanomatériaux Carbonés

Ecole doctorale : **SDM - SCIENCES DE LA MATIERE - Toulouse**

Spécialité : **Sciences et Génie des Matériaux**

Unité de recherche :
CIRIMAT - Centre Interuniversitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux

Thèse dirigée par
Emmanuel FLAHAUT et Audrey TOURRETTE

Jury

Mme Céline FALENTIN-DAUDRé, Rapporteure
M. Mathieu PINAULT, Rapporteur
Mme Silvana FIORITO, Examinatrice
M. Emmanuel FLAHAUT, Directeur de thèse
Mme Audrey TOURRETTE DIALLO, Co-directrice de thèse
M. Eric PINELLI, Président

Remerciements

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein du laboratoire CIRIMAT (Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux) de Toulouse, en collaboration avec les laboratoires LAAS (Laboratoire d'analyse et d'architecture des systèmes) et IPBS (Institut de pharmacologie et de biologie structurale) dans le cas d'un contrat financé par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier.

Je tiens à adresser, dans un premier temps, mes respectueux remerciements à l'ensemble des membres du jury. Je remercie M. Eric Pinelli pour avoir accepté de présider ce jury, ainsi que pour l'intérêt qu'il a porté à mes travaux de thèse. Je remercie également Mme Céline Falentin-Daudré et M. Mathieu Pinault pour le soin pris à l'analyse de mon mémoire, vous m'avez apporté des pistes et des questionnements qui m'ont permis de prendre du recul par rapport à mon travail et je vous en remercie. Enfin, je tiens à remercier Mme Silvana Fiorito pour son intérêt porté à mes travaux ainsi que pour ses remarques enrichissantes lors de la soutenance.

Ces travaux de thèse ont été dirigés conjointement par Emmanuel Flahaut et Audrey Tourrette. Merci beaucoup de m'avoir permis de travailler sur ce projet multidisciplinaire que j'ai beaucoup aimé. Ces 3 années ont été très enrichissantes, merci pour les discussions que nous avons pu avoir qui m'ont beaucoup apportées.

J'ai eu la chance de pouvoir collaborer avec de nombreuses personnes lors de ces travaux de thèse et mes pensées vont à Olivier Marsan qui m'a énormément apporté en peu de temps, merci beaucoup pour ton aide. Je remercie aussi Etienne Dague qui m'a donné la chance d'expérimenter au LAAS, j'ai adoré travailler avec l'AFM, merci beaucoup pour ta clarté et ta disponibilité. Je tiens également à remercier Céline Cougoule et Etienne Meunier ainsi que toute l'équipe de l'IPBS qui m'a accueillie et qui m'a donné la chance de découvrir la biologie. Je remercie aussi l'équipe accueillante du CMEAB avec qui c'était toujours un plaisir de faire de la microscopie.

Je tiens à remercier les nombreuses personnes du CIRIMAT avec qui j'ai interagi durant cette thèse et qui m'ont permis de passer trois belles années. Merci pour votre bonne humeur et pour votre participation, de prêt ou de loin, à ce projet. Merci aux anciens et nouveaux doctorants du CIRIMAT qui m'ont intégré à ce laboratoire et qui en font un lieu où il fait bon vivre. Merci aux doctorants PPB pour tous ces moments passés ensemble, je vous attends bientôt pour un Karaoké !

Je remercie mes colocs qui m'ont permis de passer 4 belles années à Toulouse, il y a eu du changement mais vous avez toujours été au top ! (Guillemette, Lorenzo, Clara et Xavier, Rebecca et Jonathan, Richard, Béatrice, Dewi, Maike, Paulino). Je pense aussi à la maison du bonheur qui porte bien son nom, merci à Ella, Paul I, Claire, Paul II, Cannelle, Julie et Mélina. Merci infiniment à Shaï et ses soirées houmous qui m'ont énormément aidées. Merci Mathilde pour ton soutien depuis la maternelle ! Merci à la famille TCK pour votre soutien et tous les bons moments passés ensemble, j'ai hâte de vous revoir pour un Taki Taki !!! Merci aux Kiwi, j'espère vous revoir très vite pour une tartibleute, un kiwikend ou un road trip ! Merci au TUC pour tous ces bons moments qui m'ont permis de décompresser ! Merci aux plus belles filles du monde pour votre soutien, j'ai trop hâte de vous revoir et de rencontrer un triboutchou ! Je pense également aux welsh et aux lentilles, ainsi qu'à AC et Kevin pour leur soutien.

Merci à Francis pour ta présence et ton soutien, tu es le meilleur !

Enfin je tiens à remercier mon incroyable famille sans qui rien n'aurait été possible. Marion, Dominique, Nicolas, Albert et Claudie, cette thèse vous est dédiée.

Table des matières

Table des matières 3
Abréviations 5
Introduction générale 7
I. Chapitre I. Introduction bibliographique 11
I.1. Introduction 13
I.2. Microorganismes et tests antimicrobiens 14
I.3. Polymères antimicrobiens : 17
I.4. Nanomatériaux carbonés : 18
I.5. Mécanismes antimicrobiens des nanomatériaux carbonés. 20
I.6. Fonctionnalisation des nanoparticules carbonées. 23
I.7. Surfaces antimicrobiennes 33
I.7.1 Matériaux à base de nanoparticules de carbone 33
I.7.2 Méthodes d'élaboration de matériaux à base d'une matrice polymère et de nanoparticules de carbone : 36
I.7.3 Interactions entre les composants : 44
I.7.4 Propriétés antimicrobiennes des matériaux à base de nanoparticules de carbone : 46
I.8. Conclusion 49
II. Chapitre II. Matériel et méthode 51
II.1. Nanoparticules de carbone : 53
II.2. Matériaux support : 55
II.3. Elaboration des matériaux antimicrobiens à base de nanoparticules de carbone par pulvérisation (spray coating) : 56
II.4. Microscopie électronique : 57
II.5. Analyse Brunauer, Emmett et Teller BET : 58
II.6. Microscopie à force atomique AFM : 58
II.7. Spectroscopie Raman : 60
II.8. Angle de contact : 60
II.9. Texturomètre : 61
II.10. Microorganismes et conditions de croissance : 62
II.11. Test de formation de colonies (colony forming units, CFU) : 62
II.12. Test de l'activité antivirale (Tissue Culture Infective Dose 50, $TCDI_{50}$) : 63
III. Chapitre III. Elaboration des matériaux nanoparticules de carbone sur silicone 65
III.1. Stratégie : 67
III.2. Caractérisation des nanomatériaux carbonés utilisés dans ces travaux 67
III.2.1 Nanotubes de carbone bruts et oxydés 68

III.2.2 Graphène à quelques feuillets (FLG) et oxyde de graphène 73
III.3. Etude de la cinétique de polymérisation du silicone : 80
III.3.1 Analyse de texture : 80
III.3.2 Etude de l'angle de contact 84
III.3.3 Conclusion 85
III.4. Dépôt de NMCs sur le SYLGARD184 86
III.4.1 Référence silicone seul. 86
III.4.2 Protocole : paramètres de polymérisation. 86
III.4.3 Traitement aux ultrasons : 89
III.4.4 Impact de la présence de dispersant (CMC) 90
III.5. Dépôt de différents NMCs sur SYLGARD184 91
III.6. Dépôt de différents NMCs sur MED4917 97
III.7. Autre méthode d'élaboration : 102
III.8. Angle de contact : 105
III.9. AFM : 106
III.10. Spectroscopie Raman 114
III.10.1 Analyse de matériaux dépôt de GO sur silicone : 115
III.10.2 Analyse de matériaux dépôt de DWNTs Ox sur silicone : 118
IV. Chapitre IV. Elaboration des matériaux nanoparticules de carbone sur masque 121
IV.1. ATR 124
IV.2. Observations MEB : échantillons NMCs/masque 124
V. Chapitre V. Propriétés antimicrobiennes 127
V.1. Tests antibactériens contre *Pseudomonas aeruginosa* : 129
V.2. Tests antibactériens sur *Staphylococcus aureus* : 131
V.3. Tests antiviraux : 135
Conclusions et perspectives 141
Références : 145
Annexes 161
Abstract 165
Résumé 166

Abréviations

CFU : Colony Forming Units

CMC : Carboxyméthyle Cellulose

DWNTs : Double-Walled Nanotube – Nanotube biparois

DWNTs Ox : Oxidized Double-Walled Carbon Nanotube – Nanotube de carbone biparois oxydés

FLG : Few Layer Graphene

GO : Graphène Oxydé

LB medium : Milieu Luria Bertany

MED : MED4917

MWCNTs : Multi-Walled Carbon Nanotubes – Nanotubes de carbone mutliparois

NMCs : Nanomatériaux Carbonés

PBS : Phosphate Buffer Saline - tampon phosphate salin

S184 : SYLGARD 184

TCID50 : Tissue Culture Infective Dose 50

Introduction générale

La prolifération microbienne est devenue un enjeu majeur de notre société et présente de graves conséquences sanitaires et économiques. Les microbes, qui incluent les bactéries, champignons, algues, protozoaires et amibes, sont capables de générer des biofilms. Il s'agit d'agglomérats structurés de micro-organismes qui sont contenus dans une matrice auto produite. Une fois formé il est très difficile de combattre un biofilm et ce problème concerne de nombreux domaines, de l'agroalimentaire au médical ou même le domaine environnemental par exemple [1,2]. Par ailleurs, la résistance bactérienne aux antibiotiques utilisés pour lutter contre ces micro-organismes se développe [3–5]. Il est donc essentiel de développer des alternatives avec d'autres mécanismes d'action pour d'inhiber la prolifération microbienne. Certains exemples peuvent être cités dans la littérature, tels que les sels d'ammonium quaternaire [6–8], les nanoparticules d'argent [9,10] ou les ions métalliques [11]. Récemment, les nanomatériaux carbonés ont attiré l'attention pour leurs propriétés antimicrobiennes [12,13].

Les nanoparticules de carbone représentent une catégorie spécifique de nanoparticules et sont largement connues grâce à leurs propriétés exceptionnelles. Leur grande surface spécifique, leurs propriétés électriques, mécaniques et optiques ont suscité un large intérêt de la part des scientifiques, d'un point de vue théorique jusqu'à des applications plus pratiques. L'amélioration de leur synthèse facilite leur utilisation dans divers domaines comme le médical avec des systèmes de délivrance de d'agents bioactifs, ou dans l'aviation avec des matériaux composites, etc. Les propriétés antimicrobiennes de ces nanoparticules sont décrites dans la littérature et les nanoparticules de carbone les plus largement mentionnées sont le graphène et les nanotubes de carbone, ainsi que leurs formes oxydées. La plupart des études se concentrent sur l'activité antibactérienne de ces nanoparticules en suspension [14–16] et les principaux mécanismes mentionnés impliquent des phénomènes de stress oxydatif et des dommages physiques qui sont induits par les nanoparticules sur les bactéries. Il existe aussi plus récemment un intérêt croissant pour les composites antimicrobiens à base de ces nanoparticules. Cependant, l'élaboration de tels matériaux peut soulever quelques questions telle que la durabilité de l'action antimicrobienne dans le temps. De plus, la question de la toxicité liée à des nanoparticules relarguées doit être prise en compte même si les études sur le sujet peuvent présenter des résultats contradictoires [17–21].

Les nanoparticules de carbone sont résistantes chimiquement et non solubles, elles sont donc intéressantes dans l'élaboration de composites à application antimicrobienne. D'autre part les polymères se sont révélés être de bons supports de nanoparticules et également afficher des propriétés antimicrobiennes intrinsèques dans certains cas [22]. Ainsi de nombreuses études se penchent sur l'incorporation de nanomatériaux carbonés dans un polymère pour transférer l'activité de ces nanoparticules au composite obtenu. Certains exemples mentionnent une activité antimicrobienne du composite provenant des nanoparticules seules, du polymère seul, ou des nanoparticules et du polymère simultanément. Cependant la plupart des études réalisées sur des composites polymères contenant des nanoparticules de carbone ayant une activité antimicrobienne ne précisent pas les mécanismes mis en œuvre. La plupart du temps, les différents tests utilisés permettent de confirmer ou non une activité antimicrobienne de la part du matériau sans pouvoir expliquer son origine. Il est généralement supposé que l'activité antimicrobienne du composite est liée aux nanoparticules qui agissent selon les mêmes mécanismes qu'en suspension, c'est-à-dire via des mécanismes d'endommagement physique ou de stress oxydatif. Cependant la plupart des composites présentés dans la littérature semblent contenir les nanoparticules de carbone au sein de la matrice et

ne pas leur permettre d'émerger de la surface du polymère, or les principaux mécanismes antimicrobiens des nanomatériaux carbonés (NMCs) nécessitent un contact.
Plusieurs procédés sont mentionnés dans la bibliographie pour l'élaboration de composites antimicrobiens à base de NMCs, comme l'électrofilage [23–25], l'impression 3D [26–28], l revêtement par immersion [29,30], etc. Cependant ces composites contiennent les nanoparticules au sein de leur matrice. Très peu de procédés permettant à des nanoparticules de carbone d'émerger d'une matrice polymère sont cités dans la littérature. Parmi les rares exemples présents, un traitement d'oxydation UV/O_3 permettant de « décaper » la surface d'un matériau polymère contenant du GO est mentionné [31]. Une technique d'ablation laser a également été appliquée pour entraîner la liquéfaction d'un polymère ainsi qu'un transport de matière pour faire affleurer les nanoparticules contenues dans la matrice [32].

L'objectif de la thèse est de proposer une méthode d'élaboration d'un matériau antimicrobien à base NMCs respectant le principe « safer by design ». Le défi est de réussir à bloquer ces nanoparticules en surface d'un polymère de façon à éviter une perte d'efficacité dans le temps, à s'affranchir d'éventuels problèmes de toxicité liés à des nanoparticules relarguées, tout en permettant un contact entre ces nanoparticules et des microorganismes. Le fait de se concentrer sur l'interface nanoparticules de carbone et microorganismes peut également permettre d'économiser la quantité de NMCs utilisée en évitant leur incorporation dans tout le polymère utilisé.
Pour ce projet nous avons choisi d'utiliser des nanotubes de carbone double parois bruts et oxydés (respectivement DWNTs B et DWNTs Ox), du graphène à quelques feuillets (Few Layer Graphene, FLG) ainsi que du graphène oxydé (GO) car ce sont les nanoparticules de carbone les plus mentionnées dans la littérature pour leur activité antimicrobienne. Nous visons une application biomédicale, c'est pour cela que nous privilégions l'utilisation d'un matériau polymère silicone comme support de ces nanoparticules car le silicone est un matériau couramment utilisé dans des dispositifs médicaux (cathéters, sondes urinaires, etc.) [33]. Dans un premier temps nous avons choisi de travailler avec le silicone SYLGARD184 qui est généralement utilisé en micro-fluidique, car celui-ci est de faible coût et son approvisionnement est facile, puis de tester notre méthode d'élaboration avec un silicone agréé biomédical (MED4917, NuSil, Avantor). Nous avons choisi d'élaborer les surfaces antimicrobiennes par dépôt de NMCs par « spray coating », c'est-à-dire qu'une suspension de NMCs est pulvérisée sur du silicone.

La plupart des études menées sur l'action antimicrobienne des nanoparticules de carbone en suspension ou dans un composite concernent leur activité sur des bactéries. C'est pourquoi nous avons décidé de tester les surfaces élaborées avec deux souches de bactéries différentes, une souche de type gram- *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de type gram+ *Staphylococcus aureus* qui sont toutes les deux responsables des infections nosocomiales et qui sont couramment mentionnées dans la bibliographie lors des tests sur l'activité antibactérienne des matériaux. De plus, dans le contexte de crise sanitaire mondiale, des matériaux contenant des nanoparticules de carbone sont commercialisés, comme les masques respiratoires avec du graphène par exemple. Ainsi en plus de l'étude d'un dépôt de NMCs sur une matrice polymérique, nous avons décidé de tester l'activité antivirale de NMCs dans le cadre de masques respiratoires. Dans le contexte de l'épidémie actuelle, les surfaces sont testées contre la souche virale SARS-CoV-2.

Le premier chapitre de ce manuscrit est consacré à une introduction bibliographique. Nous présentons tout d'abord les différents types de microorganismes et de tests utilisés sur des matériaux, puis nous nous concentrons sur l'activité antimicrobienne des polymères et des nanomatériaux carbonés. Finalement nous nous intéressons aux matériaux antimicrobiens à base de polymère et de nanomatériaux carbonés en étudiant leur méthode d'élaboration, les tests antimicrobiens utilisés ainsi que les mécanismes envisagés.

Le deuxième chapitre décrit les différents protocoles et matériaux utilisés lors de ces travaux.

Le chapitre trois porte sur la caractérisation des nanomatériaux carbonés, ainsi que leur dépôt sur des matériaux de silicone et de leurs caractérisations.

Le chapitre quatre décrit l'élaboration ainsi que les caractérisations des dépôts de nanomatériaux carbonés sur masque.

Un cinquième chapitre présente les résultats des tests antibactériens et antiviraux réalisés sur les différentes surfaces antimicrobiennes préparées au cours de ces travaux.

Enfin une conclusion générale rassemblant l'essentiel des observations ainsi que les perspectives pour poursuivre ces recherches seront présentées.

Chapitre I

Introduction bibliographique

I.1. Introduction

Actuellement, nous faisons face à la prolifération microbienne qui touche de nombreux domaines, que ce soit dans le médical, dans l'agroalimentaire, dans les transports, etc. Les microbes sont des organismes qui incluent les bactéries, les virus, les champignons, les amibes, les protozoaires et les algues, et qui sont généralement associés à des vecteurs ou sources de maladies. Ils sont présents partout que ce soit sur nos mains, nos téléphones ou nos tables, et peuvent se répandre très facilement. Ils peuvent se propager en adhérant aux matériaux et sont même capables de former des biofilms. Les biofilms sont des structures où les microbes se lient entre eux grâce une matrice polymère qu'ils développent. Cela offre aux microorganismes une protection contre les agents extérieurs comme des antibiotiques par exemples [1,2]. Une fois formé il est très difficile de détruire un biofilm, et ceux-ci peuvent se développer dans des milieux aux conditions environnementales difficiles, comme la coque d'un bateau en milieu corrosif, où dans le corps humain sur des dispositifs médicaux implantables par exemple [34]. Les matériaux concernés peuvent être fragilisés, et également se retrouver vecteurs d'infections nosocomiales [35,36].

L'adhésion et la prolifération des microbes ont ainsi un grand impact sur l'économie et la santé publique, il est donc nécessaire de trouver des méthodes permettant de lutter contre leur présence, en les détruisant, ou en empêchant leur adhésion en surface, comme les matériaux antimicrobiens passifs à base de polymère par exemple [37–39]. De plus il s'avère nécessaire d'élaborer des matériaux capables d'inhiber la prolifération microbienne car nous assistons au phénomène de résistance des bactéries face aux antibiotiques généralement utilisés pour les combattre [3–5]. Le développement de matériaux antimicrobiens est ainsi essentiel, car cela peut limiter l'adhésion des microorganismes et/ou permettre leur destruction.

De nombreux agents présentant des mécanismes alternatifs aux antibiotiques sont développés, comme les peptides, les sels d'ammonium quaternaires [6–8,40], les ions métalliques [11] ou les nanoparticules [10,41,42] et les recherches de matériaux antimicrobiens sont toujours en cours pour développer des solutions toujours plus performantes. Parmi les nanoparticules étudiées, les nanoparticules de carbone représentent une catégorie à part entière. Celles-ci sont largement utilisées dans de multiples domaines pour leurs propriétés exceptionnelles, et un intérêt croissant se porte sur leurs propriétés antimicrobiennes [12,13,43–47]. De nombreuses études se penchent sur l'activité antibactérienne des nanomatériaux carbonés qui permettraient du surmonter le problème de résistance des bactéries face aux antibiotiques utilisés pour lutter contre elle. Également dans ce contexte de pandémie mondiale une attention particulière est portée sur l'activité antivirale des nanomatériaux carbonés face au virus SARS-CoV-2 [48–50]. Des recherches sont toujours en cours pour développer des matériaux capables d'inactiver ou inhiber la transmission du virus et les nanoparticules de carbone présentent un grand potentiel concernant ces applications.

La plupart des études existantes portent sur l'activité antimicrobienne des nanoparticules de carbone en suspension mais de plus en plus d'articles s'intéressent à leur activité au sein d'un matériau [14–16]. Des études sont également menées sur l'association de nanoparticules de carbone avec d'autres composés comme des particules d'argent [9,51–53] ou de l'oxyde de zinc [54,55] pour améliorer leur activité antimicrobienne.

Cependant, l'utilisation de nanoparticules soulève plusieurs problématiques, concernant notamment une toxicité potentielle liée à des nanoparticules en liberté, ou concernant leur capacité à assurer une action antimicrobienne durable dans le temps car les nanoparticules peuvent être libérées et/ou se dissoudre progressivement.

Etant très résistants chimiquement, les nanomatériaux carbonés ne sont pas solubles et sont donc une solution intéressante pour l'élaboration de matériaux antimicrobiens. Les études sur la toxicité des nanoparticules de carbone présentent parfois des résultats contradictoires et

n'aboutissent pas à des conclusions arrêtées, et cette toxicité éventuelle liée à des particules en liberté est donc à prendre en compte [17–19,56].

Ainsi il semble pertinent d'étudier l'activité de ces nanoparticules lorsqu'elles sont piégées dans un matériau. La littérature mentionne des exemples de matériaux composites à base de polymère et de nanoparticules de carbone [57]. Les polymères peuvent en effet être de bons candidats pour piéger les particules et certains peuvent également présenter des propriétés antimicrobiennes intrinsèques [58].

Dans un premier temps nous présenterons les différents microorganismes ainsi que les tests antimicrobiens décrits dans la littérature pour déterminer l'activité antimicrobienne de matériaux polymère avec nanoparticules carbonées. Nous nous concentrerons sur le cas particulier de polymères ayant une activité antimicrobienne intrinsèque, puis sur les propriétés antimicrobiennes des nanoparticules de carbone avant de passer en revue les matériaux antimicrobiens à base de polymère et de nanoparticules de carbone mentionnés dans la littérature. Dans chaque cas nous relèverons la méthode d'élaboration, les souches microbiennes ainsi que les tests utilisés, et le mécanisme antimicrobien proposé. Nous discuterons également des applications potentielles et des conclusions générales seront ensuite proposées. Les informations essentielles de ce chapitre ont déjà été publiées dans une revue en 2021 [59].

I.2. Microorganismes et tests antimicrobiens

Les microbes sont des microorganismes vivants présents dans notre environnement et faisant partie intégrante de notre quotidien. Ils composent environ la moitié du corps humain [60] et sont pour la plupart nécessaires à notre bon fonctionnement, cependant certains peuvent causer des effets pathogènes. Dans le langage courant les microbes sont généralement associés à des vecteurs de maladies.

Parmi les microbes nous pouvons citer les bactéries, les champignons ou les protozoaires. Les virus ne sont généralement pas compris dans cette catégorie, ces entités ne peuvent pas fonctionner de manière autonome et doivent infecter un hôte et utiliser sa machinerie cellulaire pour survivre. Un virus est composé au minimum de matériel génétique contenu dans une capside (coque protéique) et possède une taille comprise entre 20 et 500 nm [61].

Les champignons sont des cellules eucaryotes souvent filamenteuses avec des parois cellulaires contenant de la chitine qui présentent beaucoup de variation en taille et en structure. Ils ont longtemps été associés aux végétaux malgré leur manque de chlorophylle, chloroplastes et d'amidon qui en sont les caractéristiques principales [61].

Les bactéries sont des microorganismes unicellulaires allant de 1 à 5 µm composés au moins de parois, d'une membrane plasmique, de cytoplasme et d'ADN. Les bactéries possèdent les caractéristiques du vivant, elles peuvent survivre et se reproduire de manière autonome. Elles peuvent être divisées en deux catégories selon leurs parois, les gram positives et les gram négatives. Les bactéries à gram positif ont une paroi de 20 à 80 nm d'épaisseur composée de peptidoglycanes et n'ont pas de membrane lipidique extérieure au contraire des bactéries à gram négatif qui ont cependant une paroi plus fine (6-15 nm) [62].

Ainsi les microbes peuvent présenter des structures bien différentes, les effets des agents antimicrobiens varient donc selon le type de microbes rencontrés. De nombreux tests sont mentionnés dans la littérature pour déterminer l'activité antimicrobienne de différents matériaux comme des polymères, des suspensions de nanoparticules, ou des composites, sur des agents pathogènes [63].

Les principaux tests antimicrobiens mentionnés dans la littérature sont les tests de zone d'inhibition, de décompte de colonies, de mesures de densité optique, ou d'évaluation de cellules marquées. Ces tests permettent de conclure sur l'activité antimicrobienne des matériaux sur la population de microorganismes. Nous pouvons rapidement résumer ces différents tests selon trois étapes : la mise en contact des microbes avec le matériau ; la collecte des microbes et l'étude de leur prolifération en comparaison d'un contrôle [64].

La méthode de zone d'inhibition ou de diffusion en disque (Figure I.1a) est une méthode de diffusion qualitative fréquemment utilisée qui consiste à préparer un milieu de culture (comme un milieu agar Luria-Bertani LB ou un milieu Mueller Hinton Agar MHA) contenant des microbes en concentration connue pour ensuite placer le matériau testé au contact du milieu. Le matériau agit sur les microorganismes et entraîne l'apparition d'une zone d'inhibition autour de celui-ci. Le diamètre de cette zone est mesuré et comparé à une référence positive comme un antibiotique par exemple [65,66]. Des variations de cette méthode existent [67], pour pouvoir tester l'activité de plante par exemple avec l'utilisation de puits agar [68]. Il est aussi possible de déterminer l'action quantitative d'un matériau avec le test décrit en utilisant plusieurs concentrations de matériaux et en effectuant des dilutions pour déterminer la concentration minimale d'inhibition MIC [69].

Le décompte de colonies (colony forming units CFU) (Figure I.1b) est une autre méthode fréquemment utilisée qui permet d'évaluer l'activité antimicrobienne d'un matériau. Le matériau est incubé au contact de microbes, ceux-ci sont ensuite prélevés et transférés sur un milieu de culture. Le décompte des colonies formées et la comparaison avec une référence permet d'évaluer l'activité antimicrobienne du matériau testé [70]. Le test de séroneutralisation par réduction de plages de lyse (PRNT « Plaque Reduction Neutralization Test ») permet de quantifier d'évaluer l'activité antivirale d'un matériau. Une suspension virale est mélangée avec le matériau à tester et étalée sur des cellules placées sur un milieu de culture. Des régions de cellules infectées se forment, l'effet du matériau testé peut donc être évalué en comparant la proportion de plaques de cellules formées après incubation avec ce matériau ou une référence. La quantification de ces plaques est réalisée par microscopie, ou à l'aide de colorants qui réagissent avec les cellules infectées [71].

La prolifération microbienne peut également être suivie par mesure de la densité optique. Après incubation des microorganismes avec les matériaux testés ces microorganismes sont prélevés et remis en suspension pour pouvoir mesurer la densité optique et conclure sur l'activité antimicrobienne ayant lieu par comparaison avec une référence [72]. Toutefois, ce type de test ne donne pas d'indication concernant le mécanisme ayant lieu. Le test MTT est une méthode de numération de cellules vivantes permettant de mesurer l'activité antivirale d'un matériau. Le réactif sel de tétrazolium MTT utilisé forme un précipité violet en contact de cellules vivantes. La quantité de précipité obtenue est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes, la mesure de cette quantité après incubation de cellules avec le matériau testé et une référence permet de déduire l'activité antivirale de ce matériau [73].

Au lieu de mesurer la densité optique il est possible de mesurer la quantité d'ADN ou d'ARN présente par spectroscopie ou chromatographie pour estimer le nombre de cellules impactées.
Ainsi le test RT-PCR (« Real Time Polymerase Chain Reaction ») permet de quantifier la présence d'une section spécifique de l'ADN d'un échantillon grâce à un marqueur détectable en fluorescence qui se fixe sur cette section d'ADN. Cela permet de déterminer la présence d'un virus ou non dans les cellules analysées [74].

De nombreux articles mentionnent les tests en fluorescence (Figure I.1c-d) qui permettent de quantifier le nombre de cellules vivantes et mortes. Après incubation avec le matériau les cellules sont introduites au contact de marqueurs. Le test ne peut être effectué directement sur le matériau que si celui-ci est transparent. Selon leur nature, certains marqueurs comme le SYTO 9 qui est très populaire

(émission fluorescente verte à 503 nm) ou le Di-Amidino-2-Phenyl-Indole (DAPI, émission fluorescente bleue à 461 nm) ont la capacité de pénétrer à travers la membrane des cellules vivantes et endommagées et de colorer l'ADN (ou l'ARN dans le cas du DAPI) des cellules, qu'elles soient gram positives ou gram négatives. D'autres marqueurs comme le Propidium Iodide (PI, émission fluorescente rouge à 617 nm) pénètrent facilement dans les cellules endommagées pour colorer l'ADN, mais il leur est impossible de passer à travers des membranes intactes. L'observation en fluorescence des cellules marquées révèle l'effet antimicrobien du matériau avec l'impact sur la membrane des cellules [72,75]. Cependant ce test ne procure pas d'informations concernant le mécanisme antimicrobien impliqué.

Certains tests utilisent des marqueurs pour permettre l'identification de composants spécifiques (composants métaboliques, espèces oxygénées réactives, lipides peroxydés, etc.) et permettent ainsi l'obtention d'informations précieuses pour étudier les mécanismes impliqués [30,75–80].

L'utilisation d'un microscope optique permet d'observer l'adhésion de cellules. Des informations plus précises comme des variations de morphologie de cellules incubées avec le matériau ou la formation de biofilms peuvent être observées à l'aide de microscopes électroniques, que ce soit en utilisant un microscope à balayage ou en transmission. Le Microscope à Force Atomique (AFM) peut aussi être utilisé pour mesurer la topographie de surface d'un matériau et ainsi déterminer s'il y a une formation de biofilm [75,81]. Cette technique peut aussi être utilisée pour étudier les propriétés mécaniques des membranes cellulaires [82,83]. Ces méthodes de microscopie nécessitent de longues étapes de préparations des échantillons et ne sont donc pas utilisées en routine.

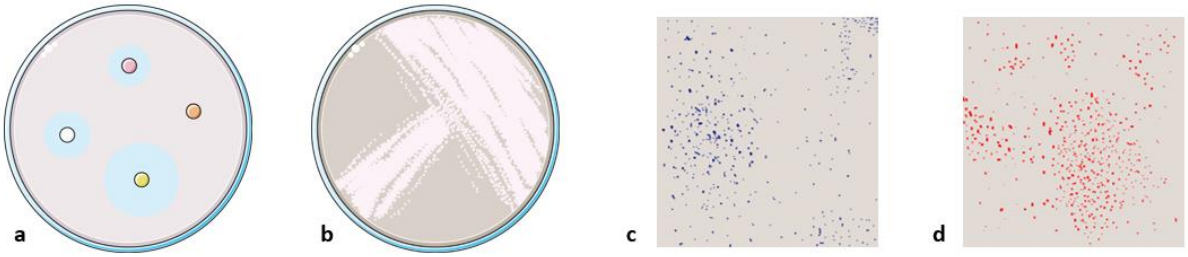


Figure I.1 : Schémas illustrant les tests antimicrobiens de a) zone d'inhibition et b) colony counting (repésentation de ces tests en boîtes de pétri remplies de milieu nutritif) et les tests de cellules marquées en fluorescence avec c) DAPI et d) PI (sur lame de verre) [59].

La plupart des articles étudiant l'activité antimicrobienne des nanoparticules de carbone se concentrent sur l'action antibactérienne en particulier. Les différents tests de zone d'inhibition, de décompte de colonies ou de densité optique sont couramment mentionnés dans la littérature pour tester l'activité antibactérienne des matériaux. Les souches les plus utilisées parmi les bactéries grams positives sont les souches *S. aureus* et *B. subtilis* et les souches de bactéries gram négatives majoritairement testées sont les souches *E. coli* et *P. aeruginosa* [75,84–86]. Ces différentes souches sont impliquées dans les infections nosocomiales. Ces bactéries peuvent développer une résistance contre les antibiotiques utilisés contre elles, ce qui conduit à de grands problèmes sanitaires. Il est donc particulièrement important de tester l'activité antibactérienne de matériaux sur ce genre de souches. D'autre part, de plus en plus d'attention est portée sur l'activité antivirale des nanomatériaux carbonés [87]. De nombreuses études présentent l'activité de nanoparticules de carbone sur des infections telles que le Virus de la Diarrhée Epidémique Porcine (PEDV), le virus de la pseudorage (PRV), le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Également dans ce contexte de pandémie mondiale une attention particulière est portée à l'activité de ces nanomatériaux face au virus SARS-CoV-2. [88] [89] [48]. Le virus SARS-CoV-2 possède une

structure similaire aux coronavirus responsables du syndrome respiratoire aigu sévère. Les personnes infectées peuvent être asymptomatiques ou présenter de nombreux symptômes tels que des courbatures, de la fièvre, de la fatigue, etc. Dans une moindre mesures certains articles se penchent sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne des nanomatériaux carbonés sur certains champignons [20,80,90].

I.3. Polymères antimicrobiens :

Les polymères antimicrobiens peuvent être associés à des nanomatériaux carbonés pour améliorer leurs propriétés antimicrobiennes intrinsèques. Il semble ainsi nécessaire de décrire brièvement ces polymères pour pouvoir comprendre le rôle joué par les différents constituants d'un matériau nanocomposite. Les polymères antimicrobiens peuvent combattre des agents pathogènes selon des mécanismes d'action passifs ou actifs. Les polymères actifs peuvent tuer les microorganismes entrant en contact par interactions électrostatiques ou biocides, à la différence des polymères passifs qui luttent contre les microbes principalement en empêchant leur adhésion en surface. Les microbes sont principalement de nature hydrophobe ou chargés négativement, ainsi le contrôle des propriétés hydrophiles, de charge ou d'énergie de surface des matériaux peut induire des mécanismes répulsifs [37]. Par exemple, le Poly(éthylène glycol) (PEG) peut être utilisé pour empêcher l'adhésion de cellules ou de protéines grâce à sa surface hydrophile [91].

Les polymères antimicrobiens peuvent être classés en 3 catégories [37]. Certains sont constitués d'une succession d'unités biocides, tandis que l'activité antimicrobienne d'autres polymères est développée par toute la macromolécule. Ces derniers peuvent détériorer les membranes cellulaires par interactions électrostatiques. En effet on retrouve beaucoup d'exemples de tels polymères contenant des groupes cationiques comme de l'ammonium quaternaire [92,93], du phosphonium [94,95], du sulfonium ternaire [96] ou de la guanidine [97]. D'autres polymères ne présentent pas d'activité antimicrobienne intrinsèque mais peuvent relarguer des biocides, ils agissent plutôt comme « réservoir » de substances antimicrobiennes comme de la gentamicine, le triclosan ou l'argent par exemple [38,98–100]. Pour plus d'informations sur ces polymères, le lecteur peut se référer à des revues détaillées sur le sujet [37,39,101]. Ce document se concentre spécifiquement sur des polymères contenant des nanoparticules de carbone comme agent antimicrobien.

I.4. Nanomatériaux carbonés :

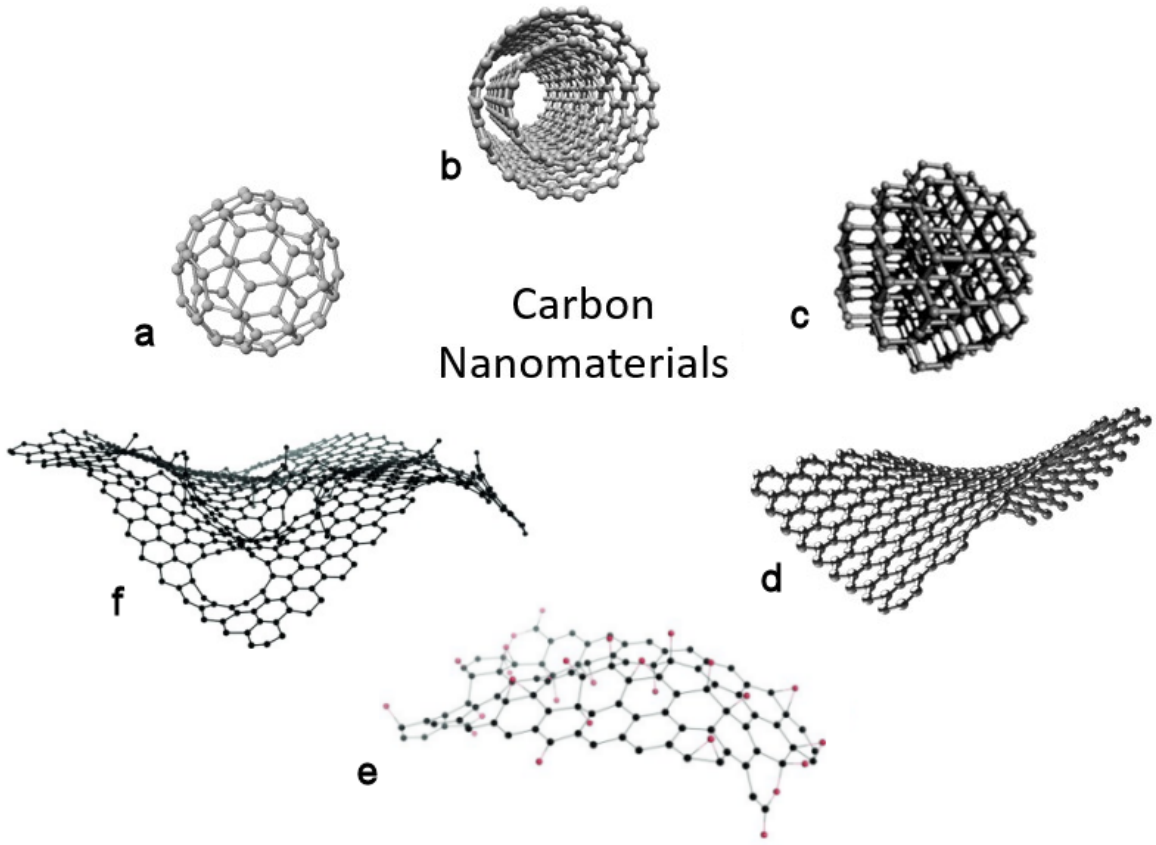


Figure I.2 : Nanomatériaux carbonés : a) Fullerène (C60); b) Carbone Nanotube (CNT); c) Nanodiamant; d) Graphène; e) Graphène Oxidé (GO, atomes d'oxygène représentés en rouge; f) Graphène oxydé réduit [59].

On trouve de nombreuses formes de nanoparticules de carbone (Figure I.2), allant des nanodiamants et fullerènes à 0 dimension, des nanotubes de carbone à 1 dimension, au graphène et ses dérivés (graphène oxydé, graphène oxydé réduit) à 2 dimensions. Une propriété commune de ces nanoparticules est la possibilité de les fonctionnaliser par greffage de groupes fonctionnels en surface qui influent considérablement sur les propriétés optiques, électroniques, hydrophobes/hydrophiles, de charge de surface, et même sur les propriétés mécaniques. La méthode de fonctionnalisation la plus courante est par la réalisation d'une simple oxydation qui permet le greffage de groupements fonctionnels oxygénés et qui est généralement la conséquence de traitements de purification [102]. De nombreux procédés de fonctionnalisation sophistiqués ont largement été décrits dans la littérature [103].

Les nanodiamants sont des nanoparticules 0D composées au centre d'atome de carbone hybridés sp^3 et comprenant souvent en périphérie des atomes de carbone hybridés sp^2 et des groupes fonctionnels [104]. Ces nanoparticules possèdent des propriétés mécaniques et optiques exceptionnelles ainsi qu'une surface spécifique généralement comprise entre 200 et 600 m^2/mg [105–108]. Ces propriétés dépendent du ratio d'atomes de carbone hybridés sp^3/sp^2 [12,109].

Le graphène est un matériau 2D composé d'atomes de carbone hybridés sp^2 liés entre eux en hexagones. Cette structure plane d'épaisseur atomique est à la base d'autres nanomatériaux comme

le fullerène ou les nanotubes de carbone (NTCs) [12]. Le graphène et ses dérivés peuvent être classés selon leur nombre de feuillet, leur taille moyenne et leur ratio d'atomes carbone-oxygène (C/O) (Figure I.3) [110] qui est le paramètre ayant le plus fort impact sur leurs propriétés physico-chimiques. La superposition de 2 à 10 feuillets de graphène correspond à du « few layer graphene » FLG tandis que la présence de 10 feuillets ou plus réfère à des nanoplaquettes de graphite. Le graphène oxydé (GO) est un feuillet de graphène ayant de nombreuses fonctions oxygénées en surface et sa réduction correspond au graphène oxydé réduit (rGO). Le graphène est très hydrophobe et possède de nombreuses propriétés physico-chimiques exceptionnelles, une bonne mobilité électronique, de bonnes propriétés mécaniques et une surface spécifique théorique atteignant 2600 $m^2.g^{-1}$ [111–113], tandis que le graphène oxydé est isolant mais très hydrophile et se disperse bien mieux que son homologue non fonctionnalisé [114].

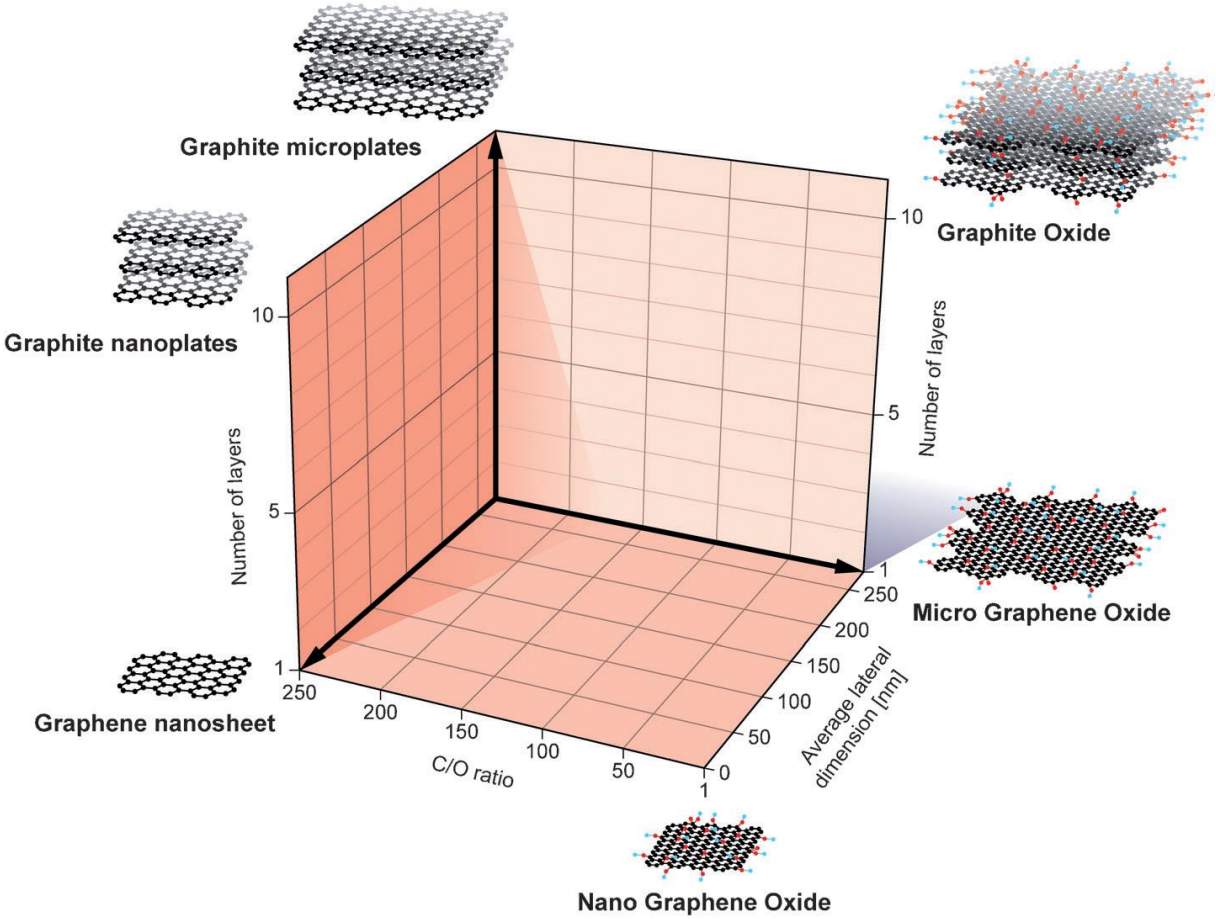


Figure I.3 : Grille de classification pour la catégorisation des différents types de graphène selon trois propriétés fondamentales des matériaux à base de graphene : nombre de feuillets de graphene, dimension latérale moyenne, et ratio atomique carbone/oxygène [59].

Les fullerènes sont des nanostructures sphériques fermées 0D contenant une majorité d'atomes de carbone hybridés sp^2 (C_{60} [12,13], C_{70}, C_{76}, C_{78}, C_{84}, etc.). Leurs propriétés (optiques, mécaniques, chimiques, électriques) dépendent également de leur structure et de leur taille [115].
Enfin les nanotubes de carbone peuvent être décrits comme des feuillets de graphène enroulés et généralement fermés par des demi-fullerènes. Les nanotubes de carbone mono parois (Single-Wall Carbon Nanotubes, SWNT) ont un diamètre de seulement quelques nanomètres ou moins, ils peuvent se comporter en semiconducteurs ou métaux selon leur structure électronique. Les nanotubes de carbone multi-parois (Multi-Wall Carbon Nanotubes ; MWNTs) sont composés de SWNT concentriques

et peuvent atteindre 100 nm de diamètre externe [12]. Comme pour les autres nanoparticules de carbone, les paramètres tels que le diamètre, la longueur, le nombre de parois et la présence de groupes fonctionnels jouent un rôle important sur leurs propriétés [116].

Pour toutes ces raisons les nanomatériaux carbonés sont utilisés pour de nombreuses applications, allant de capteurs, super-conducteurs, dispositifs optiques, à des dispositifs de délivrance de molécules actives et des applications biomédicales en général, incluant des applications antimicrobiennes [111,115,117–119]. Il est important de mentionner que dès le début des recherches menées dans ce domaine, de nombreuses études se sont intéressées à la potentielle toxicité des nanoparticules de carbone sur le corps humain [120,121] ou dans l'environnement [122]. L'activité antimicrobienne des nanoparticules de carbone se manifeste selon les mêmes types de mécanismes mais est considérée comme positive car elle concerne l'élimination d'agents pathogènes. La plupart du travail lié aux NMCs s'est concentré sur la prévention de la formation de biofilms et/ou l'élimination de bactéries, et plus récemment sur leur activité antivirale.

I.5. Mécanismes antimicrobiens des nanomatériaux carbonés.

A ce jour, la littérature est principalement focalisée sur l'activité antimicrobienne des nanoparticules de carbone en suspension dans un liquide car c'est la méthode la plus courante pour exposer des cultures cellulaires.

Deux principaux mécanismes sont reportés : les dégradations physiques et le stress oxydatif. Les NMCs peuvent en effet provoquer des dégâts physiques sur les microorganismes en entrant en contact avec ceux-ci et en perforant leur membrane externe, causant la perte des composants cellulaires et donc la mort de la cellule.

Le mécanisme exact peut varier selon le type de particule utilisée. En effet le graphène (ou plus probablement FLG) peut être considéré comme un « couteau », à l'échelle nanométrique (2D) coupant la membrane, tandis qu'il serait plus exact de décrire un nanotube comme une « nano-aiguille » (1D) (Figure I.4a). Ces deux approches dépendent vraisemblablement de la rigidité des nanoparticules, il ne semble pas réaliste de considérer le graphène, qui est un matériau très flexible, comme un couteau tandis que cela semble plus adapté dans le cas du FLG qui est beaucoup plus rigide. De même concernant les NTCs, les nanotubes ayant une paroi ou deux sont plus à même d'être progressivement inclus dans la membrane cellulaire tandis que des nanotubes multiparois qui sont plus rigides peuvent plutôt pénétrer dans la cellule comme des aiguilles.

De nombreux exemple de ces mécanismes sont présents dans la littérature pour illustrer l'activité antibactérienne et antivirale [73,123,124] des nanoparticules de carbone.

Les nanoparticules peuvent également perturber physiquement les cellules sans toutefois perforer ou pénétrer à travers la membrane. Une étude présente des nanoparticules de GO capables de suffisamment perturber des cellules infectées par le virus de la diarrhée épidémique porcine PEDV et des cellules infectées par le virus de la pseudorage PRV pour les inactiver sans pénétrer à l'intérieur de celles-ci [125].

L'isolement d'un microorganisme par rapport à son environnement est un autre mécanisme possible. Par exemple un feuillet de graphène peut s'enrouler autour de bactéries et bloquer leur accès à des nutriments, cette action est illustrée dans la Figure I.4b. La prolifération est ainsi stoppée et le microorganisme peut être détruit [111,126]. Des exemples d'enchevêtrement de nanoparticules carbonées sur des cellules virales existent également, comme l'enchevêtrement de nanotubes de carbone autour de virus M2S bactériophages de *E. coli* pour les inactiver.

La déstabilisation de la membrane bactérienne peut aussi être obtenue via des interactions électrostatiques avec les nanomatériaux. Cela est attendu pour des nanomatériaux carbonés fonctionnalisés, surtout lorsqu'ils ont été oxydés et qu'ils possèdent des groupes carboxylates ($-COO^-$) en surface. Également l'activité antivirale des nanoparticules GO et rGO peut être attribuée à leur charge négative qui favorise les interactions électrostatiques avec les virus chargés positivement [73,125].

D'après la littérature les NMCs sont également capables d'inhiber la division cellulaire de cellules cancéreuses. Les propriétés biomimétiques des MWNTs qui leur permettent d'interférer avec des microtubules ont été reportées [127]. Ces protéines intracellulaires sont des nanotubes présentant des similitudes avec les MWNTs et jouant un rôle central dans le déplacement et la division cellulaire. Les interactions entre les microtubules et les MWNTs génèrent des interférences qui inhibent la prolifération cellulaire. Des exemples de ce mécanismes n'ont pas été trouvé dans la littérature, nous supposons toutefois qu'il peut avoir lieu contre des microbes pathogènes.

De plus les nanoparticules de carbone sont capables d'inhiber l'activité d'un virus en interagissant avec ses récepteurs et en l'empêchant de se fixer sur une cellule hôte. La littérature mentionne la capacité du GO à inhiber le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) avec le blocage de l'attachement viral comme principal mécanisme [128]. Les nanoparticules de carbone peuvent aussi imiter la surface de cellules pour attirer les récepteurs des virus, des exemples sont présents dans la littérature après fonctionnalisation des nanoparticules carbonées [125].

Les mécanismes de stress oxydatif sont à prendre en compte lors de l'étude de l'activité antimicrobienne des NMCs. Les interactions chimiques de ces derniers avec la surface de microorganismes peuvent engendrer des réactions inflammatoires avec la production d'espèces oxygénées réactives (Reactive Oxygen species, ROS) (Figure I.4c). Ces ROS peuvent détériorer les lipides, les protéines, ainsi que l'ADN des bactéries et causer la peroxydation des membranes, provoquant la mort cellulaire. Il est important de préciser que ces mécanismes dépendent beaucoup de la nature du nanomatériau carboné, en effet les nanotubes de carbone et les fullerènes peuvent présenter simultanément des propriétés antioxydantes intrinsèques [129–131]. De plus des réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir lieu avec un transfert de charge entre les nanomatériaux et les bactéries. Les NMCs peuvent attirer les électrons des cellules et causer l'arrêt de mécanismes biologiques comme la respiration [12,13,115,132,133]. Contrairement aux cellules eucaryotes, les bactéries n'ont pas de mitochondries et les réactions associées à la chaîne respiratoire sont localisées dans la membrane cellulaire. Les NMCs peuvent capter un électron de la chaîne respiratoire et inhiber la réaction de transport, induisant l'effet bactéricide [134,135].

A la différence des virus, les fungi possèdent des mitochondries, cependant nous n'avons pas trouvé d'études concernant l'impact des NMCs sur celles-ci dans la littérature. A ce jour les exemples de mitochondries dégradées par des NMCs concernent seulement des cellules mammifères [136] ou végétales [137].

L'activité antimicrobienne intrinsèque des NMCs est probablement due à une combinaison de mécanismes physiques et chimiques. D'autres propriétés des NMCs peuvent être combinées pour améliorer cette activité [133]. Parmi différentes possibilités, les NMCs peuvent diminuer la viabilité microbienne par effet photothermique avec l'absorption et la conversion d'une irradiation laser NIR (« Near Infra-Red) en chauffage local (Figure I.4d) [111,138–142]. Un échauffement local peut aussi être réalisé par irradiation micro-ondes, où les NTCs stimulés peuvent provoquer une ablation thermique [143,144], ou sous ondes acoustiques où les NMCs peuvent adsorber de l'énergie acoustique et induire l'hyperthermie de cellules cancéreuses [145–147]. Les mécanismes d'hyperthermie sont fréquemment utilisés dans le traitement de cancers et pourraient également être appliqués contre des agents pathogènes [143]. Une étude attribue l'activité antivirale de nanotubes de carbone contre le SARS-CoV-2 à de l'hyperthermie. Les nanotubes de carbones sont incorporés dans

un masque noir et absorbent toutes les longueurs d'onde de la lumière ce qui induit une élévation de la température qui serait suffisante pour désactiver le virus [148]. Celui-ci peut être désactiver à une température de 56 °C en 15 minutes [149,150].

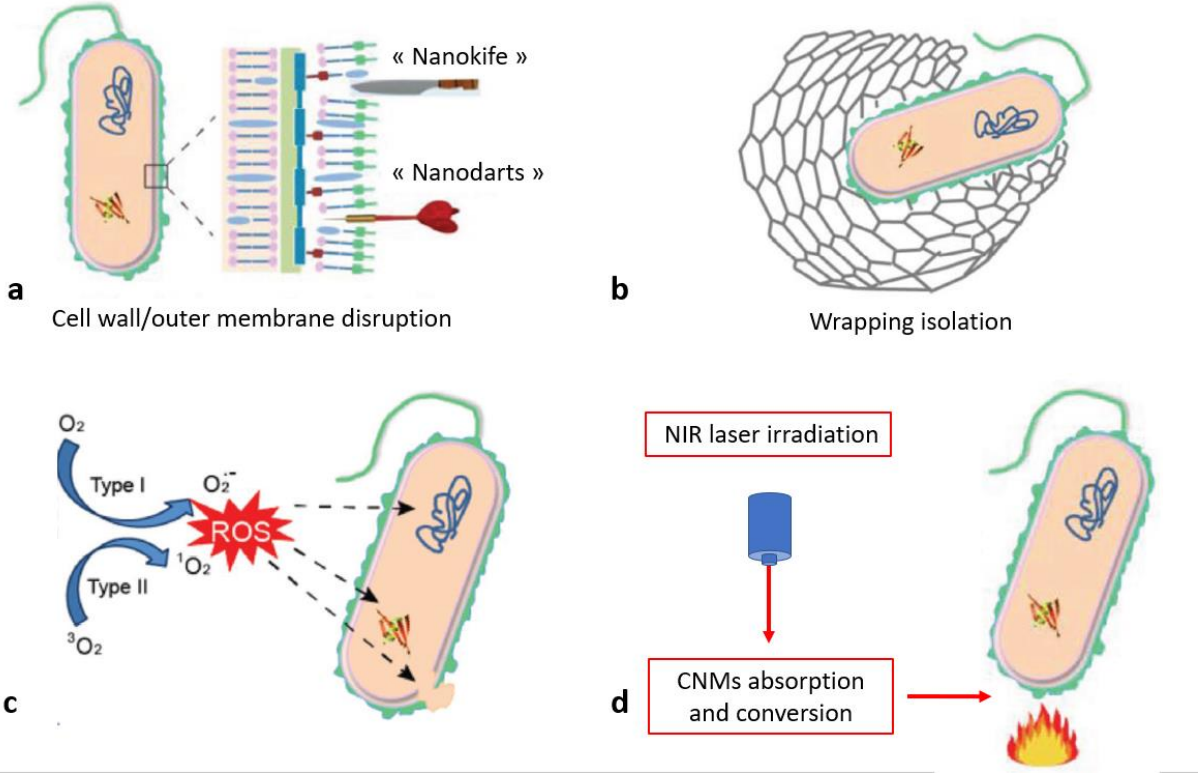


Figure I.4 : Schémas illustrant les actions antibactériennes des NMCs par a) dégradations physiques/mécaniques; b) mécanisme d'isolation par enroulement des NMCs autour de la bactérie; c) induction de stress oxydatif ROS; d) effet photothermique [59].

Ainsi l'activité antimicrobienne des NMCs peut être due à plusieurs mécanismes, il est cependant probable qu'elle dépende de nombreux paramètres tels que l'environnement et la nature des microorganismes. Notre étude de la littérature met en évidence que la plupart des travaux publiés jusqu'à présent se sont concentrés sur les nanotubes de carbone et sur le graphène ainsi que ses dérivés, particulièrement le GO. De plus, des différences importantes pour une nanostructure donnée ont également été identifiées, en fonction de ses paramètres intrinsèques, notamment la taille des particules, l'épaisseur et la chimie de surface [20,151]. Par exemple, le GO est plus efficace que le graphène car les groupements oxygènes facilitent sa dispersion, permettant ainsi de meilleurs contacts cellule/particule. Cela peut également être lié à l'effet de charge de surface décrit précédemment (au pH biologique, les fonctions carboxyliques doivent être présentes sous forme de carboxylates chargés négativement). De plus, la taille est un paramètre important car un petit feuillet de graphène est capable de pénétrer et diffuser dans une cellule sans endommager sérieusement la membrane, ce qui n'est pas le cas pour des feuillets plus larges. Les nanotubes de carbone ont également des mécanismes d'action différents selon leur taille. Les tubes plus courts semblent avoir plus de possibilités d'interaction extrémité/cellule et devraient donc être plus efficaces [152]. Cependant, des nanotubes plus longs peuvent causer des dommages à l'intérieur de la cellule lors du transit et ainsi augmenter l'activité antimicrobienne[153].

Ainsi Il est difficile de prédire l'action des particules et leur efficacité [154]. Bien que la plupart des revues aient tenté de mettre en évidence les relations entre les paramètres physico-chimiques des NMCs et leur activité antimicrobienne, aucune conclusion claire n'a été établie à ce jour. Les auteurs

restent prudents quant à l'évocation de phénomènes qui sont encore difficiles à mettre clairement en évidence, ou qui sont même controversés [20,21]. L'explication est qu'il y a trop de paramètres à prendre en compte, des particules elles-mêmes jusqu'à l'environnement biologique, le type de microorganisme testé et le type de test utilisé. Il est donc très difficile de comparer les études existantes et de tirer des conclusions générales. Afin d'atteindre cet objectif de nouvelles études devraient être menées sur des procédures expérimentales standardisées.

Les nanomatériaux carbonés possèdent donc des propriétés antimicrobiennes intrinsèques. De plus il est possible de les associer à des agents antimicrobiens connus, des fonctionnalisations de NMCs avec des nanoparticules d'argent Ag, des métaux, des agents photocatalytiques, ou des antibiotiques sont décrites dans la littérature. Un passage en revue de ces différentes fonctionnalisations est important car certains mécanismes antimicrobiens décrits pour des NMCs dispersés dans un milieu liquide peuvent ne pas s'appliquer dans le cas d'une surface où les nanoparticules carbonées sont immobilisées

I.6. Fonctionnalisation des nanoparticules carbonées.

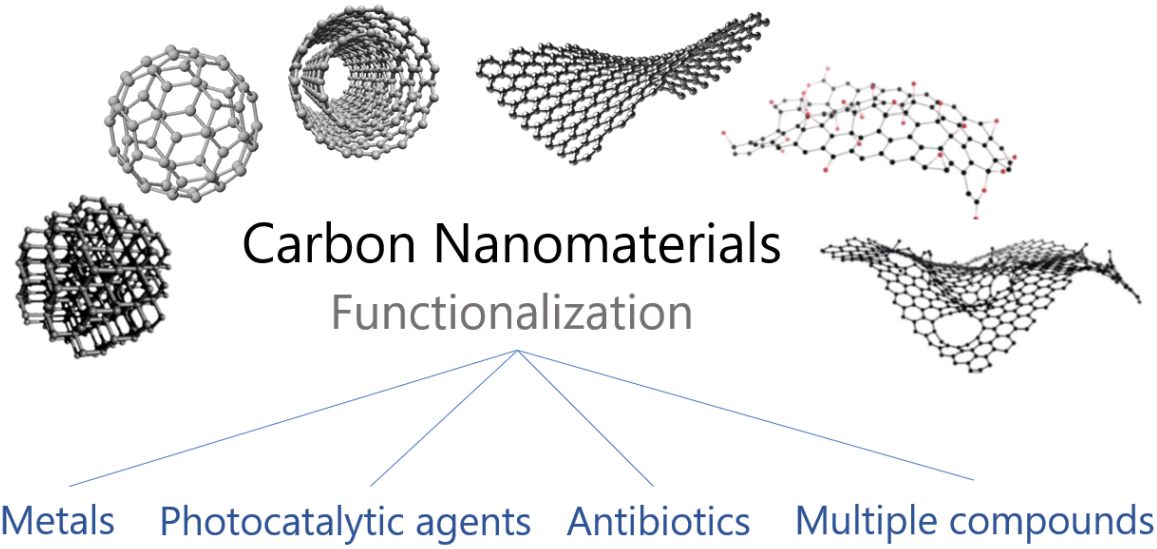


Figure I.5 : Fonctionnalisations possibles des NMCs décrites dans la littérature [59].

La fonctionnalisation de nanomatériaux carbonés a déjà été largement étudiée dans la littérature et nous ne souhaitons nous attarder sur ce sujet mais plutôt nous concentrer sur des approches de fonctionnalisation pertinentes dans le cas d'applications antimicrobiennes.
Dans la plupart des exemples trouvés dans la littérature, la fonctionnalisation est obtenue par adsorption non-covalente de nanoparticules et/ou de molécules (antibiotiques), impliquant parfois des interactions d'empilement π-π.

De nombreux articles présentent l'association de NMCs avec des nanoparticules d'argent (AgNP) pour améliorer leurs propriétés antimicrobiennes (tableau 1) [20,53,133,155–157]. L'utilisation des AgNPs est répandue du fait de leurs propriétés antibactériennes et antivirales intrinsèques. L'activité antibactérienne de l'argent provient des ions Ag^+ mais l'utilisation de nanoparticules d'Ag provoque une action plus puissante que lors d'une exposition directe à ces ions car si l'entrée de ces derniers dans les cellules peut être empêchée par certains mécanismes de défense, rien ne bloque la pénétration des nanoparticules qui peuvent ensuite se dissoudre directement dans le cytoplasme et libérer des ions Ag^+ là où rien ne peut empêcher leur diffusion. Les ions Ag^+ peuvent alors réagir avec

l'ADN ou les protéines et provoquer la mort cellulaire, et l'adhérence des AgNPs sur les microbes est susceptible d'induire la génération de ROS [158,159].

Les nanoparticules d'argent peuvent également interagir avec la surface de virus et inhiber leur activité. C'est cas du virus VIH-1 par exemple. L'extérieur de ce virus est composé d'une membrane lipidique comprenant des glycoprotéines de surface. Leur fonction principale est de se lier aux sites récepteurs de cellules hôtes. Ces glycoprotéines sont accessibles aux nanoparticules et des interactions peuvent se former, ce qui empêche le virus de se lier eux cellules hôtes [160]. L'association de nanoparticules d'argent avec des nanomatériaux carbonés peut améliorer leurs propriétés antimicrobiennes. En effet un nanocomposite GO-Ag est mentionné comme ayant un meilleur effet inhibiteur sur le virus du syndrome reproducteur et respiratoire porcin (PRRSV) que les nanoparticules Ag et GO seules [161]. L'activité antimicrobienne des AgNPs dépend fortement de leur taille et de leur dispersibilité [162,163]. La grande surface spécifique des NMCs assure une bonne dispersion des AgNPs lors du greffage [52,133,158] et, de plus, des procédés de synthèse sur les NMCs ont été développés pour contrôler la taille des AgNPs, assurant une activité antimicrobienne renforcée [158].

La littérature mentionne également la fonctionnalisation des NMCs avec d'autres métaux ou leur oxyde correspondant pour améliorer leurs propriétés antimicrobiennes (tableau 1) [164]. La fonctionnalisation avec des métaux peut aussi permettre de modifier les propriétés électriques des NMCs [165,166]. En effet, selon la littérature le dépôt de graphène sur du Ge dopé p est capable d'attirer les électrons de la chaîne respiratoire d'un microorganisme [167]. Cette action combinée à la production de ROS des nanomatériaux conduit à la mort des cellules. De plus, l'effet antimicrobien d'ions métalliques associés aux NMCs est identifié [168]. Par exemple l'étude d'une éponge de graphène recouverte d'ions Cu a montré une amélioration de l'activité antimicrobienne [169]. Les ions Cu sont capables d'interagir avec l'ADN et d'interrompre sa réplication [170], entraînant la mort du microorganisme.

Tableau 1: NMCs antimicrobiens fonctionnalisés avec Ag [59]

Materials	Mechanism	Test	Microorganism	Application	ref
G-Ag	Not described	Minimal inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)	*E. coli ;* *S. aureus*	To provide a reference to synthesize size-selected Ag NPs-based materials using the thermal annealing method.	[162]
RGS-Ag *Aminophenol grafted and Ag NPs decorated graphene nanocomposites*	Synergistic effect: -GO: ROS production -Aminophenol: phenolic group action (protein denaturation and cell membrane destruction) -Ag: ions release.	OD, Colony counting	*E. coli ;* *S. aureus*	Antibacterial agent for broad range of antibiotics.	[52]
GE-Ag *Graphene-based silver nanoparticles*	~inhibition of protein translation	OD, MIC, MBC, Proteomic analysis	*P. aeruginosa*	Not described	[53]
GO-Ag	GO: wrapping + block nutrient access + enhances Ag/bacteria contact Ag: membrane disruption, chemical interaction with	Colony counting	*S. typhi* *E. coli* *S. aureus* *S. epidermidis*	Food packaging and wound dressing applications	[171]

	bacteria components (sulfur; phosphor…) + Ag ions release (impact on respiration and replication).				
GO-Ag	~AgNPs: membrane damage + Ag ions release *GO: adsorption of bacteria; Dispersion/ Stabilization of Ag*	Colony counting Fluorescence SEM	*E. coli*	Applications of environmental engineering and other fields; Anti-biofouling agents in the water treatment industry	[172]
GO-Ag	AgNPs effect GO: wrapping + block nutrient access + bacteria adsorption + enhances Ag/bacteria contact	Colony counting TEM	*E. coli*	Applications beyond water purification	[173]
GO-Ag	Ag ions: interactions with DNA, proteins… respiratory inhibition, ROS production and cell damage	Inhibition zone OD (growth kinetics)	*E. coli* *P. aeruginosa.*	Applications in biological area as well as materials science.	[174]
rGO-Ag	Not described	Colony counting	*E. coli* *L. anguillarum* *B. cereus* *S. aureus*	Applicability in bioengineering and other fields	[175]
CNT-Ag	AgNPS: Effect of Ag+ ions CNMs: improve Ag colloidal stability	Fluorescence, Inhibition Zone, Optical Density (OD),	*E. coli ;* *S. aureus*	Biomedical implants or biological devices.	[158]
MWCNT-COOAg	Not described	OD	*E. coli*	Antibacterial controlling systems.	[176]
MWCNTs-Ag	~Ag+ release (no direct contact)	Colony counting SEM	*E. coli* *S. aureus.*	Design of low fouling self-cleaning membranes with a high degree of performance durability and commercial scalability.	[177]
SWCNTs-Ag	~AgNPs: Interaction with bacteria components (proteins, …) + ions release (DNA damage, respiratory chain inhibition…) *SWNTs : Ag dispersion*	Inhibition zone	*S. aureus* *E. coli*	Antibacterial fabric for textile industries	[178]
CNT-Ag	Not described	OD Colony counting	*E. coli*	Not described	[179]

L'association de NMCs avec des oxydes métalliques permet aussi de lutter contre des microorganismes [20], ainsi des exemples de nanocomposites graphène-ZnO [180,181], ou de nanotubes fonctionnalisés avec du ZnO sont présents dans la littérature [182]. Le graphène-ZnO présente une activité antimicrobienne renforcée par rapport au graphène seul [183], le composite provoque la mort des cellules par interaction avec leurs protéines [54] et présente une activité de longue durée grâce au graphène qui ralentit la dissolution du ZnO [55,184]. De nombreux autres

exemples peuvent également être trouvés, comme des NMCs combinés avec CuO [170,185], SnO_2 [186,187], Co_3O_4 [188,189], WO_3 [190] ou PbO [191].

Tableau 2 : CNM antimicrobiens fonctionnalisés avec des composés métalliques [59].

Materials	Mechanism	Test	Microorganism	Application	ref
Fe-G *magnetic graphene (SMG)*	Direct contact +Oxidative stress +Charge transfer	Colony counting Fluorescence	*E. Coli*	adsorbent for safe drinking water	[164]
G-Cu; Ge; SiO_2 *Monolayer graphene film on Cu; Ge and SiO_2*	G-Cu; G-Ge Direct contact; Charge transfer; ROS G-SiO_2: no antibacterial activity	Fluorescence Colony counting SEM	*S. aureus;* *E. coli*	Biomedical applications; graphene-based antibiotics	[192]
G-Ge	~phospholipids disturbance + charge transfer	Fluorescence, SEM	*S. aureus;* *E. coli*	Biomedical device.	[167]
GS-Cu *Graphene sponge decorated with copper nanoparticles*	Direct contact/ cell penetration; ROS; Cu ions release	Colony counting Inhibition Zone	*E. coli*	Novel Bactericidal filter	[169]
G-ZnO-C.C.M *Graphene Decorated Zinc Oxide and Curcumin (C.C.M)*	Physical damage	MIC Inhibition Zone Fluorescence CFU SEM Biofilm	*S. aureus*	New treatment methodology against M.R.S.A.	[180]
G-ZnO	Photocatalytic activity	Colony counting	*E. coli*	Environmental applications; biosensors, photocatalysts, disinfectants, solar cells, *etc.*	[183]
G-ZnO (NRs) ZnO nanorods (ZnO-NRs) decorated graphene nanoplatelets	Protein and phospholipid damages	SEM FTIR Colony counting Evaluation of biofilm formation	*S. aureus* *P. aeruginosa*	biocompatible materials for antimicrobial applications without toxic compounds release. releasing toxic	[54]
G-ZnO-Si	Not described	OD	*E. coli*	waste water treatment	[184]
G-SnO2	G: direct contact/ nutrient access blocking/ wrapping of the bacteria G/SnO_2: Adhesion to the bacteria; cells-blocking nutrient access (better interaction than G alone)	OD Colony count TEM	*P. aeruginosa* *S. aureus*	environmental and clinical applications.	[186]
G-SnO2	Synergistic effect ROS production + cell membrane penetration	Inhibition Zone MIC	*P. aeruginosa*	disinfectant and sanitation industry	[187]
GO-ZnO	GO: slows ZnO dissolution and improves dispersion	Inhibition Zone OD SEM	*E. coli* HeLa cell (cancer cell)	Disinfection materials for medical devices.	[55]

	and contact with bacteria, ZnO action	Plasma mass spectrometry for Zinc release measurement			
GO-Ni, Zn, Sn, steel Graphene Oxide on Metals	Metals improve the electrical conductivity of graphene: GO-metal attract electrons from bacterial respiratory pathway and generate ROS Antibacterial activity: GO-Zn> GO-Ni> GO-Sn> Go-Steel	Colony counting Fluorescence ROS production analysis FESEM	*E. coli*	Environmental and biomedical applications.	[165]
GO-CuNPs	Physical interactions	MIC SEM	Fungi: C. albicans	Antifungal reagents; biomedical dressings; medical devices	[168]
GO–Cu NPs Graphene oxide loaded with copper oxide Nanoparticles	-Wrapping; -Cell penetration; -Reaction with cell components; -ROS	Inhibition Zone MIC	*P. syringae*	Management of crop diseases	[170]
GO-ZnO	Charge transfer; ROS	MIC Fluorescence ROS production level SEM	*E. coli* *S. typhimurium*	Super-capacitance, biosensors, and disinfectants	[181]
rGO-Co3O4 nanocomposites	Co_3O_4: X rGO: X rGO/Co_3O_4 : Antibacterial activity attributed to the rGO with Co304 structure (2D)	Inhibition zone	*E. coli*	Biomedical applications	[188]
rGO-Au, rGO-Ag, rGO-Pd, rGO-Fe_3O_4, rGO-Co_3O_4, rGO-SnO_2 six reduced graphene oxide (rGO) nanocomposites	Activity linked to the functionalized element type and the specific surface area	Generation test	Daphnia magna	Not described	[189]
rGO-WO_3 composite	Photocatalytic degradation ~electrostatic interaction; ~ions release (which interact with proteins).	Inhibition Zone	*B. subtilis* *P. aeruginosa*	photocatalytic and antibacterial material.	[190]
rGO-PdO *(undoped and Au doped)*	Cell wall damage	Colony counting	*E. coli* *S. aureus*	Tetrodotoxin (TTX) degradation	[191]
MWCNTs-ZnO	ZnO action	OD Colony counting MIC Fluorescence	*E. coli*	antimicrobial material inactivating pathogenic bacteria	[193]
CNT-Cu nanostructures	interaction with cell components (proteins, nucleic acids …) + Physical damage.	Inhibition Zone	*E. coli;* *S. aureus*	Not described	[185]

Il est possible d'apporter des propriétés photocatalytiques aux NMCs par association avec un agent photocatalytique (tableau 3). Un composé photocatalytique peut produire des ROS sous irradiation lumineuse et peut donc détériorer les microorganismes via un stress oxydatif. Comme déjà discuté, les CMNs présentent une activité photothermique, une bonne conductivité électrique et produisent facilement des électrons photo-induits ; ainsi les NMCs sont de bons matériaux pour la fonctionnalisation photocatalytique [163,194].TiO_2 est un agent photocatalytique connu qui est utilisé pour former des composites à base de NMCs présentant une action antimicrobienne sous irradiation solaire [195–202] [125]. La littérature rapporte également des NMCs fonctionnalisés avec d'autres photocatalyseurs tels que ZnO [203–205], CdS [206,207], MnS_2 [208], WO_2 ; WO_3 [209], Cu_2O [210], Ag_3PO_4 [211], g-C_3N_4 [212].

Tableau 3: NMCs antimicrobiens fonctionnalisés avec des composés photocatalytiques [59].

Materials	Mechanism	Test	Microorganism	Application	ref
G-TiO_2	Photocatalytic degradation under ambient visible light irradiation	Colony counting	*E. coli*	Indoor air disinfection	[196]
G-TiO_2	G: increased contact between NPs and cells Photocatalytic degradation under UV and solar light irradiation	~Colony counting	*E. coli;* *S aureus* Fungi: Candida albicans	Ideal electroconductive, self-cleaning, antibacterial and antifungal cotton fabric	[199]
G-CdS	Photocatalytic degradation under visible light irradiation Physical contact Oxidative stress	Colony counting Metabolic activity assay	*E. coli*	in environmental water fields.	[207]
G-WO_3 *Graphene–Tungsten Oxide Composite*	Photocatalytic degradation under visible light irradiation	-Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDSP) electrophoresis method to measure the viruses proteins photodegradation -Viruses protein damage measurement - RNA Efflux of Viruses measurements	*bacteriophage MS2 viruses*	*Impact on bio-organisms of our environment*	[209]
GO-TiO_2	Photocatalytic degradation under solar light irradiation	Colony counting	*E. coli*	nanocomposite photocatalysts	[195]
MGO–TiO_2 *Magnetic graphene oxide–TiO_2 Composites*	Photocatalytic degradation under solar light irradiation	Colony counting	*E. coli*	Water disinfection treatment	[197]
GO-ZnO	Photocatalytic degradation under natural solar light illumination	Fluorescence Colony Counting	*E. coli*	wastewater treatment and environmental protection	[205]
GO–Ag_3PO_4	Enhanced photocatalytic degradation under visible light irradiation GO enhances contact between Ag3PO4 and bacteria	Antibacterial test: -colony counting -SEM Photocatalytic activity: -degradation of dye A07 and phenol visible-light irradiation	*E. coli* organic dye (AO7)	Environmental and water treatment	[211]

	Ag+ effect				
GO-g-C_3N_4	Photocatalytic degradation under visible light irradiation GO: suppress electron-hole pairs recombination	Fluorescence Plate count method SEM TEM	*E. coli*	sterilizing agent for treating microbial-contaminated water	[212]
GO–CdS	Photocatalytic degradation and disinfection activities under visible light irradiation Excellent activity may be due to -charge transfer from CdS to GO to reduce the recombination rate of photo-generated electron–hole pairs; -better dispersion of CdS on GO -Strong interactions that induce durability	Colony counting	*E. coli* *B. subtilis*	Photodegradation and disinfection fields	[206]
rGO- Cu_2O *Cu_2O nanocrystal–reduced graphene oxide hybrid*	Photothermal degradation under NIR light irradiation Photocatalytic degradation under visible light irradiation	In vitro cytotoxicity measurement: methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay	HK-2, MDA-MB-231, and A549 cell lines.	Cancer therapeutic agent	[210]
rGO-ZnO	Photocatalytic degradation under ambient visible light illumination	Colony counting	*E. coli*	bactericidal nanomaterial	[204]
rGO-TiO_2	Photocatalytic degradation under artificial solar light irradiation	Colony counting	*E. coli*	Not described	[198]
rGO-MnS_2 nanohybrids	Not described	Minimum inhibitory concentration (MIC) Minimum bactericidal concentration (MBC)	*E. coli*	waste water treatment and others bioremediation processes.	[208]
C NFs-TiO_2 *C nanofibers-TiO_2*	Photocatalytic degradation under UV irradiation	dye degradation experiments	dye	waste water purification	[201]
MWCNT–ZnO nanocomposite thin films	Photocatalytic degradation under ambient visible light irradiation Photoinactivation enhancement attributed to charge transfer	Colony counting	*E. coli*	Not described	[203]

La fonctionnalisation de NMCs avec des antibiotiques a également été étudiée (tableau 4). L'utilisation de NMCs présentant des mécanismes d'action différents de ceux des antibiotiques leur

permet de s'affranchir du problème de développement de résistance de certains microorganismes comme *E. coli* ou *S. aureus*. La conjugaison de NMCs et d'antibiotiques produit un composite ayant une activité antibactérienne accrue par rapport à ses constituants individuels [213–215]. L'association de GO et de tétracycline (TET) est mentionnée comme améliorant l'interaction entre la substance antibiotique et le microorganisme [216]. Deux modes de contact induits par le graphène oxydé ont été observés, comme que l'enroulement du nanocomposite sur les bactéries résistantes. La concentration importante de tétracycline sur le GO et le contact direct avec la cellule ne permettent pas aux gènes codants les pompes d'efflux responsables de la résistance aux antibiotiques d'éjecter le TET de la cellule. Un nanocomposite CNT-lysine présente aussi une meilleure activité antimicrobienne que ses homologues seuls, où le mécanisme de contact direct du nanotube de carbone, permet à l'antibiotique de diffuser dans la cellule et d'éviter un rejet de la part du microorganisme [217].

L'utilisation de NMCs comme substrat pour augmenter la dispersion et la stabilité des antibiotiques a aussi été considérée. Par exemple, le composite SWNT-ciprofloxacine a montré une bonne dispersion et stabilité pendant plus de 6 mois [218]. De plus, la fonctionnalisation des NMCs avec des antibiotiques permet un meilleur contrôle de la libération de la substance [219] et donc la possibilité d'utiliser des quantités plus faibles. C'est également le cas de l'agent antiviral hypéricine HY, qui est utilisée contre plusieurs rétrovirus tels que HSV-1, le virus Sendai et l'hépatite B du canard, lorsqu'il est ajouté sur du GO. Cette association permet d'augmenter l'efficacité de l'hypéricine grâce sa libération plus lente et ainsi la diminution de son effet cytotoxique [125]. De même des nanotubes multi-parois conjugués à un agent antiviral CHI360 ont montré une activité antivirale élevée contre le virus VIH contrairement aux MWNTs vierges grâce à leur stabilité et leur dispersibilité améliorées [220].

Tableau 4: NMCs antimicrobiens fonctionnalisés avec des composés antibiotiques [59].

Materials	Mechanism	Test	Microorganism	Application	ref
GPH-CF *Graphene Oxide-Polyethyleneimine Hybrid Film containing Ciprofloxacin*	Antibacterial activity due to CF release and diffusion	Inhibition zone Colony counting	*E. coli*	Biomedical	[213]
GOGD *Graphene oxide as a nanocarrier for gramicidin*	Cell morphology destruction G: direct contact and ROS GD effect	Colony counting, OD TEM Fluorescence (2D, 3D) and matrix assisted laser desorption/ ionization mass spectrometry (MALDI-MS).	*P. aeruginosa* *S. aureus*	Biomedical	[214]
GO-LSZ *graphene oxide sheets and lysozyme*	Effect of Lysozyme	SEM	*B. subtilis*	Not described	[219]
GO-TET *graphene oxide-tetracycline composite*	Not described	MIC MBC	*S. aureus*	Formulations of antibiotics with GO.	[216]
MWCNTs-Arg MWCNTs-Lys *Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) functionalized by arginine and lysine*	Antibacterial activity: MWCNTs-arginine > MWCNTs-lysine > pristine MWCNTs ~electrostatic adsorption of cell membrane caused by the charged functional groups	MIC Inhibition zone	*E. coli* *S. aureus* *S. typhimurium*	Disinfection industry.	[215]

MWCNTs-Lys *Multi-walled carbon nanotubes functionalized with lysine*	Antibacterial activity: CNTs lysine > pristine CNTs ~electrostatic adsorption of cell membrane caused by the charged functional groups	MIC	*E. coli,* *S. typhimurium* *K. pneumonia* *S. agalactiae, S. aureus S. dysgalactiae*	Not described	[217]
SWCNTs-ciprofloxacin Single-walled carbon nanotubes functionalized with multiple molecules of ciprofloxacin.	SWCNTs increases contact between bacteria and ciprofloxacin Impact on bacteria efflux pump.	Inhibition zone MIC	*S. aureus* *P. aeruginosa* *E. coli*	In vivo applications.	[218]

Enfin, de nombreux exemples de NMCs fonctionnalisés simultanément avec différents composés pour encore améliorer les propriétés du nanocomposite sont connus (tableau 5). Plusieurs métaux ou oxydes peuvent être utilisés, il existe des exemples de fonctionnalisations bimétalliques de NTCs présentant une meilleure activité que des nanocomposites à base de métal unique [221–223]. L'association de graphène avec des nanoparticules de Cu et d'Ag a présenté une amélioration de l'activité antimicrobienne du composite grâce à l'action synergique des métaux sur le support graphène [224].

Il est également possible d'optimiser l'action photocatalytique des NMCs [225–227]. La littérature mentionne l'activité de dégradation photocatalytique des SWNT fonctionnalisés avec Cu et TiO_2 pour la décontamination des eaux usées pharmaceutiques [228]. Les effets combinés du TiO_2 comme agent photocatalytique et du Cu en tant qu'agent antimicrobien ont amélioré l'activité photocatalytique globale. L'association de GO et de TiO_2 permet d'obtenir une activité antivirale contre le virus bactériophage MS2 sous irradiation aux rayons UV. Le composite oxyde de graphène réduit sulfoné avec des nanoparticules de fer magnétique greffées inactive efficacement le virus Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) après 10 minutes sous irradiation de lumière NIR [125].

L'association avec un polymère est un autre moyen d'améliorer l'activité antimicrobienne des NMCs [229–231]. Une étude a ainsi présenté un nanocomposite composé de nanotubes de carbone multi-parois, oxide de zinc et poly(chlorure de vinyle) ayant des propriétés antimicrobiennes et de biocompatibilité accrues en raison des effets synergiques des différends composants [232].

Table 5 : NMCs antimicrobiens fonctionnalisés avec des composés associés [59].

Materials	Mechanism	Test	Microorganism	Application	ref
G-Ag-Cu *Ag/Cu Bimetallic Nanoparticle–Graphene Composites*	Ag and Cu metallic particles synergistic effect; ions release increase G: oxidative + physical stress; Good support with uniform and homogeneous distribution that facilitates contact between metallic components and bacteria	Growth inhibition assay: Colony counting (serial dilutions) spectrophotometric absorption assay (Synechococcus)	*E. coli* *unicellular cyanobacterium Synechococcus*	Antimicrobial agents	[224]
G-Ag_3PO_4-TiO_2	Photocatalytic degradation under	MIC MBC	*E. coli* *S. aureus*	environmental protection and	[227]

	visible light irradiation	Colony counting TEM	*S. typhi* *P. aeruginosa* *B. pumilus*	water disinfection.	
G-Fe-Ag *Graphene supported FeAg bimetallic nanocomposites*	~Membrane and oxidative stress	Colony counting Detection of superoxide radical specie (•O2−) and thiol oxidation and quantification	*B. subtilis* *E. coli* *S. aureus*	Not described	[222]
Ag-Fe_2O_3-GO	GO: slows down AgNPs release	OD Ag+ Ions Release Rate Evaluation.	*E. coli*	long-term bactericide with suppressed environmental hazard	[223]
GO-TiO_2-Ag	Photocatalytic degradation under irradiation AgNPs effect ~Ag prevents electron-hole pairs recombination	Colony counting	*E. coli*	water purification	[225]
GO-CS-TiO_2 *Graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO_2*	Cell rupture Direct contact	Colony counting Inhibition Zone OD Fluorescence SEM	*Fungi:* *A. niger and B. subtilis*	Antimicrobial coatings for food preservation.	[226]
CNFs-Cu-Zn *Copper/zinc bimetal nanoparticles-dispersed carbon nanofibers:*	Zn NPs: fast release; antioxidant action Cu NPs: slow release; antibacterial action Cu/Zn-CNFs: enhanced activity; Physical disruption	Colony counting MIC MBC Fluorescence	*E. coli ;* *S. aureus*	Biomedical applications such as wound healing and antibiotic wound dressing	[221]

Ces différents exemples de fonctionnalisation de NMCs pour une application antimicrobienne mettent en évidence les effets synergiques de tels nanocomposites. Malheureusement, cette approche n'a été validée qu'en suspension, et non après immobilisation de ces matériaux en surface. Même si l'amélioration de la dispersion des composés antimicrobiens offerte par les NMCs peut être transposée à la surface des matériaux, la question de la durabilité de l'action n'est généralement pas résolue du fait de la nécessité du relargage de la substance antimicrobienne présente sur les NMCs (dissolution d'ions métalliques, libération de molécules antibiotiques). Les propriétés photocatalytiques des NMCs associés à un agent photocatalytique constituent une exception.

Enfin, les propriétés antimicrobiennes des NMCs pourraient également intervenir en cas de contact avec des cellules humaines ou animales, ce qui interroge sur la balance entre bénéfices (activité antimicrobienne) et risques (toxicité / impact environnemental) [17,19,56]. De nombreuses études ont été menées pour déterminer la toxicité potentielle des NMCs, néanmoins il est difficile d'en tirer des conclusions générales. En effet, la comparaison des études est délicate car, comme évoqué précédemment, les effets biocides des nanoparticules dépendent de nombreux éléments, comme l'environnement ou leurs paramètres physico-chimiques [154]. Les relations entre ces différents éléments et l'activité biocide ayant lieu doivent être étudiées pour pouvoir évaluer la toxicité des nanoparticules.

Même si le danger n'est pas toujours démontré, des solutions pour éviter ce problème ont été étudiées, la plus évidente étant leur inclusion dans des nanomatériaux composites pour limiter le relargage et la toxicité associée.

I.7. Surfaces antimicrobiennes

I.7.1 Matériaux à base de nanoparticules de carbone

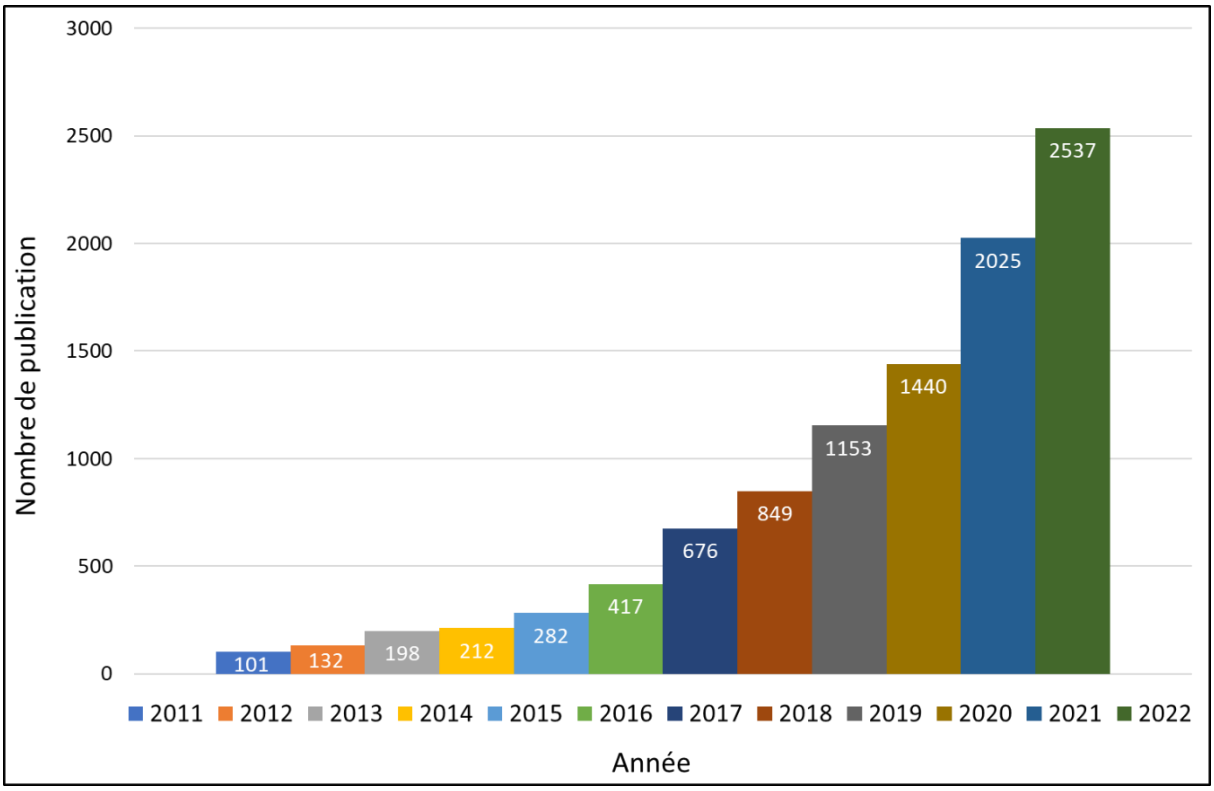


Figure I.6 : Nombre de publications de la base de données “Scopus” portant sur des composites antimicrobiens à base de nanomatériaux carbonés entre 2011 et 2022. Mots clefs de recherche*: (antimicrobial AND ((“carbon nanoparticles”) OR (“carbon nanomaterials”) OR nanodiamonds OR fullerene OR graphene OR (“graphene oxide”) OR (“carbon nanotube”)) AND composite)*.

Ces 10 dernières années, le développement de composites à base de nanomatériaux carbonés pour des applications antimicrobiennes a reçu une attention scientifique croissante, comme illustré sur la Figure I.6. De nombreux exemples de matériaux polymères associés à des nanoparticules de carbone sont mentionnés dans la littérature pour leurs applications antibactériennes et antivirales [233,234].

En 10 ans, le nombre de publications concernant les composites antimicrobiens contenant des nanomatériaux de carbone a progressivement augmenté. Nous avons constaté que l'activité dans ce domaine a commencé en 2011 et n'a pas beaucoup évolué jusqu'en 2014, date à laquelle elle a commencé à croître régulièrement pour atteindre 2537 publications en 2022. Cela peut s'expliquer par l'accès de plus en plus facile aux nanomatériaux carbonés au cours de la dernière décennie, et le besoin croissant de nouvelles stratégies de lutte contre les microorganismes.

L'inclusion de nanoparticules dans les matériaux composites permet à un matériau entier de bénéficier des propriétés avantageuses des nanoparticules tout en évitant le problème potentiel de toxicité grâce à la matrice les piégeant et empêchant leur libération. Il apparaît donc intéressant et

prometteur d'étudier le transfert des propriétés de ces particules à un matériau massif suite à leur incorporation dans une matrice car ces matériaux trouvent de nombreuses applications, notamment dans le domaine médical avec la fabrication de dispositifs médicaux implantables ou de textiles antimicrobiens. Étant donné que les interactions entre les agents pathogènes et le matériau ne se produisent qu'en surface, il semble inutile de disperser les NMCs au sein de la matrice, ce sujet sera abordé plus en détail ultérieurement.

Dans le contexte actuel de crise sanitaire mondiale due à la propagation de la COVID 19, des études soutiennent le potentiel d'utilisation des nanomatériaux carbonés pour combattre le SARS-CoV-2 [89]. Un article mentionne qu'après pré-incubation du virus avec du GO, l'infection de cellules VERO par le SARS-CoV-2 a été inhibée [48]. L'incorporation du graphène et du graphène oxydé dans des textiles a été mise en avant pour limiter la prolifération de la COVID 19. La littérature mentionne que lorsque du polyuréthane ou du coton fonctionnalisé avec du graphène/GO était en contact avec le SRAS-CoV-2, l'infectiosité du tissu était presque complètement inhibée [88].

Le graphène a été mis en avant avec par exemple le développement de masques respiratoires à base de graphène commercialisés par plusieurs sociétés. Parmi eux IDEATI[1] propose un masque en coton avec dépôts de graphène et d'autres nanomatériaux de carbone, qui est réutilisable et affiche des propriétés antibactériennes. Bioserenity[2] propose un masque réutilisable de 4 couches dont une contenant du graphène et censée afficher des propriétés antivirales. Dezeen[3] a développé un système où le graphène contenu dans le masque est capable de conduire l'électricité afin de produire des charges et de repousser les particules piégées. Ainsi, le graphène est devenu très intéressant pour la recherche médicale et l'industrie comme moyen de limiter la prolifération de la COVID 19 au sein de la population [235]. Les applications sont principalement dans le domaine médical [29,79,86,88–90,125], mais aussi le domaine environnemental avec de nouveaux filtres pour la purification de l'eau [76,236,237] ou dans l'industrie alimentaire avec des emballages alimentaires [84,126,238,239] par exemple. De plus, une étude de 2021 présente également l'incorporation de nanotubes de carbone dans des masques respiratoires pour lutter contre la propagation de virus, que ce soit le SARS-CoV-2 ou le virus de la gastro-entérite transmissible, le virus de l'hépatite, etc. [148] Certains NMCs (nanotubes de carbone et graphène, oxydés ou non) sont favorisés dans l'élaboration de matériaux nanocomposites antimicrobiens. Ceci peut être lié à la disponibilité de ces matériaux, les NTCs devenant plus faciles d'accès avec la diminution de leur coût. Cette sélection peut également résulter de leurs propriétés intrinsèques différentes. La littérature décrit le GO comme le plus facile à manipuler parmi tous les autres NMCs en raison de sa plus grande dispersibilité, en particulier dans l'eau grâce à ses fonctions oxygénées de surface [240,241], tandis que le FLG est plutôt difficile à disperser correctement. La dispersibilité du GO facilite les interactions particules/ microorganismes et accroît l'activité antimicrobienne. Dans l'ensemble, le GO apparaît comme le nanomatériau carboné le plus étudié parmi tous les nanocomposites antimicrobiens à base de NMCs, suivi par les NTCs.

Les différents types de composites à base de polymères contenant des NMCs sont présentés sur la Figure I.7 selon leur méthode d'élaboration et leur action antimicrobienne. Cette figure illustre les différentes situations possibles que nous avons identifiées.

[1]planarTECH Graphene Facemask, https://planartech.co.uk/.
[2]BioSerenity, https://www.bioserenity.com/.
[3]Dezeen, https://www.dezeen.com/tag/graphene/.

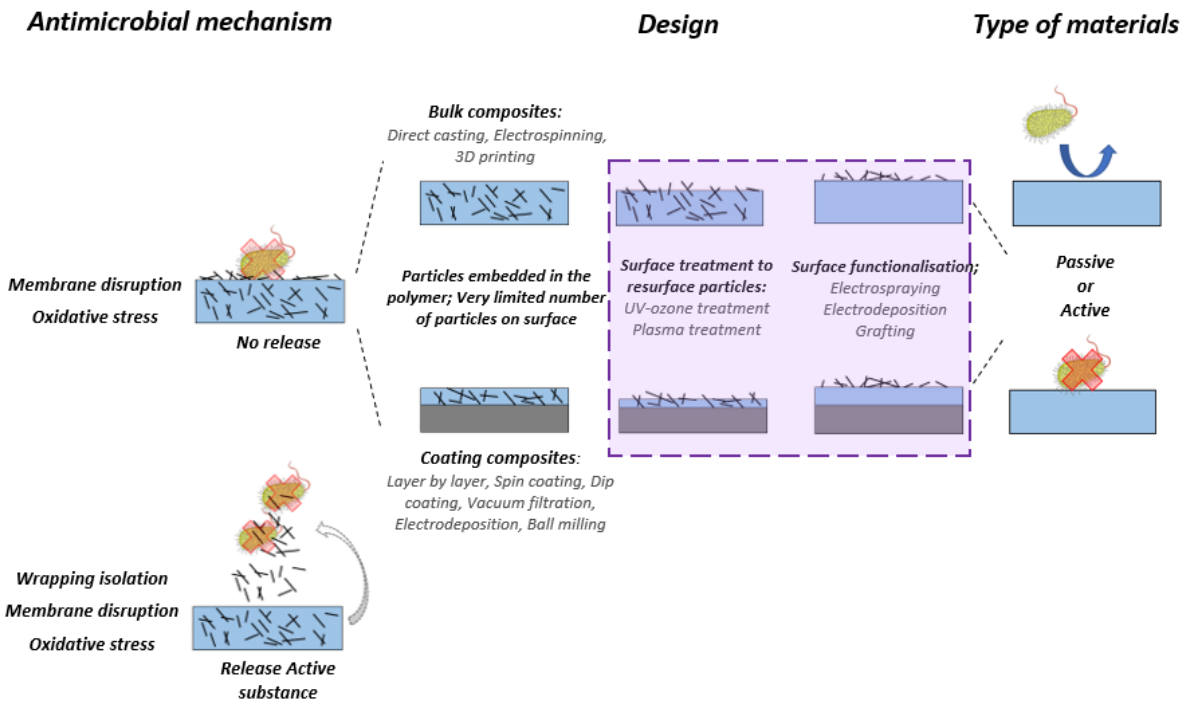


Figure I.7 : Schéma illustrant les actions antimicrobiennes des composites à base de nanomatériaux carbonés selon leur méthode d'élaboration. La voie passive correspond à la prévention d'adhésion bactérienne (pas d'endommagement des bactéries), tandis que la voie active mène à la mort bactérienne. L'encadré met en valeur différentes méthodes d'élaboration qui permettent d'obtenir des composites avec des NMCs accessibles en surface [59].

Les voies actives et passives font référence au principal mécanisme d'action de ces matériaux. Dans le cas de la voie passive la surface du matériau permet d'éviter une adhésion microbienne, sans nécessairement endommager l'agent pathogène. Dans le cas de la voie active il y a au contraire des actions antimicrobiennes induisant des effets cytotoxiques conduisant idéalement à la mort cellulaire. La plupart des procédés décrits pour l'élaboration de revêtement composites ou de composites massifs ayant une action antimicrobienne active peuvent également être utilisés pour une action passive.

Nous nous focalisons ici sur les matériaux actifs ne libérant pas de nanoparticules dans le but d'éviter les problèmes liés à la toxicité et à une perte d'activité avec le temps. Différentes situations peuvent être envisagées. La plupart des matrices habituellement mentionnées dans la littérature ne présentent pas de propriétés antimicrobiennes intrinsèques. L'objectif est la dispersion des nanomatériaux dans la matrice afin d'améliorer leur activité tout en les piégeant et en empêchant une libération indésirable. Dans d'autres cas, la matrice peut présenter une activité antimicrobienne, comme décrit en I.3, qui s'associe à celles des NMCs. Enfin, parfois l'ajout de NMCs ne concerne pas leur activité antimicrobienne mais vise uniquement à renforcer mécaniquement une matrice présentant déjà sa propre activité antimicrobienne.

Certains polymères ne présentent pas d'activité antimicrobienne intrinsèque et permettent de piéger les nanoparticules tout en assurant leur dispersion pour transférer l'activité de celles-ci à tout le composite formé. Des matrices biocompatibles sont utilisées pour l'élaboration de composites visant des applications biomédicales, la question de leur stabilité dans les conditions d'utilisation est donc un critère très important car leur biodégradation conduirait au relargage des NMCs [242]. Par exemple, l'agarose est un bon liant [237] et les propriétés biocompatibles ainsi que la faible toxicité du

PVA (alcool poly(vinylique)) en font un candidat idéal pour les applications biomédicales, mais les propriétés de biodégradation de ces polymères doivent être prises en compte [24].

Le polyvinyl-N-carbazole (PVK) a été reporté dans la préparation de matériaux nanocomposites contenant des NMCs bien dispersés, ce qui assure de meilleurs contacts entre les nanoparticules et les agents pathogènes et qui améliore ainsi l'activité antibactérienne [72,236]. Une meilleure activité antibactérienne de surfaces modifiées avec PVK-GO a été mentionnée par rapport à des surfaces modifiées avec GO seul [81]. Une étude présente la puissante activité antivirale du matériau GO-PVP [89].

Au contraire, certains travaux mentionnent l'utilisation de polymères présentant une activité antimicrobienne intrinsèque [243,244]. Le PVA/Chitosane peut ainsi être cité [23], de par sa nature cationique le chitosane est en effet connu pour son action antibactérienne directe [245]. L'incorporation de particules GO a augmenté l'effet antibactérien du matériau, ce qui permet de conclure qu'un effet synergique s'est produit.

De plus, l'incorporation de NMCs peut également améliorer les propriétés générales de polymères, les nanocomposites peuvent ainsi présenter de meilleures propriétés mécaniques et hydrophiles en plus de leurs propriétés antibactériennes [246,247]. Certains articles mentionnent même des composites antimicrobiens contenant des NMCs ajoutés uniquement pour améliorer les propriétés physiques du matériau. L'ajout de MWNTs dans une matrice CS/PLA (PLA : acide polylactique) a en effet été évoqué comme n'impactant que les propriétés mécaniques (traction et flexion) du composite [126].

I.7.2 Méthodes d'élaboration de matériaux à base d'une matrice polymère et de nanoparticules de carbone :

Deux différentes sortes de matériaux nanocomposites peuvent être formées selon la présence des NMCs au sein du matériau ou seulement en surface. L'interface entre les microorganismes et les NMCs se situe à la surface du composite. Ainsi, il semble inutile d'inclure les NMCs dans l'ensemble du matériau. Différentes approches sont utilisées pour élaborer ces composites, certaines méthodes sont spécifiquement utilisées pour développer des nanocomposites massifs tandis que d'autres techniques sont utilisées simplement pour le revêtement de surface. Figure I.8 et la Figure I.9 proposent une classification simple de ces méthodes d'élaboration selon la nature du matériau obtenu, matériau massif ou revêtement de surface respectivement.

Les nanocomposites massifs peuvent être préparés de manière très simple en coulant un solvant (solvent casting) (Figure I.8a). Simplement cela implique le mélange d'une solution polymère avec une dispersion de NMCs. Le liquide résultant est ensuite versé sur un support pour former le matériau final après évaporation du solvant. Selon la quantité coulée cette méthode permet de préparer des nanocomposites massifs [86,90,237,238] ou des films [84]. Une variation de cette technique a été utilisée pour créer un film nanocomposite à partir d'une solution GO/DODA (DODA : dimethyldioctadecylammonium) sur de l'eau. Un tel matériau nanocomposite peut trouver des applications dans le traitement de l'eau ou la conversion d'énergie solaire [85].

Une autre façon d'élaborer des nanocomposites massifs consiste à utiliser la méthode d'électrofilage, ou electrospinning (Figure I.8b). Cette technologie consiste à appliquer une tension électrique sur l'embout d'une seringue contenant une solution polymérique. Une tension opposée est appliquée sur un support placé devant. Le champ électrique créé provoque l'étirement des gouttes de la solution polymérique et la formation de fibres solides lorsqu'elles se déplacent vers la cible. Il s'agit d'un procédé simple permettant la production de fibres de diamètre de quelques nanomètres ayant une surface importante, de bonnes propriétés mécaniques et pouvant être fonctionnalisées facilement

[248]. Cette technique a été mentionnée dans la littérature pour la production de fibres composites contenant des NMCs [23,24,249–251]. En effet cela a été utilisé pour la production en une seule étape de fibres nanocomposites acide polylactique/NTC/chitosane car les NMCs peuvent être inclus directement dans la solution polymérique [126,237]. Les polymères sont sélectionnés en fonction de leurs propriétés intrinsèques en vue de l'application. Par exemple, le polyéthylène oxyde (PEO), l'acide polylactique (PLA) ou l'alcool polyvinylique (PVA) sont faciles à utiliser en électrofilage et sont donc parmi les polymères les plus employés pour développer des nanofibres électrofilés [24]. Une autre méthode récemment développée, appelée impression 3D ou fabrication additive (Figure I.8c), peut être envisagée pour préparer des nanocomposites massifs [252,253]. Dans la plupart des cas, cette technique rapide et précise permet de fabriquer des objets de toute forme souhaitée. L'imprimante 3D crée la structure finale en chauffant un mélange polymère et en l'extrudant couche par couche à travers une buse [254]. Différents travaux ont mentionné des composites imprimés en 3D formés par une matrice polymère contenant du graphène ou des NTCs pour une application biomédicale [26–28,255]. Dans la plupart des cas les tests impliquent des cellules humaines pour confirmer la biocompatibilité des matériaux, mais seules quelques études se sont penchées sur leurs propriétés antimicrobiennes potentielles. C'est cas d'une étude de 2020 sur un matériau fibreux GO/poly(ε-caprolactone) imprimé en 3D dont l'activité antibactérienne contre *S. epidermidis* et *E. coli* a été évaluée [256].

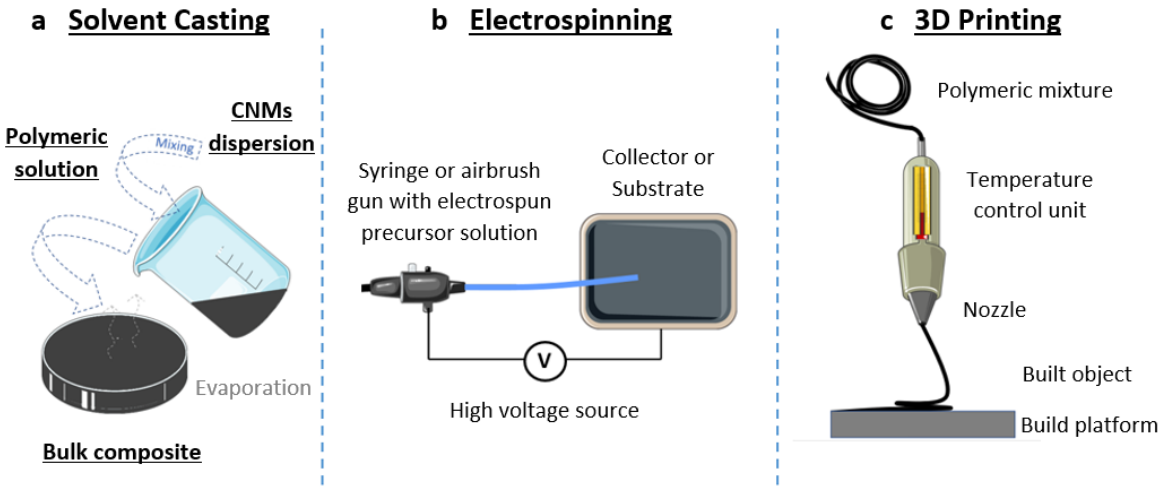


Figure I.8 : Schéma illustrant l'élaboration de composites massifs par a) Coulage d'une solution polymère et évaporation d'un solvant ; b) Electrofilage; c) impression 3D [59].

Les nanocomposites peuvent également être préparés par revêtement d'un substrat. Ceci est particulièrement intéressant pour limiter la quantité de NMCs utilisée tout en obtenant les mêmes propriétés de surface que celles des matériaux massifs. Par exemple la technique de dépôt par centrifugation (Figure I.9a) consiste à verser la solution/suspension de revêtement sur un substrat en rotation. La force centrifuge permet au liquide de former une couche uniforme sur le substrat, le contrôle de la vitesse de rotation permet une maîtrise facile de l'épaisseur du film. Cette technique a été décrite dans la littérature pour la production de nanocomposites à base de NMCs [30,81]. Elle a été utilisée pour déposer une goutte de solution PLGA-SWNT (PLGA : acide polylactique -co- glycolique) sur un substrat propre en verre. Celui-ci était en rotation pour le revêtir du film nanocomposite correspondant [79]. Le revêtement par centrifugation est une technique très simple, rapide et efficace lorsqu'un seul côté d'un matériau doit être modifié. Le revêtement par immersion (dip coating, Figure I.9b) est une autre méthode de revêtement couramment utilisée pour la fabrication de nanocomposites à base de NMCs [29,30]. Le substrat est immergé dans la suspension de matériau de

revêtement puis sorti à une vitesse contrôlée. Des membranes de nitrocellulose recouvertes de PVK-SWNT ont été préparées en utilisant cette stratégie [236]. Contrairement au revêtement par centrifugation, ce processus est relativement lent, avec un contrôle limité de l'épaisseur du film. Cependant, il permet de recouvrir toute la surface d'un substrat en une seule étape.

La filtration sous vide (Figure I.9c) est également mentionnée dans la littérature comme méthode de revêtement. Le substrat est placé de la même façon qu'un filtre sur une installation de filtration sous vide, puis la suspension de revêtement est versée sur le substrat et le processus de revêtement a finalement lieu pendant sa filtration. Des membranes microporeuses SWNT/PVDF (PVDF : Polyfluorure de vinylidène ont été obtenues avec succès par cette technique [78]. De plus, la filtration sous vide permet également de préparer des films nanocomposites, par exemple, au lieu de considérer le filtre comme substrat final, la filtration d'une dispersion GO-PEI/BC (PEI : Polyéthylène-imine ; BC : cellulose bactérienne) a permis d'obtenir des films distincts en forme de disque [257]]. Cette méthode aussi été utilisée pour préparer un papier composé de Tween 20 (Tween 20 : monolaurate de polyoxyéthylène (20) sorbitan) et de rGO. Comme pour le revêtement par immersion, la filtration sous vide est plutôt lente et n'offre pas un contrôle très précis de l'homogénéité et de l'épaisseur du film [112].

Une nanopeinture conçue pour le revêtement d'un matériau peut être préparée en mélangeant simplement des composants ensemble. Une nanopeinture GO présentant à la fois des propriétés antibactériennes et anti-adhésives a été fabriquée via la technologie de broyage utilisant des billes (« ball-milling ») [258]. Cette méthode implique un bol, contenant les composants et des billes de broyage, qui est mis en mouvement pour mélanger facilement les matériaux entre eux. Cependant un inconvénient majeur est l'incorporation possible d'impuretés provenant du bol et/ou des billes [259].

Le dépôt per électrophorèse (EDP) est une autre méthode possible de revêtement d'un substrat (Figure I.9d). Cette technique implique la fixation de particules chargées en suspension, sur une surface de charge opposée sous l'influence d'un champ électrique. Cela présente plusieurs avantages tels que l'obtention d'une bonne homogénéité de surface et un contrôle aisé de l'épaisseur du film. Cette technique a été utilisée pour immobiliser un composite PVK-GO sur un substrat d'oxyde indium-étain (ITO) [72]. Cette technique peut également être envisagée pour appliquer simplement des particules en surface de matériaux. Elle a notamment été utilisée pour déposer du graphène sur de l'acier inoxydable [117].

La méthode d'électropulvérisation (Figure I.9e) est une autre technique, qui peut être considérée comme une variante de la méthode d'électrofilage, mais la tension électrique appliquée sur le liquide contenu dans la seringue entraîne l'émission de petites gouttelettes sur la cible au lieu de fibres. Cette méthode a permis la préparation d'une membrane de polycarbonate d'uréthane avec revêtement GO. Le polycarbonate d'uréthane a été electrofilé pour former une membrane, puis l'éléctrodéposition d'une suspension de GO sur le polymère a permis son revêtement. Cette membrane peut être considérée pour de futures applications biomédicales [70].

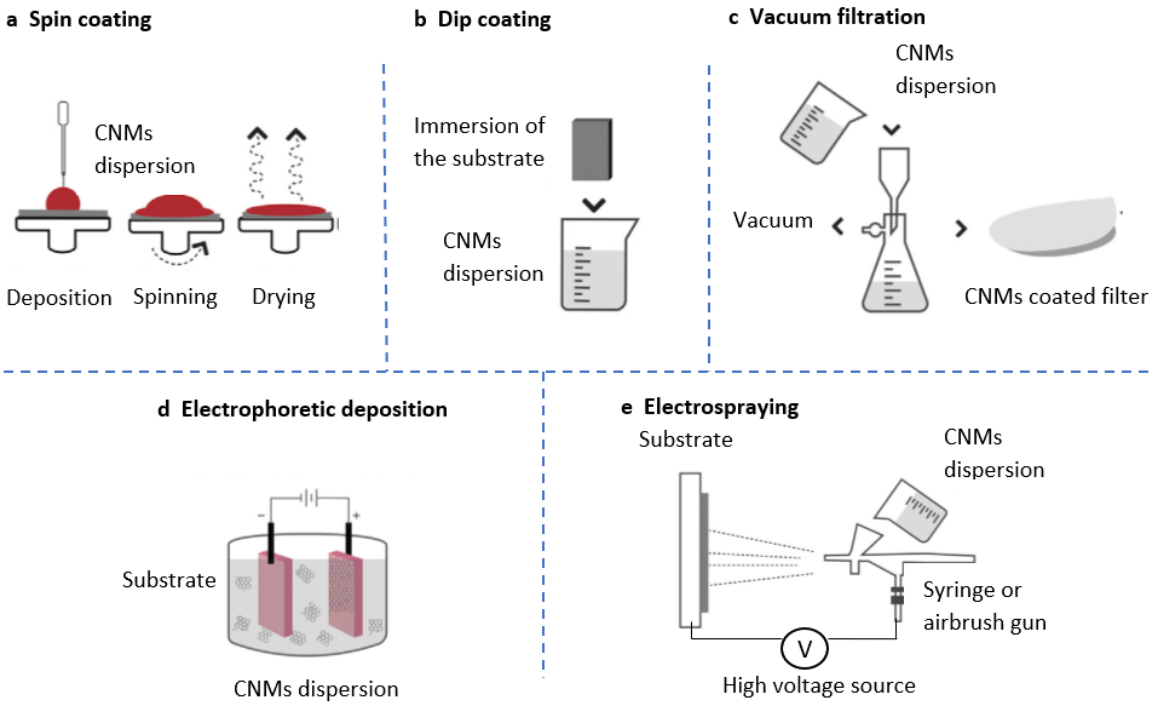


Figure I.9 : Schéma illustrant l'élaboration de surfaces nanocomposites par a) Dépôt par centrifugation; b) Revêtement par immersion; c) Filtration sous vide; d) Dépots par électrophorèse; e) Electropulvérisation [59].

D'autres stratégies ont également été décrites, telles que l'empilement couche par couche (LbL : Layer by Layer) qui implique des interactions électrostatiques [260,261] et la polymérisation radicalaire par transfert d'atome ATRP [262] qui permet de greffer des NMCs sur un matériau et de modifier une surface de façon stable.

Les méthodes de revêtement de surface sont très pertinentes car elles assurent la présence de nanoparticules uniquement en surface du matériau, ce qui permet une interaction directe entre les particules et les microorganismes et qui est donc déterminant en termes d'activité antibactérienne. Ceci est généralement difficile à réaliser avec les techniques d'élaboration de matériaux massifs car les particules sont souvent enfermées dans la matrice polymère et ne sont donc pas directement disponibles en surface. Le tableau 6 présente différents exemples issus d'articles publiés entre 2008 et 2022 de composites contenant des NMCs. Ce tableau détaille pour chaque cas la technique de fabrication utilisée, si la matrice a un effet antimicrobien intrinsèque, si le mécanisme antimicrobien du composite est connu, le test antimicrobien utilisé ainsi que le ou les microorganismes testés, et enfin l'application proposée. On remarque que la plupart des études ont associé l'activité biocide au mécanisme de contact direct entre les nanoparticules de carbone et les microorganismes.

Par conséquent, il est particulièrement important d'élaborer des composites avec des particules en surface. Il serait alors avantageux de trouver des techniques permettant aux particules d'affleurer même si elles sont initialement noyées dans une matrice polymère. Un exemple de traitement par oxydation UV/O_3 sur des feuillets de GO, qui a permis de retirer du polymère en surface (méthacrylate de 2-hydroxyéthyle HEMA) et de rendre possible un accès direct aux nanoparticules, a été rapporté [31]. L'ablation laser a également été utilisée afin de faire affleurer des particules GO incluses dans une matrice d'agarose [32]. L'impulsion laser a induit une liquéfaction et un transport de matière qui ont permis de dégager les nanoparticules. Cependant une recherche approfondie n'a pas encore été effectuée dans ce domaine et il faut souligner que l'évaluation de l'absence ou présence

d'une très fine couche de polymère à la surface de nanomatériaux carbonés est difficile à réaliser. Les idées générales introduites ici, avec une classification de ces différentes méthodes, sont résumées sur la Figure I.7. Les méthodes pouvant être utilisées pour élaborer un composite avec des nanoparticules en surface sont regroupées et encadrées.

Table 6: Exemples de composites à base de NMCs provenant d'articles publiés entre 2008 et 2022 [59].

~: pas de tests qualitatifs (déduction de la littérature)
/: Pas de propriétés antimicrobiennes
X: Pas d'informations

Bulk composite-Mixing-Direct casting						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
G-PVA	/	~Physical damage and/or Oxidative Stress	Colony counting Absorbance (MTT)	Biomedical	*S. aureus* *E. coli*	[86] 2016
GO-DODA	antibacterial	Not described	Fluorescence (SYTO 9 – PI) SEM	Environment (solar harvesting devices) and biomedical	*P. aeruginosa* *E. coli*	[111] 2016 [85] 2013
GO-AG (agarose)	/	~Physical damage and Oxidative Stress	Fluorescence (DAPI – PI) SEM	Environment (water purification)	*E. coli* *S. aureus*	[111] 2016 [237] 2013
GO-CS	/	Not described	Fluorescence (SYTO 9 – PI)	Food (packaging)	*E. coli* *B. subtillis*	[84] 2017
GO-PVP-CS (PVP: Polyvinyl pyrrolidone)	CS: antibacterial (*cationic*) PVP: /	GO: ~Physical damage and Oxidative Stress	Colony counting	Biomedical (wound dressing) Food (packaging)	*S. aureus* *E. coli*	[111] 2016 [238] 2016
rGO-epoxy	/	Radical Oxidative Stress	Colony counting	Environment (corrosion protection) Biomedical	*E. coli*	[263] 2018
MWCNT-CS-derivatives	Improved performance of CS/MWCNT composite compared to CS	Oxidative Stress	Inhibition zone	Biomedical	*E. faecalis ; E. coli;* *S. epidermidis* Fungi: *A. niger* *C. neoformans* *C. tropicalis*	[90] 2018
MWCNT-BC (BC: bacterial cellulose)	BC: /	~Physical damage and interaction with bacterial cells	Inhibition zone	Biomedical (diabetic wounds)	*Klebsiella sp.*, *E. coli* , *P. aeruginosa* , *S. aureus* *MRSA*	[264] 2022
Bulk composite-Electrospinning						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-CS-PVA	CS: antibacterial PVA: /	Not described	Inhibition zone	Biomedical (wound healing and drug delivery system)	*E. coli*	[111] 2016 [23] 2014
GO-PVA-CS	CS: antibacterial PVA: /	Not described	Inhibition zone	Biomedical (wound dressing)	*E. coli* *S. aureus*	[24] 2018
SWNTs-Psf Psf: Polysulfone	Psf: /	Physical damage	Fluorescence (DAPI – PI) SEM	Antibacterial coating	*E. coli*	[250] 2011
t-MWNT-lignin-PVA	PVA: / Lignin: /	~ Physical damage	Serial dilution method (Minimum inhibitory concentration;	Biomedical (Wound dressings, scaffolds, and	*S. aureus*	[251] 2018

			Minimum bactericidal concentration)	antimicrobial textile).		
CNTs-CS-PLA	CS: antibacterial PLA: /	PLA/CNTs : / CS/PLA/CNTs : *On bacteria:* electrostatic effects *On Fungi:* aggregation of fungal spores and morphological abnormalities.	Colony counting	Food: (Strawberry preservation)	*E. coli* *S. aureus* Fungi : *Botrytis 41inereal and Rhizopus*	[126] 2019
GO/Hap/PCL (Hap : calcium hydroxyapatite)	Hap: / PCL: /	~ Physical damage	Inhibition zone	Biomedical	*S. aureus* *E. coli*	[265] 2022
Coating-Spin coating						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-glass *hGO-glass (hydrated GO)* GO-Silicon		•C radical transfer Physical damage	Colony counting SEM Fluorescence (Bacterial Membrane Lipid Peroxidation) Luminescence (β-Galactosidase Release from Bacteria)	Biomedical (Coatings for medical devices, wound healing, antibacterial additives in dental devices) Environment (water filtration membranes)	*E. coli* *L. crispatus*	[30] 2016
GO-PVK	PVK:/	GO: ~Physical damage and Oxidative Stress PVK-GO solution: Wrapping isolation	PVK-GO suspension: Fluorescence (SYTO-9 – PI (propidium iodide); Metabolic activity) Colony counting SEM OD PVK-GO coating on ITO: Inhibition zone AFM	Biomedical	*E. coli, C. metallidurans ; B. subtilis, R. opacus*	[266] 2015 [81] 2012
SWNT-PLGA	PLGA : /	~Physical damage and Oxidative Stress	Fluorescence (SYTO 9 – DAPI; Metabolic activity) SEM	Biomedical (medical devices)	*E. coli* *S. epidermidis*	[266] 2015 [79] 2010
MWCNT-PDMS (poly(dimethylsiloxane))	PDMS : /	~Physical damage and Oxidative Stress	Fluorescence (SYTO 9 -PI) CLMS (Confocal laser scanning microscopy; Syto61-GFP)	Biomedical (urinary tract devices)	*E. coli* *E. faecalis*	[267] 2022
Coating-Ball milling						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-Alkyd resin	Alkyd resin : /	~Physical damage and/or Oxidative Stress	Colony counting Fluorescence (SYTO 9 – PI) and Fouling test	Environment (antifouling properties corrosion and antibacterial resistance)	*E. coli* *S. aureus* *P. aeruginosa*	[111] 2016 [258] 2014

Coating-Dip Coating						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-silicon hGO-glass	Silicon: /	•C radical transfer Physical damage	Colony Counting Fluorescence (β-Galactosidase Release; Bacterial Membrane Lipid Peroxidation) SEM	Biomedical (Medical devices; wound healing, antibacterial additives in dental devices) Environment (water filtration membranes)	*E. coli* *L. crispatus*	[30] 2016
GSP graphene oxide–silica–polydimethylsiloxane	PDMS : antiadhesion	Oxidative stress	Total viable count (TVC) Fluorescence (SYTO 9 – PI) Epifluorescence microscopy on bacterial adhesion Confocal microscopy on active/total cells and EPS characterization of biofilms	Environment (pipelines : transport of cooling waters)	*Bacillus sp* *Pseudomonas sp* *Frewshwater cultures*	[268] 2021
GO + silicon rubber	Silicon: /	Oxidative Stress	Colonies counting Fluorescence (AO (Acridine orange) – PI) SEM	Biomedical (medical instruments)	*E. coli* *S. aureus*	[29] 2018
SWNT-PVK;	PVK: / (Improvement of SWNTs dispersion in the presence of PVK enhances performances)	~Physical damage and Oxidative Stress	Fluorescence (SYTO 9 – PI) OD (DNA quantification) Colony counting Inhibition Zone SEM	Environmental (Water purification)	*E. coli* *B. subtilis*	[266] 2015 [236] 2013
Coating-Vacuum filtration						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	***Microorganisms***	**Ref**
GO-PVK G-PVK	PVK: / (Improvement of GO/G dispersion in the presence of PVK enhances performances)	~Physical damage and Oxidative Stress	Regrow Assay of Bacteria Retained on the Filter SEM Colony counting Fluorescence (Metabolic assay) Absorbance (Reactive Oxygen Species Assay; DNA release)	Environmental (Water treatment)	*E. coli* *B subtilis*	[111] 2016 [76] 2014
SWNT-PVDF	PVDF: /	Physical damage	Fluorescence (SYTO 9 – PI;Metabolic activity assay) SEM	Environmental: (treatment of contaminated water)	*E.coli* Model **virus** particle : MS2 bacteriophage	[266] 2015 [78] 2008
Coating-Electrodeposition						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
G-PVK	PVK: / (Improvement of G dispersion in the presence of PVK enhances performances)	~Physical damage and Oxidative Stress	Composite in solution: OD;; Fluorescence (SYTO 9 – PI; Metabolic activity assay)	Biomedical	*B. subtilis* *E. coli*	[266] 2015 [75] 2012

			Composite films: AFM (Biofilm measurement)			
GO-PVK	PVK:/ (Improvement of GO dispersion in the presence of PVK enhances performances)	Not described	Composite in solution: OD Deposit on ITO: Fluorescence (SYTO 9 – PI)	Biomedical	*E. coli*	[111] 2016 [72] 2011
GSP graphene oxide–silica–polydimethylsiloxane	PDMS : antiadhesion	Oxidative stress	Total viable count (TVC) Fluorescence (SYTO 9 – PI) Epifluorescence microscopy on bacterial adhesion Confocal microscopy on active/total cells and EPS characterization of biofilms	Environment (pipelines : transport of cooling waters)	*Bacillus sp Pseudomonas sp Frewshwater cultures*	[268] 2021
Film-Vacuum filtration						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO–PEI/BC	/	~Physical damage; Wrapping isolation and electrostatic interaction	Colony counting Fluorescence (PI) SEM	X	*S. aureus S. cerevisiae*	[111] 2016 [257] 2016
rGO-TWEEN 20	TWEEN: /	Non-binding Not described	Optical microscope Fluorescence (Calcein – PI)	Biomedical	*B. cereus*	[266] 2015 [112] 201
Surface functionalization-Electrodeposition						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-Steel rGO-Steel	Steel: /	~Physical damage	Colony Counting Spectrophotometry (RNA efflux Measurement)	X	*E. coli S. aureus*	[269] 2018 [117] 2010
Surface functionalization-Electrospraying						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-PCU	PCU *: /*	~Physical damage and Oxidative Stress	Inhibition zone Absorbance (MTT assay) Colony counting	Biomedical	*S. aureus P. aeruginosa*	[70] 2017
Surface functionalization-Layer by layer						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
GO-MPPM (modified macroporous polypropylene Membrane)	PP (Polypropylene): /	~Physical damage	Colony counting	Environment	*E. coli*	[111] 2016 [270] 2015
GO-PLL-H-TFC PLL: Poly(L-lysine)	PLL: /	PLL = electrostatic interaction GO = Physical damage and Radical Oxidative Stress	Luminescence (ATP (Adenosine Tri Phosphate) test)	Environment (Filtration) .	Water from a local Australian lake	[111] 2016 [80] 2015
SWNT-PLL-PGA PGA: Poly(L-glutamic acid) SWNT polyelectrolyte films	PLL-PGA: /	SWNT ~Physical damage and Oxidative Stress	Fluorescence (SYTO 9 – PI)	Biomedical	*E. coli S. epidermidis*	[266] 2015 [271] 2012

Surface functionalization-ATRP						
Composite	**Polymer antimicrobial property**	**Mechanism**	**Assay**	**Application**	**Microorganisms**	**Ref**
CNTs-PDMAEMA PDMAEMA: Poly[2-(dimethylamino) ethyl methacrylate];	PDMAEMA: Antibacterial (Electrostatic interactions)	CNTs allow mechanical reinforcement, electrical conductivity and antibacterial effects Polymer diffusion	SEM Colony counting	X	*E. coli* *S. aureus*	[262] 2013

La classification des méthodes d'élaboration de nanocomposites disponibles dans la littérature et fournie dans cette section peut permettre au lecteur de sélectionner la méthode la plus appropriée pour une application particulière. Les composites peuvent être élaborés à grande échelle via les techniques présentées dans cette section car elles sont déjà utilisées dans l'industrie. C'est le cas du revêtement par centrigugation [260,272] ; revêtement par immersion [261] ; filtration sous vide [273] ; dépôt électrophorétique [274] et électrofilage [275]. De plus, l'accès à de grandes quantités de NMCs est devenu plus facile grâce à des capacités de production améliorées. C'est notamment le cas des NTCs, avec le développement d'une production simplifiée et des prix qui ne cessent de baisser [276]. Le graphène (ou de manière plus réaliste FLG) est toujours plus difficile à obtenir, mais on peut s'attendre à une évolution similaire en termes de disponibilité dans les prochaines années.

Comme déjà mentionné, l'interface entre les microorganismes et les NMCs se situe à la surface du composite. Il semble donc inutile d'inclure les NMCs dans l'ensemble des matériaux, ceux contenant des NMCs uniquement en surface semblent plus prometteurs pour des applications antimicrobiennes avec une activité renforcée et un coût moindre. Les méthodes de revêtement de surface sont donc très pertinentes car elles permettent la présence de nanoparticules uniquement à la surface du matériau, ce qui est déterminant en termes d'activité antibactérienne pour permettre une interaction directe entre les particules et les microorganismes.

De plus, les techniques capables de retirer spécifiquement la couche supérieure de polymère à la surface d'un matériau peuvent être utilisées pour permettre aux particules d'affleurer de la matrice (même si elles étaient initialement noyées dans le polymère) et sont donc très intéressantes. Ce domaine de recherche n'est pas encore très développé, mais des traitements de surface comme l'ablation laser, les procédés d'oxydation plasma ou UV/O_3 sont déjà disponibles et peuvent être utilisés pour atteindre cet objectif. Le développement industriel de nanocomposites à base de nanomatériaux carbonés et à matrice polymère pour des applications antimicrobiennes est donc tout à fait envisageable. En conclusion, il existe un large choix de techniques différentes et la plus appropriée peut être sélectionnée en fonction des limitations techniques. La question de la force de l'interaction entre les NMCs et la surface est très importante à la fois en termes de durabilité de l'effet antimicrobien et de limitation du relargage des NMCs qui poserait potentiellement des problèmes de toxicité.

I.7.3 Interactions entre les composants :

Nous nous intéressons ici aux différentes interactions possibles entre les NMCs et une matrice polymère, dans un souci de sécurité (pas de relargage) mais aussi de durabilité (efficacité plus longue) pour les applications antimicrobiennes. Dans un nanocomposite, différentes interactions se produisent entre les NMCs et la matrice polymère, en fonction des propriétés physico-chimiques des deux composants, telles que l'état d'oxydation des nanoparticules de carbone ou la polarité du polymère par exemple. Des interactions chimiques entre composants peuvent se créer, cependant des

interactions physiques suffisent souvent à élaborer un composite et de nombreuses études ne rapportent que des interactions physiques entre les particules et la matrice pour expliquer la formation du nanocomposite. Des membranes composites en film mince GO-poly (amide) ont été produites et une analyse par spectroscopie infrarouge (FTIR) a suggéré que les particules étaient seulement bloquées physiquement dans la matrice car aucune liaison chimique forte n'a été mise en évidence entre les composants [246]. La littérature mentionne également l'incorporation de SWNTs dans une matrice PLGA, où leur caractérisation FTIR suggérait que tous les SWNTs n'étaient pas bloqués dans le polymère [79]. D'autres travaux ont reporté des interactions faibles entre les NMCs et une matrice polymérique. Des interactions entre les liaisons pi des parois latérales de MWNTs et des dérivés de chitosane modifiés chimiquement ont été rapportées et permettent une dispersion homogène des particules à l'intérieur de la matrice [90].

La littérature cite également des interactions telles que la liaison hydrogène entre les particules et la matrice [86,237]. Les liaisons hydrogène entre les groupes contenant de l'oxygène à la surface de GO et les groupes hydroxyle d'une matrice époxy ont été mises en évidence par caractérisation FTIR [277]. Il est également possible d'identifier des liaisons hydrogène entre deux polymères formant la matrice [126]. Par exemple, des liaisons hydrogène entre les chaînes de chitosane et de PLA (acide polylactique) dans un composite GOPVA-CS ont été reportées [24]. De plus, les interactions électrostatiques identifiées dans le cas de rGO-DODA ont permis d'éviter toute perte éventuelle de particules [85].

Des liaisons covalentes sont également citées [30]. La formation de liaisons covalentes entre GO et le chitosane a été identifiée, avec une réaction de réticulation par addition nucléophile ayant lieu ainsi qu'une réaction entre les groupes époxy dans GO et les groupes amino et hydroxyle primaire dans le chitosane. Cette réaction est plutôt simple et produit une liaison forte qui améliore les propriétés mécaniques des films de GO-chitosane [84].

Le type d'interaction se produisant entre les composants peut entraîner des différences de stabilité entre les nanocomposites et est donc d'une importance majeure. Comme évoqué précédemment, le contrôle de la toxicité des nanoparticules est un enjeu majeur. De nombreuses études ont été menées et, s'il est encore difficile d'en tirer des conclusions générales, éviter leur relargage est devenu une priorité. La stratégie « safer by design » (où les risques d'utilisation sont pris en compte dès la conception) vise à bénéficier des propriétés antimicrobiennes des NMCs dans un nanocomposite tout en évitant les problèmes liés à leur libération et toxicité potentielle. La littérature cite des composites de stabilités différentes, avec la présence ou l'absence de relargage de NMCs, selon le type d'interaction ayant lieu entre les composants. Des différences de stabilité entre un film de GO-hydraté élaboré avec la méthode de dépôt par centrifugation (spin coating) et un film de GO-hydraté avec liaisons covalentes ont été observées. Le film avec liaisons covalentes semble être plus durable, avec la capacité de résister à 30 minutes sous sonication, que le film préparé par centrifugation qui n'est capable de résister qu'à quelques rayures ou lavages [30]. Les interactions chimiques fortes sont donc privilégiées.

Par ailleurs, des travaux présentant un enrobage physique des NMCs présentant également une bonne stabilité avec un composite durable sans relargage des nanoparticules sont également disponibles [246]. On peut alors conclure qu'une combinaison entre de fortes interactions chimiques et physiques est le moyen le plus sûr de produire un nanocomposite durable et efficace pour des applications antimicrobiennes.

Cependant, il est très difficile d'évaluer avec certitude le relargage de nanoparticules de carbone contenues dans un composite car le carbone est présent partout dans notre environnement et l'enjeu est de détecter de très faibles quantités [278]. Il est donc difficile de comparer la durabilité des

composites antimicrobiens à base de nanoparticules de carbone en termes de libération de particules dans les conditions d'utilisation attendues. Il est essentiel de développer les recherches dans ce domaine car même sans considérer les problèmes environnementaux et de toxicité potentiels, la perte de nanoparticules de carbone remettrait en cause la durabilité de l'activité du dispositif car dans la plupart des cas, l'activité antimicrobienne des composites à base de nanoparticules de carbone est directement liée à l'action des nanoparticules elles-mêmes. Il est nécessaire d'assurer le blocage des nanoparticules dans la matrice pour permettre la mise en place de la stratégie « safer by design » où les dispositifs présentent une activité antimicrobienne durable avec de faibles risques concernant la toxicité et l'impact environnemental.

Cela signifie également que le type de matrice utilisé doit être choisi avec soin, par exemple une matrice biodégradable conduira inévitablement à la libération des particules avec le temps. En raison du défi technique lié à l'évaluation de très faibles pertes de NMCs dans des environnements potentiellement complexes lors des conditions d'utilisation attendues, il est recommandé d'effectuer des tests sur les nanocomposites traités en conditions sévères (ultrasons, température bien au-dessus de la température maximale de fonctionnement, pH bas ou haut, abrasion, etc.). Cela pourrait ainsi permettre de certifier que les nanocomposites peuvent être employés en toute sécurité dans des conditions normales d'utilisation.

I.7.4 Propriétés antimicrobiennes des matériaux à base de nanoparticules de carbone :

L'activité antimicrobienne des matériaux est évaluée avec des tests qualitatifs ou quantitatifs basés sur l'analyse de l'impact de ces matériaux sur la prolifération des microorganismes en contact (méthodes de diffusion ou de dilution, décompte de colonies). Les différents tests antimicrobiens présentés dans la partie I.2 sont facilement adaptables pour les nanocomposites. Ainsi, de nombreuses études utilisent des méthodes répandues tels que les tests de zone d'inhibition, de décompte de colonies, en fluorescence et l'imagerie par microscopie. Par exemple, le test de zone d'inhibition présenté dans la partie I.2 a été utilisé pour démontrer l'activité antimicrobienne de composites CS/PVA/GO (Figure I.10) [24].

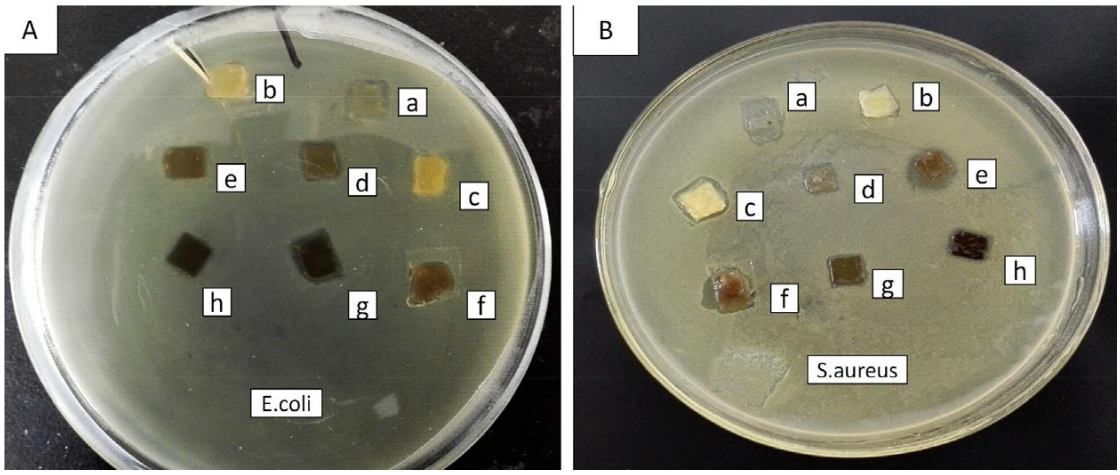


Figure I.10 : Photos de zones d'inhibitions de membranes composites nanofibreuses selon différents ratios de CS/PVA/GO; a) CS:PVA:GO = 1:9:0; b) CS:PVA:GO = 2:8:0; c) CS:PVA:GO = 3:7:0; d) CS:PVA:GO = 1:9:0.01; e) CS:PVA:GO = 2:8:0.02; f) CS:PVA:GO = 3:7:0.03; g) CS:PVA:GO = 1:9:0.03; h) CS:PVA:GO = 1:9:0.05 ; contre *E. coli* (A) et *S.aureus* (B) [59].

La méthode de décompte de colonies a également été adaptée pour évaluer l'activité antimicrobienne de membranes GO-poly(amide) avec une mesure de viabilité cellulaire après incubation avec les échantillons (Figure I.11) [246].

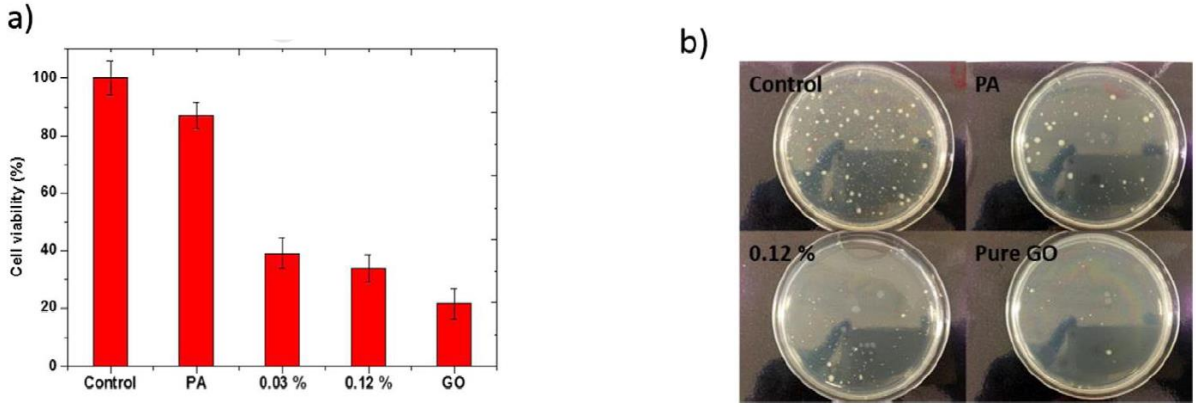


Figure I.11 : a) Mesure de viabilité cellulaire après incubation avec un contrôle et des membranes PA, 0,03w.%, 0,12w% GO-poly(amide) et GO pure; b) croissance des bactéries sur des plaques avec agar pour le décompte de colonies [59].

La littérature mentionne aussi l'adaptation du test en fluorescence pour mesurer l'activité antimicrobienne d'un nanocomposite. Ceci peut être illustré par la Figure I.12 qui montre des images en fluorescence de films PVK-GO [72]. Cette technique ne peut être appliquée que dans le cas de couches minces transparentes.

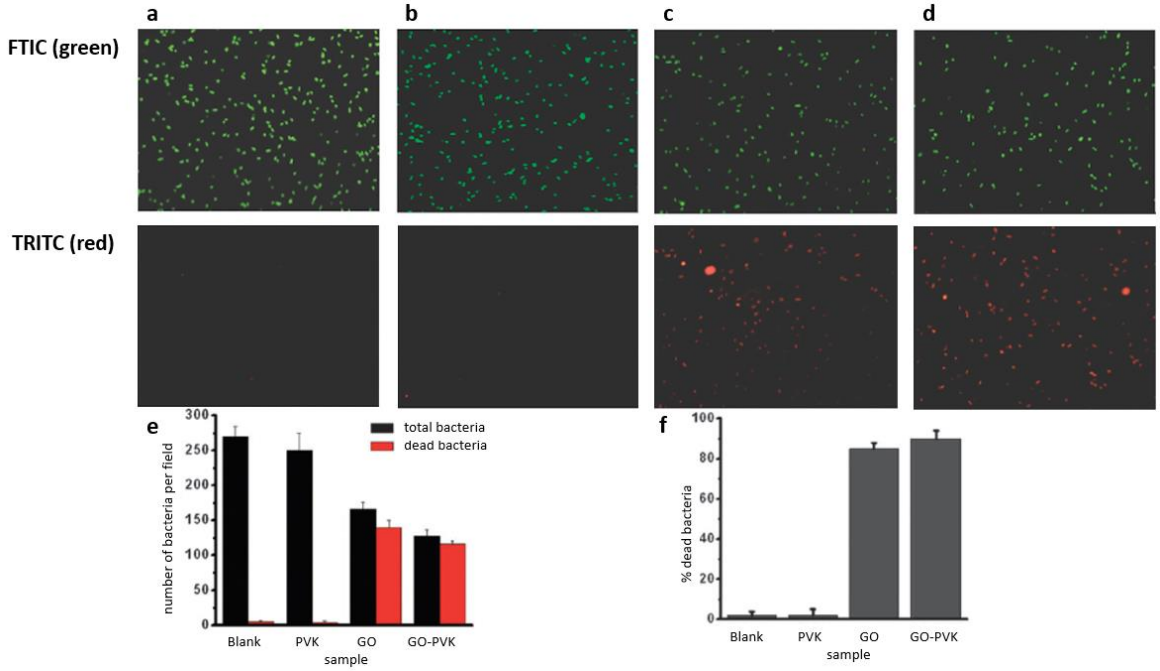


Figure I.12 : a–d: Images en fluorescence de *E. coli* sur a) de l'ITO non modifié, b) un film PVK électrodéposé, c) un film GO préparé par dépôt par centrifugation, et d) un film PVK-GO électrodéposé. Les images ont été obtenues avec un objectif à immersion d'huile 100x en utilisant un filtre FITC pour la fluorescence verte de SYTO 9 dans toutes les bactéries présentées sur la colonne de gauche et un filtre TRITC pour la fluorescence rouge de PI dans les bactéries à membrane endommagée présentées sur la colonne de droite. e) Tracé du nombre total de bactéries (vert) et parmi elles le nombre de bactéries PI-positives (rouge) sur le champ de vision (90 x 70 µm2), qui ont été adsorbées sur les surfaces modifiées. Le blanc est le substrat ITO non modifié comme contrôle. f) Corrélation du % E. coli non viable (% PI-positif) fixé sur chacune des surfaces [59].

La microscopie électronique à balayage MEB est une méthode courante de caractérisation qui permet d'observer la morphologie de surface de matériaux en contact avec des microorganismes. Elle a été utilisée pour visualiser l'interaction entre un composite PVK-GO et la souche bactérienne *B. subtilis* (Figure I.13)[81].

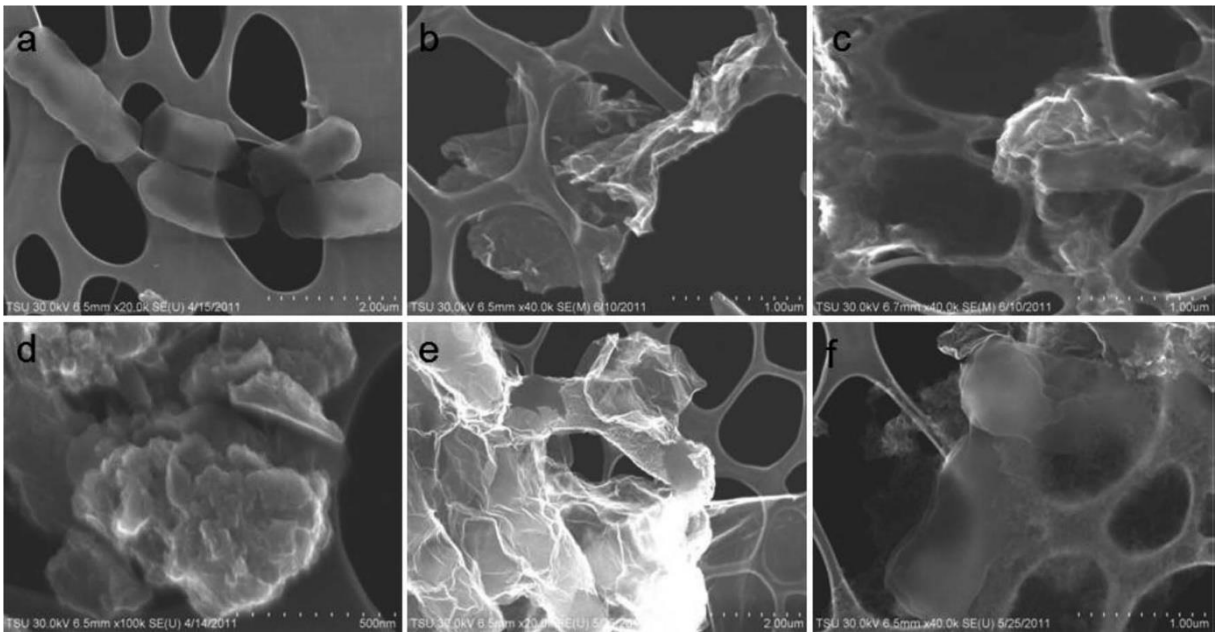


Figure I.13 : Images MEB des nanomatériaux avec *B. subtilis* après interaction avec les nanomatériaux GO et PVK-GO. a) B. subtilis à grandissement 20k; b) GO à grandissement 40k; c) PVK-GO à grandissement 40k; d) PVK à grandissement 100k; e) B. subtilis exposé au GO à grandissement 20k; et f) B. subtilis exposé à du PVK-GO à grandissement 40k [81].

Comme indiqué dans le tableau 6, d'autres tests peuvent être utilisés sur des nanocomposites contenant des nanoparticules de carbone, tels que l'identification de composants spécifiques comme les espèces réactives de l'oxygène, l'évaluation de la quantité d'ADN libéré, etc. De plus, ces outils peuvent même être employés pour déterminer quel est le composant du nanocomposite responsable de l'activité antimicrobienne. En testant séparément la matrice polymère, les NMCs ainsi que les nanocomposites et en comparant les résultats, il est possible d'attribuer l'activité antimicrobienne à un composant particulier. Par exemple, une membrane inerte en polypropylène présentant une activité antimicrobienne accrue lors de l'incorporation de matériaux de graphène (GM) a été mentionnée et il a été démontré que l'activité pouvait être attribuée au contact direct entre le graphène et les microorganismes [270].

L'activité antimicrobienne de la plupart des composites contenant des NMCs peut être attribuée aux nanomatériaux carbonés seuls. Ils peuvent jouer soit un rôle actif en endommageant directement les pathogènes, soit un rôle passif s'ils empêchent l'adhésion des pathogènes à la surface sans les tuer. Dans la plupart des cas, la matrice seule ne présente pas de propriétés antimicrobiennes contrairement au nanocomposite [237,246]. Même si la matrice n'a pas d'effet antimicrobien intrinsèque, elle peut renforcer l'activité des NMCs en améliorant leur dispersion au sein de la matrice par exemple [76].

L'addition des propriétés antimicrobiennes des NMCs et du polymère peut aussi être rapportée, comme dans le cas des nanocomposites CS-PVP-GO où le GO et le chitosane présentent tous deux une activité antimicrobienne [238].

Ainsi différents scénarios sont possibles, mais il est généralement conclu que seuls les NMCs sont responsables de l'activité antimicrobienne du nanocomposite et que leurs propriétés sont transférées à l'ensemble du matériau lors de leur incorporation [270]. Cependant l'utilisation de GO peut nécessiter une attention particulière car ce type de particules peut être réduit par des bactéries [20,21,279–282], ce qui pourrait entraîner une perte d'activité antimicrobienne et remettrait en cause la durabilité de l'action.

Comme évoqué en I.2, il est possible d'évaluer l'efficacité antimicrobienne globale des matériaux nanocomposites grâce à des tests qui peuvent également être utilisés sur les NMCs en suspension, mais cela ne signifie pas que les mécanismes antimicrobiens peuvent être identifiés facilement. Il est possible de faire abstraction de certains mécanismes antimicrobiens présentés en I.5, qui sont spécifiques aux NMCs en suspension, pour décrire le comportement de nanocomposites. Lorsque les nanoparticules sont piégées dans une matrice, il est possible de ne pas prendre en compte le mécanisme d'enroulement d'une particule autour d'un microorganisme qui bloque l'accès de celui-ci aux nutriments. Les mécanismes d'internalisation des NMCs sont également à exclure. De plus, un échauffement local est susceptible de ne pas se produire dans le cas des polymères isolants thermiquement. Cependant, une action physique, comme l'endommagement de la membrane, une action antiadhésive, ou le stress oxydatif, est toujours possible.

Une activité sans contact physique par stress oxydatif est également à considérer, les nanomatériaux pouvant eux-mêmes produire des espèces oxydantes. Cependant, cette situation ne peut pas être généralisée car cet effet dépend fortement de la nature du nanomatériau carboné (comme discuté en partieI.5 les fullerènes et les nanotubes de carbone peuvent également présenter des propriétés antioxydantes intrinsèques).

Une activité antimicrobienne illimitée et sécurisée peut être obtenue avec des NMCs qui sont piégés et facilement accessibles en surface, car aucune nanoparticule de carbone n'est relarguée dans le temps.

I.8. Conclusion

Les composites à base de nanomatériaux carbonés sont donc prometteurs pour les applications antimicrobiennes. Nous nous sommes intéressés à l'activité de nanoparticules de carbone, incorporés dans ou à la surface d'une matrice polymérique. Les nanotubes de carbone et les dérivés de graphène sont toujours les nanoparticules de carbone les plus étudiées dans la littérature, et nous avons présenté de nombreux exemples démontrant que leur incorporation dans une matrice polymère permet de transférer leur activité à un matériau entier.

La plupart des polymères mentionnés sont de bons supports pour les nanoparticules, tout en démontrant des propriétés antimicrobiennes intrinsèques supplémentaires dans certains cas. Lorsque les propriétés antimicrobiennes des composites sont dues aux nanomatériaux carbonés, la plupart des travaux lient l'activité biocide au contact direct entre particules et microorganismes. Il est donc important de se concentrer sur la surface des matériaux qui représente l'interface entre les NMCs et les microorganismes.

Ce simple constat permet de conclure qu'il est inutile d'incorporer des nanomatériaux carbonés dans l'intégralité de la matrice lorsque l'on vise une application antimicrobienne, mais qu'il semble plus pertinent d'en inclure en seulement surface, là où elles sont vraiment nécessaires, pour maximiser l'efficacité.

Lorsque les nanoparticules sont bloquées en surface, les mécanismes antimicrobiens tels que l'endommagement physique et le stress oxydatif résultant devraient toujours fonctionner.

Le défi consiste alors à préparer des matériaux polymères contenant des nanoparticules de carbone exposées en surface (non recouvertes d'une fine couche polymère) tout en s'assurant qu'elles sont piégées en toute sécurité pour s'affranchir des problèmes de relargage potentiel et de toxicité associées. Les méthodes d'élaboration conduisant à de fortes interactions (physiques, chimiques ou les deux) avec la surface du polymère sont donc à privilégier. Parmi les différents NMCs étudiés dans la littérature, le GO semble bien évidemment se démarquer, la présence de nombreux groupes fonctionnels oxygénés étant bénéfique à la fois pour améliorer la dispersion dans la matrice polymère et pour leur activité biocide intrinsèque. Cependant, une éventuelle perte d'activité peut survenir en raison de la capacité de certaines bactéries à le réduire. Il ne fait aucun doute que d'autres NMCs tels que les NTCs, FLG et rGO peuvent trouver ici un champ d'application favorable, non seulement dans le domaine biomédical, mais également dans toutes les situations où les surfaces doivent rester exemptes de contamination microbienne, comme dans l'industrie alimentaire avec les emballages alimentaires ou pour des applications environnementales avec de nouveaux filtres pour la purification de l'air ou de l'eau par exemple.

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre projet d'élaboration de surfaces antimicrobiennes à base de NMCs. L'objectif est de proposer une méthode d'élaboration de matériaux antimicrobiens à base de NMCs respectant le principe « safer by design ». Le défi est de réussir à bloquer ces nanoparticules en surface d'un polymère de façon à éviter une perte d'efficacité dans le temps, à s'affranchir d'éventuels problèmes de toxicité liés à des nanoparticules relarguées, tout en permettant un contact entre ces nanoparticules et des microorganismes. Pour cela, nous avons sélectionné les NMCs les plus mentionnés dans la littérature pour leurs propriétés antimicrobiennes, c'est à dire les NTCs, le graphène ainsi que leur forme oxydée. Nous nous orientons vers une application biomédicale et ainsi nous privilégions l'utilisation d'un support silicone car ce polymère est couramment utilisé dans les dispositifs médicaux. Notre stratégie repose sur la pulvérisation des NMCs en suspension sur une surface silicone grâce à un aérographe pour introduire ces nanoparticules en surface du polymère. Les chapitres suivants présentent la réalisation de matériaux avec dépôts de NMCs sur un support par pulvérisation, leur caractérisation, et l'évaluation de leur activité antimicrobienne.

Chapitre II

Matériel et méthode

II.1. Nanoparticules de carbone :

Durant ces travaux de thèse nous avons décidé de travailler avec du graphène, des nanotubes de carbone double parois et leur forme oxydée (nanotubes de carbone oxydés et oxide de graphène).

Graphène :

Nous avons utilisé du graphène, ou plutôt du few layer graphène (FLG) commercial (Société Bedimensional) qui nous est fourni en tant que poudre. Un sel biliaire, le déoxycholate de sodium, est présent dans la poudre, ce qui est problématique car ce composé est très détergent et déstabilise les membranes cellulaires. Le deoxycholate de sodium étant très soluble dans l'eau, nous avons lavé ces nanoparticules avec de l'eau désionisée.

Graphène oxydé :

Le graphène oxydé utilisé a été synthétisé au CIRIMAT selon une version modifiée de la méthode de Hummers [283] qui est décrite ci-dessous.

Deux bouteilles en verre de 250 mL contenant chacune 0,5 g de graphite (KS44 graphite, fourni par IMERYS Graphite & Carbon Corporation) sont placées dans un mélange moitié eau et moitié glace (nous séparons la préparation en deux pour diminuer les risques). Sous agitation magnétique, 30 mL de H_2SO_4 (98 %m), 0,5 g de $NaNO_3$ et 3 g de $KMnO_4$ sont ajoutés dans chaque bouteille. Le mélange est laissé 1 heure sous agitation magnétique, puis il est placé dans une étuve ventilée à 45°C pendant 2 jours.

Après 2 jours, 40 mL d'eau désionisée sont ajoutés à chaque bouteille à température ambiante et sous agitation magnétique (ce qui provoque une forte augmentation de la température jusqu'à environ 95°C). Le mélange est laissé à refroidir pendant 1 heure puis 100 mL d'eau désionisée sont versés dans la dispersion sous agitation magnétique. Pour éliminer l'excès de $KMnO_4$, 3 g de H_2O_2 30% sont ajoutés lentement (la couleur de la solution passe de vert foncé à jaune). Le mélange est laissé 2 heures à température ambiante sous agitation magnétique.

La dispersion est ensuite répartie dans des tubes de centrifugation (50 mL) et centrifugée à 4500 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté et les culots sont réunis (les deux bouteilles sont assemblées). Le pH de la dispersion est ajusté avec de la soude 1 M jusqu'à atteindre un pH 8,5 (la teinte de la dispersion devient de plus en plus foncée).

Le mélange est à nouveau réparti dans des tubes de centrifugation et est centrifugé successivement à 7500 rpm, 9500 rpm, 15300 rpm et de nouveau 15300 rpm pendant 10 minutes. A chaque centrifugation le surnageant est jeté et le culot est redispersé dans de l'eau désionisée.
Finalement les culots sont rassemblés dans une bouteille d'1 L et redispersés dans de l'eau désionisée pour un volume total de 800 mL. Un traitement ultrasons est effectué sur cette dispersion avec une sonde de diamètre 11 mm pendant 2 heures (40 %, 6 s on, 4 s off).

Finalement le mélange est à nouveau centrifugé à 15 300 rpm pendant 10 minutes. Très peu de sédiments sont obtenus et le surnageant est récupéré et correspond à la dispersion de GO recherchée.

Nanotubes de carbone bi-parois DWNTs :

Les nanotubes de carbone double paroi ont été synthétisés au CIRIMAT par dépôt chimique catalytique en phase vapeur (catalytic chemical vapor deposition) CCVD suivant un protocole déjà établi [284]. Ce protocole peut être divisé en plusieurs étapes : la préparation de la poudre de catalyseur, la croissance des nanotubes de carbone, puis l'extraction de ces derniers à partir de la poudre composite ainsi obtenue.

Préparation de la poudre de catalyseur :

Pour 120g de poudre de catalyseur, 747,4g de nitrate de magnésium $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ et 6,4g de nitrate de cobalt (II) $Co(NO_3)_2.6H_2O$ sont dissous ensemble dans de l'eau désionisée avec 1,3g d'heptamolybdate d'ammonium $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ et 313,'d'acide citrique. La combustion de cette solution est réalisée à 550°C pendant environ 15 minutes dans un four à moufle, porte ouverte. Le solide obtenu est ensuite transféré dans une nacelle en céramique, puis calciné pendant 2 heures sous air afin d'éliminer les résidus d'acide citrique encore présents.

Synthèse des DWNTs à partir de la poudre de catalyseur :

Nous procédons ensuite à la réduction sélective de la poudre en atmosphère H_2-CH_4 pour former des nanoparticules métalliques qui catalysent la décomposition de CH_4.

La température est augmentée de l'ambiante jusqu'à 1000°C et des nanoparticules métalliques se forment à la surface de MgO, le méthane réagit avec ces particules pour former des nanotubes de carbone. La température est encore suffisamment élevée lors de la descente en température jusqu'à 900°C pour que des nanotubes de carbone continuent à se former. La production diminue ensuite avec la diminution de la température.

Nous obtenons une poudre composite $Mg_{0.99}(Co_{0.0025}Mo_{0.0075})O$ contenant entre 10 et 12% en masse de nanotubes de carbone.

Extraction des nanotubes de carbone :

De l'HCl 37% m est ensuite ajouté à cette poudre pour extraire les nanotubes de carbone bi-parois (DWNTs) en dissolvant les oxides restants et les particules métalliques non protégées par du carbone. Par exemple, pour extraire 1 g de nanotubes de carbone on ajoute environ 28 mL d'eau désionisée et 122 mL d'HCl à 8,1 g de poudre composite placée dans un erlenmeyer. La réaction étant exothermique l'erlenmeyer est positionné dans un cristallisoir rempli d'eau fraiche. Puis le mélange est recouvert de parafilm, homogénéisé dans une cuve à ultrasons et laissé à température ambiante pendant 16 heures. La suspension est ensuite filtrée sur une membrane en nitrate de cellulose (0,45 µm) et lavée avec de l'eau désionisée jusqu'à obtenir un pH neutre.

La suspension aqueuse de nanotubes de carbone obtenue peut ensuite être lyophilisée pour obtenir des particules sous forme de poudre, gardée en suspension, ou oxydée pour obtenir des DWNTs oxydés.

<u>Oxydation nanotubes de carbone double parois</u> :

Pour oxyder des DWNTs bruts (encore humides), du HNO_3 (3M) est ajouté dans un ballon en suivant les proportions 100 mg de DWNTs bruts/ 100 mL HNO_3. Ce ballon est ensuite placé dans un bain à ultrasons pendant 10 minutes. Puis la suspension est portée à reflux sous agitation à 130°C pendant 24 h. Cette suspension est ensuite refroidie à température ambiante avant d'être filtrée sur une membrane en polypropylène (0,45 µm) et lavée avec de l'eau désionisée jusqu'à pH = 7.

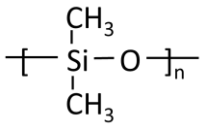
<u>Suspensions aqueuses de nanomatériaux carbonés pour dépôt par pulvérisation :</u>

Les différentes nanoparticules de carbone sont mises en suspension dans de l'eau désionisée à la concentration 1 mg/mL. Les nanoparticules de graphène oxydé et de nanotubes de carbone oxydés sont stables dans l'eau au contraire du FLG et des nanotubes de carbone bruts. Pour obtenir des suspensions aqueuses stables de FLG et de DWNTs bruts, de la carboxyméthyl cellulose sodée (CMC, Fluka 21 901), qui agit comme dispersant, est ajoutée en même proportion massique que les nanoparticules [285]. En effet, la CMC porte des fonctions carboxylates (chargés négativement) au pH

de l'eau désionisée et au-delà, ce qui permet une répulsion électrostatique des particules qu'elle recouvre et donc leur stabilisation.

II.2. Matériaux support :

Les silicones sont des polymères dont la structure chimique est basée sur une alternance d'atomes de silicium et d'oxygène, de formule générale -R_2-Si-O-. La répétition d'unités -Si-O- peut aussi être appelée siloxane.
Le Polydiméthylsiloxane PDMS fait partie de la classe des siloxanes, sa chaîne est formée par la répétition d'unités siloxanes avec des groupes méthyles liés aux atomes de silicone. [286]



SYLGARD 184 :

Le silicone élastomère SYLGARD184 a été choisi. Sa composition exacte n'est pas divulguée par le fournisseur Dow Corning [287] . Ce polymère est composé d'une base et d'un agent réticulant mélangés dans un ratio massique 1 :10 (recommandation du fabriquant) avec un catalyseur au platine. Le mélange polymérise en 48 heures à température ambiante, la polymérisation peut être accélérée en augmentant la température mais celle-ci ne doit idéalement pas être élevée à plus de 60°C [287]. Cet élastomère est généralement utilisé dans le domaine de la micro-fluidique [288,289].

Pour préparer le silicone les deux composants sont versés dans un bécher avec une proportion 1 : 10, et mélangés à l'aide d'une baguette en verre pendant 2 minutes. Puis le bécher est placé dans un dessiccateur sous vide pendant 30 minutes pour assurer le dégazage du silicone. 0,6 g de silicone sont versés à l'aide d'une pipette dans chaque puits d'une plaque de culture 12 puits en polystyrène [290].

MED-4917 :

Le silicone de grade biomédical MED-4917 avantor Nusil a aussi été utilisé [291]. Ce silicone élastomère de faible consistance est aussi bi-composant, cette fois mélangé en proportion 1 :1 (recommandation du fabriquant). Il trouve des applications en revêtement ou encapsulation par exemple. Il ne doit pas être utilisé comme implant dans le corps humain pour une période supérieure à 29 jours.

Ce silicone est préparé en versant les deux composants dans un bécher et en les mélangeant à l'aide d'une baguette en verre pendant 2 minutes. Ce silicone présente une viscosité de 11,750 mPas [292]ce qui est beaucoup plus faible que celle du SYLGARD184 de 3 500 mPas [287]. Beaucoup plus d'air est piégé dans le silicone MED4917 lors du mélange de ses deux composants. Pour éliminer cet air emprisonné, le polymère est dégazé sous vide dans un dessicateur pour une durée de 45 minutes plus importante que celle du SYLGARD184 de 30 minutes. 0,6 g de silicone est ensuite versé à l'aide d'une pipette dans chaque puits d'une plaque de culture 12 puits en polystyrène.

Masque respiratoire :

Lors de ces travaux de thèse nous avons utilisé des masques commercialisés décrits comme contenant du graphène [293]. Ces masques sont composés de 5 couches superposées, nous utilisons la couche centrale contenant les nanoparticules de graphène pour effectuer les tests antiviraux.
Nous avons également travaillé avec des masques respiratoires standards de type chirurgical en polypropylène [294]. Ces masques contiennent trois couches, là aussi nous avons travaillé avec la couche centrale. Ces masques ont été utilisés en tant que contrôles, ou pour y effectuer des dépôts de

FLG. La couche de masque utilisée est découpée selon le diamètre d'un puits d'une plaque de culture 24 puits. Les morceaux de masque sont ensuite collés au fond des puits d'une plaque de culture 24 puits à l'aide de scotch carbone afin d'éviter leur déplacement lors des expériences, et de s'assurer que la face testée soit totalement en contact avec les liquides utilisés.

II.3. Elaboration des matériaux antimicrobiens à base de nanoparticules de carbone par pulvérisation (spray coating) :

Pour traiter la surface des matériaux nous utilisons une technique de « spray coating », c'est-à-dire que nous pulvérisons les suspensions aqueuses de nanoparticules de carbone en surface (silicone ou masque respiratoire) à l'aide d'un aérographe.

Tout d'abord le matériau « support » est préparé, les échantillons à base de silicone sont directement préparés dans des plaques de culture 12 puits tandis que les échantillons à base de masque sont découpés et placés dans des plaques de culture 24 puits, comme décrit précédemment. Cela nous permet par la suite d'effectuer les tests d'activité antimicrobienne directement sur les matériaux sans avoir à les transférer.

Une fois que les plaques de culture contenant les matériaux supports sont prêtes, celles-ci sont passées devant une barre antistatique pendant 30 secondes pour neutraliser les charges présentes et ainsi ne pas dévier la trajectoire des particules pulvérisées lors du dépôt. Elles sont ensuite fixées verticalement à l'aide d'une potence pour permettre aux gouttelettes en suspension d'approcher frontalement le silicone ou le masque.

Les suspensions aqueuses de nanoparticules utilisées, de concentration 1 mg/mL, sont soniquées dans une cuve à ultrasons pour s'assurer de leur dispersion. 2 mL de ces suspensions sont ensuite introduits dans le réservoir (d'une capacité de 7 mL) d'un aérographe (Airbrush en anglais) de type « artiste » (BD air model). L'aérographe est alimenté par de l'air comprimé. La sortie de ce canal se fait via une buse de 0,3 mm de diamètre dont l'ouverture est contrôlée par une aiguille. La position de cette aiguille est déterminée par une molette. Les paramètres de spray ont été déterminés en amont lors d'une étude réalisée au CIRIMAT [295]. L'aérographe est placé à 20 cm de la cible avec la molette tournée de 1,5 tour. La pulvérisation est réalisée sous sorbonne mais sans ventilation pour ne pas dévier les nanoparticules, en appuyant sur une gâchette qui permet de retirer l'aiguille et de contrôler ainsi l'ouverture de la buse et l'injection de l'air comprimé (Figure II.1). Le spray produit est invisible à l'œil nu, c'est pourquoi un laser est positionné à côté de la buse. Cela permet de visualiser la trajectoire de la pulvérisation, et ainsi d'ajuster son geste pour couvrir l'ensemble de la plaque et répartir les nanoparticules de façon homogène sur les différents puits. Selon le type de nanoparticules utilisées le dépôt est plus ou moins visible en fin de pulvérisation. Aucune teinte n'apparaît après la pulvérisation de FLG et de GO, au contraire des nanotubes de carbone bruts et oxydés qui donnent une légère teinte noire à la plaque utilisée.

En plus des protections habituelles d'un laboratoire de chimie comme une blouse en coton, des gants et des lunettes de protection, un masque filtrant de protection FFP3 est porté lors du spray pour se protéger des nanoparticules qui pourraient sortir de la sorbonne.

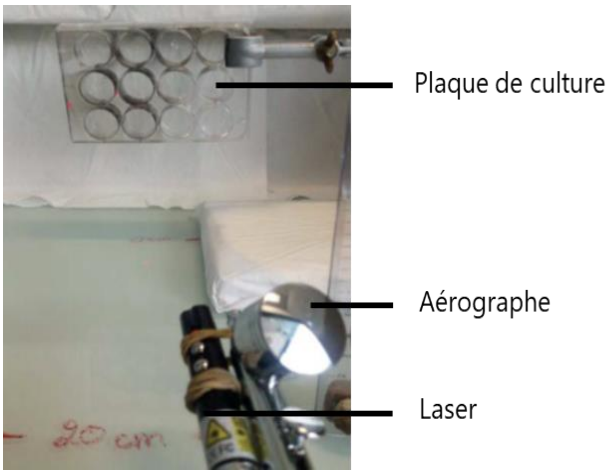


Figure II.1 : Montage spray coating.

Les plaques contenant les matériaux nanoparticules de carbone sur silicone sont laissées une nuit à température ambiante avant d'être placées dans une cuve à ultrasons pendant 2 minutes pour enlever les nanoparticules non bloquées en surface des matériaux traités, et ainsi s'affranchir du risque de toxicité lié à des nanoparticules relarguées. Ce protocole est identique pour toutes les suspensions aqueuses de nanoparticules de carbone utilisées, et pour les deux silicones.

Au contraire, les échantillons de nanoparticules de carbone déposées sur masque ne sont pas traités aux ultrasons mais seulement plongés dans de l'eau (dans des conditions similaires à celles dans lesquelles ils sont testés par la suite). Des tests de cytotoxicité des nanoparticules sont réalisés pour évaluer les conséquences d'un éventuel relargage de toutes les nanoparticules.

II.4. Microscopie électronique :

Microscopie électronique à balayage (MEB) :

La microscopie électronique à balayage repose sur l'exposition d'un échantillon (de préférence conducteur) à un faisceau d'électrons primaires. Plusieurs particules ou rayonnements peuvent ensuite être émis après collision : des électrons secondaires, des électrons rétrodiffusés, des électrons d'Auger et des rayons X.

Les électrons primaires peuvent interagir avec des atomes de l'échantillon et être réémis avec une faible perte d'énergie. Ces électrons rétrodiffusés sont sensibles au numéro atomique des atomes rencontrés et permettent de mesurer l'homogénéité chimique et d'obtenir une analyse qualitative. La collision d'électrons primaires avec l'échantillon peut aussi entraîner l'ionisation d'atomes, ce qui peut conduire à une émission d'électrons d'Auger qui apportent des informations sur la composition de l'échantillon. Cela peut également provoquer l'émission de rayons X apportant des informations sur la nature chimique des atomes présents.

Nos échantillons sont majoritairement constitués de carbone, aussi nous ne nous focalisons pas sur l'analyse des éléments présents mais plutôt sur la topographie de surface. Ces informations sont obtenues grâce aux électrons secondaires, proches de la surface de l'échantillon, émis après collision avec les électrons primaires.

Des observations ont été réalisées à 20kV sur un microscope électronique à balayage VEGA3 du CIRIMAT. D'autres observations ont été réalisées en utilisant un microscope électronique FEG FEI QUANTA 250 de la plateforme CMEAB (Centre de Microscopie Electronique Appliquée à la Biologie, Toulouse). Les différents échantillons ont été observés à 10 kV et taille de spot N°2. Différentes conditions de préparation ont été utilisées selon les échantillons observés. Dans le cas des

nanoparticules seules, une goutte de suspension aqueuse du matériau nanocarboné à observer est déposée sur un plot MEB. La surface de celui-ci peut être observée directement après évaporation de l'eau. Les échantillons masque seul ou couvert de nanoparticules sont collés sur un support MEB et observés sous vide partiel.

Les échantillons à base de silicone sont collés sur un plot MEB, puis de la laque d'argent est déposée sur les bords de l'échantillon de manière à assurer le contact entre sa surface et le support MEB. Enfin une métallisation de 5 nm de platine est réalisée.

Microscopie électronique à transmission (MET) :

La microscopie électronique à balayage repose sur l'exposition d'un échantillon à un faisceau d'électrons et la détection des électrons ayant traversés celui-ci. Les effets d'interactions entre l'échantillon et les électrons permettent d'imager l'échantillon avec une résolution pouvant atteindre l'Angström. Il est possible d'étudier la composition chimique de l'échantillon grâce aux rayons X émis, de la même façon qu'en microscopie électronique à balayage.

Cette technique permet également d'exploiter les phénomènes de diffraction pouvant avoir lieu entre les électrons et l'échantillon analysé, les petits faisceaux provenant de la diffraction du faisceau d'électrons avec l'échantillon sont recombinés grâce à des lentilles pour former une image. Les échantillons ont été dispersés dans de l'éthanol et quelques gouttes déposées sur grille de cuivre de type Lacey Carbon. Les observations ont été réalisées à 120 kV avec un microscope électronique à transmission JEOL JEM 1400 Orius.

II.5. Analyse Brunauer, Emmett et Teller BET :

Cette analyse se déroule en plusieurs étapes. Tout d'abord, l'échantillon est dégazé sous vide afin d'éliminer les molécules d'eau et de CO_2 à sa surface, à une température contrôlée. L'échantillon peut ensuite être réfrigéré puis un gaz est injecté dans l'enceinte de mesure. Les mesures successives de quantités de gaz adsorbées, de pressions d'équilibres et de la température permettent de construire l'isotherme d'adsorption de l'échantillon ainsi que l'équation BET correspondante. Différentes informations peuvent être déduites de ces mesures, notamment la surface spécifique de l'échantillon analysé.

Les analyses ont été réalisées au CIRIMAT sur l'analyseur de surface et porosité - ASAP 2010 M. Ces mesures ont été effectuées sous azote. Un premier dégazage a été éffectué à 90°C après 2h, puis un second dégazage à 120°C après 10h.

II.6. Microscopie à force atomique AFM :

Cette méthode utilise une pointe fixée sur un microlevier capable de se déplacer dans toutes les directions. Un laser se réfléchit sur le microlevier sur lequel il est dirigé, et est détecté par une photodiode qui transforme le signal obtenu en signal électrique. Les interactions ayant lieu entre la pointe et la surface de l'échantillon se traduisent par des déviations du levier qui entraînent à leur tour des déviations du faisceau laser sur les récepteurs (Figure II.2). Plusieurs modes d'utilisation existent comme le mode contact où la pointe est légèrement en contact avec l'échantillon et balaye la surface avec une force constante. Il y a également le mode contact intermittent où le microlevier vibre à sa propre fréquence de résonnance et la pointe entre doucement en contact avec la surface de l'échantillon de façon intermittente. Enfin il y a un mode non contact où le microlevier vibre à la surface de l'échantillon mais la pointe n'entre pas en contact avec celui-ci. [296]

Lors d'une étude sur les propriétés mécaniques de la surface d'un échantillon en mode contact, le microlevier s'approche doucement de l'échantillon jusqu'à ce qu'une force de compression soit atteinte. Après une durée de contact fixée, la sonde se retire de l'échantillon et est ramenée à sa position initiale. Ces mesures sont traduites par une courbe de force (Figure II.2) représentant la relation force distance ayant lieu lors de l'approche (courbe en bleu), la compression et le retrait de la sonde de la surface de l'échantillon (courbe en rouge). De nombreuses informations peuvent être extraites d'une courbe de force, notamment des informations sur la topologie, l'adhésion ou la rigidité de surface de l'échantillon. La rigidité des matériaux est obtenue à partir de la pente mesurée sur la courbe qui renseigne sur la force nécessaire pour déformer le matériau étudié.

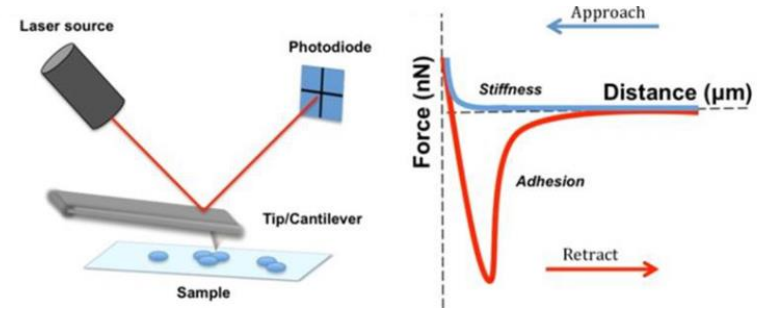


Figure II.2 : Principe de fonctionnement de l'AFM (à gauche). Exemple d'une courbe force distance (à droite) [297].

Les mesures AFM ont été effectuées en mode Quantitative Imaging (QI) sur un appareil Nanowizard III (JPK instruments Germany). Tout d'abord le microlevier LMCT (Bruker, Germany), sur lequel est fixé une pointe d'analyse, est placé sur le support microscope, le laser est aligné sur l'extrémité du microlevier où se trouve la pointe puis le faisceau est centré au milieu de la photodiode. Les leviers utilisés sont systématiquement calibrés en termes de sensibilité et de constante de raideur k. La constante de raideur est mesurée par méthode de bruit thermique, les valeurs de k vont de 0,591 à 0,796 N/m [298]. En mode contact-based et force spectro, le levier est doucement approché de la surface d'un échantillon référence lame de verre. Les mesures sont effectuées en milieu aqueux, une goutte d'eau désionisée est donc présente en surface de la lame de verre. Une fois en contact une mesure de déviation du levier (V) en fonction de la hauteur (nm) est effectuée. La pente qui correspond à la déformation mesurée d2 est déterminée sur la courbe obtenue. En soustrayant la déformation du levier d1, l'indentation δ = d2- d1 correspondant à la déformation du matériau est obtenue.

En considérant le comportement du microlevier comme un ressort, la loi de Hooke peut être appliquée :

$$F=kd$$

avec F la force appliquée (N), k la constante de raideur du microlevier (N/m) ; et d la variation de longueur correspondant à la déviation verticale du levier (m).

Ainsi la constante de raideur k du microlevier est déduite par la mesure de la déformation en fonction de la force appliquée. La constante de raideur théorique du levier utilisé est de 0,6 N/m, il est donc indispensable de mesurer la constante de raideur du levier utilisé avant chaque mesure, ici les constantes mesurées sont comprises entre 0,591 et 0,796 N/m.

Les analyses sont ensuite réalisées en mode Quantitative Imaging QI qui permet d'obtenir des courbes de force pour chaque point de contact entre la pointe du levier et l'échantillon [299]. Les mesures peuvent être plus ou moins précises selon la taille de la zone étudiée, le nombre de points de mesure et selon la durée de chaque point de mesure par exemple. Il s'agit donc de faire un compromis entre la précision voulue et la durée de l'analyse. Des zones de 10x10 µm² sont analysées avec une

résolution de 256 pixels, ainsi 65 536 courbes de force sont enregistrées pour chaque analyse AFM de la surface des échantillons. Les mesures sont réalisées en milieu aqueux, une goutte d'eau désionisée est posée sur la surface de l'échantillon, en dessous du microlevier. La force maximale appliquée est de 2nN, avec un levier de constante de raideur compris entre 0,591 et 0,796 N/m, une vitesse d'approche de 30 µm/s avec une longueur z de 0,28 µm. Les différentes données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel JPK Data Processing software version 6 afin de produire des cartographies de topographie, d'adhésivité et de rigidité. En mode QI, des courbes de force sont enregistrées sur chaque pixel, et la hauteur, l'adhésivité et la rigidité peuvent être extraites de ces courbes de force.

II.7. Spectroscopie Raman :

La spectroscopie Raman se base sur le phénomène de diffusion inélastique de la lumière par la matière. Une onde excitatrice monochromatique interagit avec le matériau et porte ses molécules à un état énergétique élevé et de courte durée de vie. La désexcitation de ces molécules correspond au phénomène de diffusion Raman et permet l'analyse de la structure externe et de la composition moléculaire du matériau.

Les échantillons ont été caractérisés avec un microscope confocal RAMAN Labram HR 800 Yvon Jobin Les échantillons ont été exposé à un rayonnement laser continu fourni par un laser He à 633 nm d'une puissance de 8 mW. Des filtres d'atténuation ont été utilisés pour éviter toute dégradation des matériaux, abaissant la puissance laser par 10. Les échantillons ont été placés sous un microscope BX 41 Olympus et focalisée sous un objectif x100 d'ouverture numérique de 0,90 qui conféré au système une résolution latérale de 0,858 µm ($1.22x\lambda/O.N$) et une résolution axiale de 3,12 µm ($4x\lambda/O.N^2$). Les cartographies ont été réalisées à l'aide d'une table motorisée XYZ avec une précision de 0.1 µm et un pas de mesure de 3 µm sur l'axe X et Y et de 2 µm en Z. Un étalon au silicium à permis de calibrer en fréquence l'équipement en utilisant la raie d'ordre 1 du silicium à 520,7 cm^{-1} avec une précision à ± 1 cm^{-1}. Le spectre de chaque point a été acquis grâce à un réseau de 600 tr/mm avec une résolution spectrale de 1 cm^{-1} et collecté avec un détecteur à puits quantique refroidit à -60°C par double effet pelletier (CCD Synapse). Chaque spectre des cartographies a été acquis avec un temps de 30 secondes et 1 accumulation. Le traitement des données a été effectué à l'aide du logiciel Labspec 6.

II.8. Angle de contact :

L'angle de contact mesure la capacité d'un liquide à mouiller un solide. C'est l'angle formé par la surface d'un solide avec la surface d'un liquide selon leur ligne de contact. Si l'angle est inférieur à 90°, la surface est hydrophile, au contraire si l'angle est supérieur à 90° elle est hydrophobe (Figure II.3).

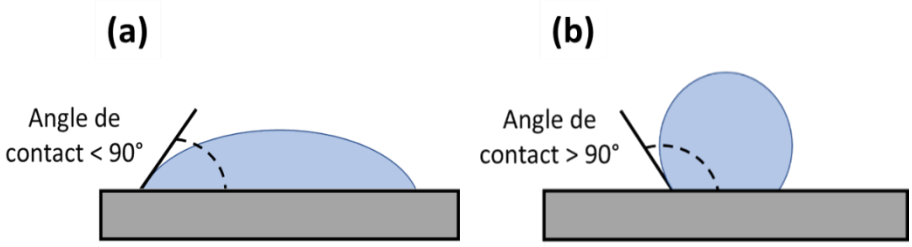


Figure II.3 : angle de contact (a) surface hydrophile ; (b) surface hydrophobe.

Les mesures d'angle de contact sont réalisées avec un appareil Drop Shape Analyzer ; modèle DSA 30S, KRUSS. Le volume de la goutte d'eau déionisée déposée est de 2 µL et l'angle est lu 2 s après dépôt de la goutte sur la surface.

II.9. Texturomètre :

Il s'agit d'un bras mécanique (dont on règle la force d'application ainsi que la distance d'enfoncement), qui pénètre et ressort du polymère en mesurant la résistance rencontrée en entrée (compression) et la résistance mesurée en sortie (adhésion). Cette technique est le plus souvent utilisée pour caractériser des produits alimentaires, cosmétiques, ou pharmaceutiques. [300]

Cette analyse consiste à appliquer une force, dont la valeur est paramétrée, en surface d'un échantillon en enregistrant les réponses de force, durée et déformation rencontrées. L'application de la force sur l'échantillon analysé se fait par l'intermédiaire d'une sonde cylindrique reliée à un analyseur de texture. La mesure comporte un cycle de descente de la sonde qui correspond à l'application d'une charge sur l'échantillon, puis d'un cycle de décharge avec la remontée de la sonde (Figure II.4). Les résultats sont fournis sous forme de graphique présentant la force mesurée en fonction de la distance ou de la durée de l'analyse. Ce type d'analyse permet d'étudier différents paramètres de l'échantillon comme sa consistance qui peut être obtenue à partir de la force max mesurée lors du cycle de charge, cela correspond à la résistance rencontrée par la sonde lors de la pénétration dans l'échantillon. Le cycle de remontée de la sonde permet de caractériser l'adhésivité de l'échantillon. L'aire sous la courbe permet d'obtenir des informations sur l'adhésivité, cependant l'allure des courbes varie beaucoup selon l'échantillon mesuré. Il peut être plus adapté de travailler en termes de force minimale Fmin mesurée lors du cycle de décharge pour permettre la comparaison entre les mesures et la caractérisation de l'adhésivité du matériau étudié.

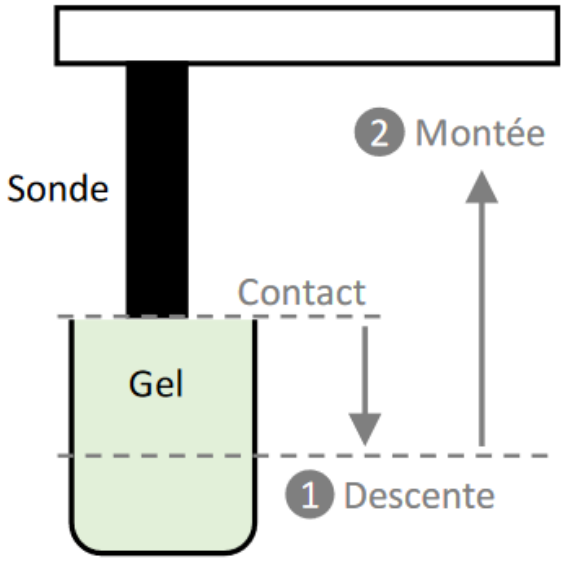


Figure II.4 : Principe de l'analyse de texture [301].

Le texturomètre (TA.XT Plus Texture Analyser, Texture Technologies, USA) est utilisé pour étudier les silicones choisis pour l'élaboration de nos matériaux. Un puits d'une plaque de culture 12 puits contenant 0,6 g de silicone à différents degrés de polymérisation, est placé sous le bras mécanique de l'appareil. Les résistances rencontrées par le bras mécanique en entrée (compression) et en sortie (adhésion) du silicone sont mesurées. Les paramètres utilisés sont : vitesse avant test : 2 mm/s, vitesse de test : 1 mm/s, vitesse après test : 2 mm/s, enfoncement : 0,2 mm, force : 0,1 g, sonde P/6 28 mm² en aluminium.

II.10. Microorganismes et conditions de croissance :

Les milieux de culture Luria Bertany (LB) liquide et agar (Fisher Scientific), et les plaques de culture 6-12-24 et 96 puits Thermo Scientific sont utilisés pour réaliser les tests antimicrobiens [302].

Les tests antibactériens sont réalisés sur les souches de bactéries gram négatives *P. aeruginosa* PAO1, et gram positives *S. aureus* USA-300 et les tests antiviraux sont réalisés sur le virus SARS-CoV-2. Les souches bactériennes sont conservées au laboratoire dans une solution de glycérol à -70°C.

Tout d'abord, les bactéries sont inoculées dans 2 mL de milieu nutritif LB liquide à l'aide d'une pipette. Ces bactéries sont placées à 37°C et 160 rpm pendant une nuit, puis 200 µL sont prélevés et remis en suspension dans 5 mL de milieu LB liquide. Après que la sous-culture ait passé 3 heures à 37°C et 160 rpm, la densité optique de la suspension bactérienne est mesurée à 600 nm pour s'assurer que les bactéries se situent en phase de croissance exponentielle (DO comprise entre 0,5 et 1). La suspension est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 5 000 rpm, le surnageant est éliminé et les bactéries du culot sont remises en suspension dans du milieu tampon phosphate (PBS « Phosphate Buffer Salin ») (pH 7,3). L'opération est répétée 3 fois pour assurer l'élimination d'éléments nutritifs dans la suspension bactérienne.

Des tests de formation de colonies (CFU) ont été réalisés sur les suspensions de nanoparticules de carbone et sur les matériaux silicones recouverts de nanoparticules de carbone. La concentration des suspensions bactériennes est ajustée selon le test effectué.

II.11. Test de formation de colonies (colony forming units, CFU) :

Pour tester l'activité intrinsèque de suspensions de nanomatériaux carbonés (NMC), la concentration des suspensions de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* est ajustée à 10^7 et 10^8 bact/mL respectivement.

Ces tests ont été réalisés avec l'incubation à 37°C de 250 µL de suspension bactérienne avec 250 µL de NMCs en suspension dans du PBS à une concentration de 150 µg/mL. Seuls les puits du milieu d'une plaque de culture 24 puits sont utilisés, les autres contiennent 1 mL de milieu PBS pour éviter les problèmes d'évaporation en cours d'expérience. Puis les plaques sont emballées avec du papier aluminium et incubées pendant 24 heures à 37°C et 160 rpm.

Les suspensions incubées sont ensuite diluées dans du PBS à $1/20^4$ pour la suspension de *P. aeruginosa* et $1/20^3$ pour la suspension de *S. aureus* (50 µL sont prélevés et dilués dans 950 µL de milieu PBS pour une dilution de facteur 20 et ainsi de suite). 100 µL de ces dilutions sont ajoutés aux puits de plaques de culture 6 puits où chaque puits contient 4 mL de milieu nutritif LB agar et 3 billes. Les plaques sont agitées pour disperser les bactéries dans les puits à l'aide des billes, puis elles sont retournées, recouvertes de papier aluminium et incubées pendant une nuit à 37°C. Le lendemain le décompte visuel des colonies de bactéries formées permet d'évaluer l'activité antibacterienne des matériaux par rapport à une référence. La référence correspond ici à l'incubation de 250 µL de PBS seul avec la suspension de bactérie.

L'évaluation de l'activité antibactérienne des nanomatériaux carbonés déposés sur silicone a été réalisée avec l'incubation de 75 µL de suspension bactérienne sur les matériaux traités. La concentration des suspensions de *P. aeruginosa* et de *S. aureus* utilisés est ajustée à 10^5 bact/mL et 10^6 bact/mL respectivement. Seuls les puits du milieu des plaques de culture 12 puits sont utilisés, les autres contiennent 2 mL de milieu PBS pour éviter les problèmes d'évaporation. Les plaques sont emballées avec du papier aluminium et incubées pendant 24 heures à température ambiante.

Les suspensions sont ensuite diluées dans du PBS à $1/20^2$ (1425 µL de milieu PBS sont ajoutés aux puits contenant les matériaux pour la première dilution 1/20 puis 50 µL sont prélevés et dilués dans

950 µL de PBS). 100 µL de ces dilutions sont ajoutés aux puits de plaques de culture 6 puits où chaque puits contient 4 mL de milieu nutritif LB agar et 3 billes. Les plaques sont agitées pour disperser les bactéries dans les puits à l'aide des billes, puis elles sont retournées, recouvertes de papier aluminium et incubées pendant une nuit à 37°C. Le lendemain le décompte visuel des colonies de bactéries formées permet d'évaluer l'activité antimicrobienne des matériaux par rapports à une référence. Dans ce cas la référence correspond à l'incubation de 75 µL de suspension bactérienne sur un matériau silicone seul (sans dépôt de NMC).

Trois séries de tests avec trois réplicats par condition sont effectués. Après décompte des colonies bactériennes, les données sont exprimées en nombre de cellules présentes dans 1 mL de milieu en fin d'incubation. Ces données sont évaluées à l'aide de la variance ANOVA (2 facteurs) qui permet d'évaluer statistiquement l'action des échantillons sur les microorganismes. Une probabilité de valeur $p<0,05$ est considérée comme statistiquement significative. Chaque condition est testée en triplicat et trois tests indépendants sont réalisés.

II.12. Test de l'activité antivirale (Tissue Culture Infective Dose 50, $TCDI_{50}$) :

L'activité antivirale des NMCs sur silicone ou sur masques a été évaluée avec le test Tissue Culture Infective Dose 50 (TCID50), c'est à dire la dose de virus provoquant des effets cytopathiques sur 50% des cellules en culture[303]. Le principe de ce test est présenté en

Figure II.*5*. Les morceaux de masques testés sont collés avec du scotch carbone au fond des puits de la plaque de culture 24 puits dans laquelle est effectué le spray pour pouvoir appliquer la solution virale sur le masque sans que celui-ci ne flotte dans le milieu. La couche du milieu du masque, sur laquelle sont les nanoparticules, est testée au contact du virus. Les matériaux ont été testés sur des particules infectieuses SARS-CoV-2 (souche ancestrale BetaCoV/France/IDF0372/2020), et les cellules en culture utilisées ici sont la lignée Vero E6, issue de cellules épithéliales rénales de singe, infectables par le SARS-CoV-2. La dose optimale de virus à utiliser pour les tests a été déterminée en incubant 3 doses de SARS-CoV-2 (10^3, 10^6 et 10^7 PFU) dans 500 µL de milieu de culture DMEM et en évaluant le nombre de particules virales infectieuses après 6, 24 et 48 heures par test TCID50.

Tout d'abord 10^6 particules infectieuses de SARS-CoV-2 dans 500 mL de milieu de culture DMEM sont déposées sur le matériau testé pendant 24 h. Un puits sans matériau avec traitement antiviral de surface est utilisé comme référence interne. En effet, en absence de cellules dans lesquelles se répliquer, la fragilité intrinsèque du virus conduit à une diminution spontanée de son activité infectieuse dans le temps, et ceci doit être pris en compte. Un autre puits contenant le matériau non traité est aussi utilisé afin de renseigner l'activité intrinsèque du matériau testé.

25 000 cellules en culture sont placées dans la moitié des puits d'une plaque 96 puits. Nous utilisons une demi plaque par échantillon, 12 conditions sont testées en quadruplicat. Le milieu utilisé est retiré par retournement, les cellules restent au fond des puits, et 100 µL de milieu d'infection sont déposés dans tous les puits sauf dans la première rangée.

Après les 24 heures d'incubation du matériau avec le virus, celui-ci est dilué au $1/10^{ème}$ dans du milieu d'infection. 146 µL du virus dilué sont ajoutés dans la première rangée vide de la plaque 96 puits contenant les cellules. 12 dilutions successives sont alors réalisées en transférant 46 µL d'une rangée à la suivante et en ajoutant 100 µL de milieu d'infection, en commençant avec première rangée. Les 46 µL de la dernière dilution sont jetés et chaque puits contient alors 100 µL de milieu. La plaque est ensuite incubée 1 heure à 37°C, puis 100 µL de milieu d'infection sont ajoutés aux puits. La plaque est ensuite incubée 3 jours à 37°C.

Les différents puits sont ensuite observés au microscope pour lire l'effet cytopathique ECP dans chacun des 4 réplicats pour chaque dilution. Le nombre de puits positifs est noté pour chaque dilution. Ces résultats sont ensuite exprimés en valeur $TCID_{50}$/mL.

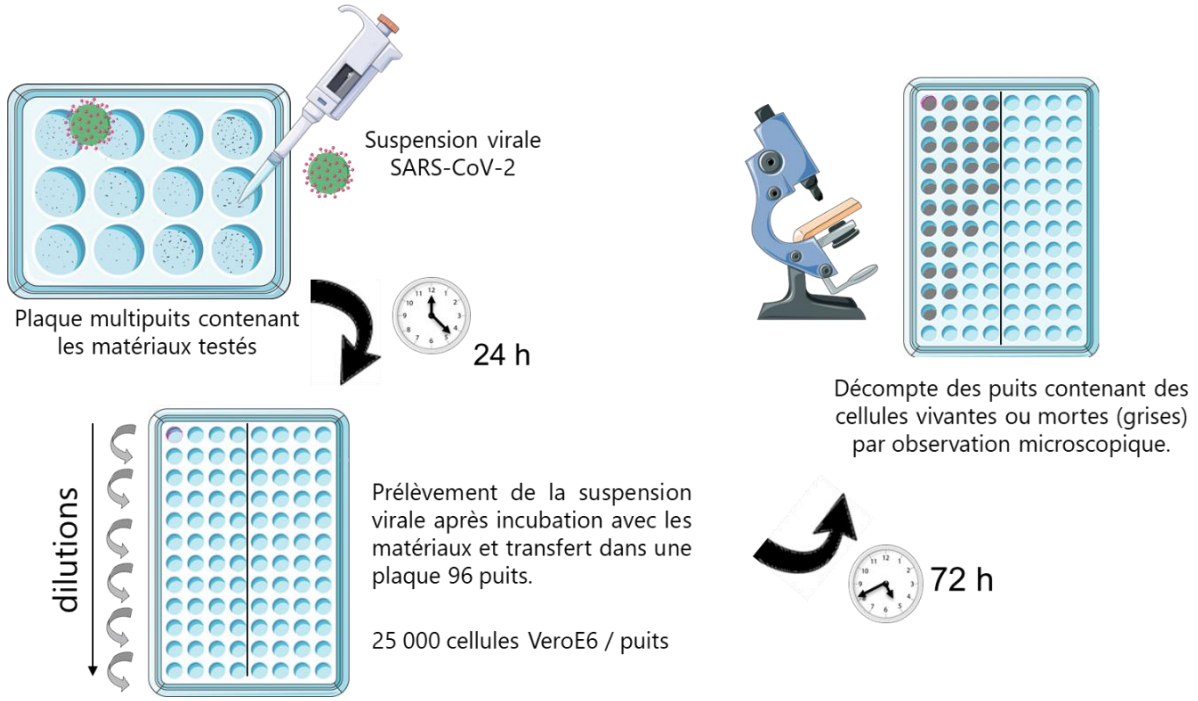


Figure II.5 : Schéma représentant le principe d'un test $TCID_{50}$.

Les NMCs pouvant potentiellement se révéler intrinsèquement cytotoxiques pour les cellules Vero E6, leur cytotoxicité a été évaluée dans le cas d'un scénario "pire cas" correspondant au décrochage de la totalité des NMCs contenus dans un puits (et donc initialement présents à la surface du matériaux testé) et leur transfert dans le liquide, puis finalement leur mise en contact direct avec les cellules Vero E6. Dans ce cas, la toxicité exercée par les NMCs pourrait se confondre avec l'effet cytopathique du virus sur les cellules Vero E6 et conduire à un résultat erroné. Cela concerne surtout les échantillons de type masque, car ce scénario est hautement improbable pour les échantillons de silicone, ces derniers ayant été nettoyés aux ultrasons avant de réaliser les tests.

Un puits silicone est l'échantillon recevant la quantité maximale de particules parmi les différents échantillons élaborés, avec un dépôt maximum d'environ 75 µg (on dépose 2 mg sur des plaques de culture 12 puits). Les cellules Vero sont incubées dans des plaques 96 puits avec des suspensions de NMCs de concentrations allant de 1,25 à 150 µg/mL (dilutions d'une suspension mère à 300 µg/mL) pour tester un scénario en excès de NMCs par rapport à la quantité maximale pouvant se détacher. La mort cellulaire est évaluée après 72 heures en mesurant la libération de lactate déshydrogénase (LDH) dans le milieu de culture.

Chapitre III

Elaboration des dépôts de nanomatériaux carbonés sur silicone

III.1. Stratégie :

L'élaboration de matériaux antimicrobiens doit répondre à certaines problématiques comme la non-toxicité et la durabilité de l'action. Pour obtenir une action durable dans le temps et s'affranchir des problèmes de toxicité éventuels liés à des nanoparticules relarguées, nous avons décidé d'utiliser un matériau support polymère pour la capacité des polymères à bloquer les nanoparticules en leur sein et également car certains polymères peuvent faire preuve d'une activité antimicrobienne intrinsèque. Plus particulièrement nous nous orientons vers une application biomédicale, ainsi nous privilégions le choix d'un support silicone pour réaliser nos matériaux, car ce polymère est employé dans de nombreux dispositifs médicaux [304–306]. D'après la bibliographie, les NMCs développent leurs mécanismes antimicrobiens au contact des microbes [12] (voir Mécanismes antimicrobiens des nanomatériaux carbonés. Ainsi, permettre des contacts entre les microorganismes et les NMCs paraît indispensable pour conférer l'activité antimicrobienne à la surface du matériau traité. La plupart des publications présentant l'élaboration de matériaux antibactériens à base de nanoparticules de carbone et de polymère, utilisent des techniques introduisant les particules dans toute la matrice utilisée, que ce soit pour la fabrication de matériaux massifs ou de films minces/revêtements [59]. Ces techniques conduisent généralement au revêtement des particules par le polymère. Seuls quelques rares techniques, comme une oxydation UV/O_3 ou une ablation laser du matériau, sont mentionnées pour permettre *a posteriori* de faire affleurer des particules non recouvertes de la matrice polymère [31,32].

Notre stratégie pour développer un matériau antimicrobien est de bloquer des NMCs à la surface de silicone, de manière à les laisser affleurer. L'objectif est d'obtenir une action durable dans le temps car la quantité de NMCs reste stable (pas de relargage, pas de dissolution), de s'affranchir des problèmes de toxicité éventuels liés à des nanoparticules relarguées, et surtout d'assurer un contact avec les microorganismes et ainsi permettre une activité antimicrobienne par contact. Pour cela avons décidé d'utiliser une méthode de dépôt par pulvérisation (spray coating). Cette technique consiste à utiliser un aérographe pour pulvériser une suspension de NMCs en surface du polymère à traiter.

Ce chapitre rassemble toutes les caractéristiques des dépôts de NMCs sur les matériaux testés (silicones, masque respiratoire), en se focalisant tout d'abord sur les nanomatériaux carbonés utilisés, puis sur l'étude de la cinétique de polymérisation du silicone, avant de se concentrer sur l'élaboration des dépôts ainsi que leur caractérisation.

III.2. Caractérisation des nanomatériaux carbonés utilisés dans ces travaux

Quatre types de nanomatériaux carbonés (principales caractéristiques reportées dans le *Tableau 3.1* ont été synthétisés et utilisés : des nanotubes de carbone biparois bruts (DWNTs B), des nanotubes de carbone biparois oxydés (DWNTs Ox) préparés à partir du lot de DWNTs B, du graphène à quelques feuillets (FLG) et enfin de l'oxyde de graphène (GO).

Les DWNTs B ont été synthétisés au CIRIMAT par dépôt chimique catalytique en phase vapeur. L'oxyde de graphène a lui aussi été synthétisé au CIRIMAT à partir de graphite. Le FLG est quant à lui de source industrielle (voir chapitre 2).

La caractérisation de ces échantillons par les techniques les plus adaptées pour chacun d'entre eux est présentée ici.

Tableau 3.1: Nanomatériaux carbonés utilisés dans ces travaux et leurs principales caractéristiques physico-chimiques : teneur en carbone, en oxygène, rapport d'intensité des bandes D et G (spectroscopie Raman), surface spécifique (BET), et signalement de la présence d'impuretés, le cas échéant. Les données d'analyse élémentaires sont issues d'analyses par XPS. (1) présence des éléments Co et Mo analysés à 0,6% m pour chaque élément ; (2) présence des éléments S (2% m) et Mn (3% m). Analyses XPS réalisées au LCPME, Nancy.

Référence	**C%m**	**O%m**	**ID/IG**	**SSA (m^2/g)**	**Impuretés**
DWNT B	96	3	0.26	980	Co, Mo
DWNT Ox (1)	84	16	0.37	504	(Co, Mo)
FLG	95	5	0,10	3-4	
GO (2)	66	29	1,27	8	Mn, S

III.2.1 Nanotubes de carbone bruts et oxydés

Sur la Figure III.1 sont comparées les observations au MEB des DWNT bruts et oxydés. On distingue dans le cas des nanotubes bruts de larges amas (jusqu'à 5 microns) desquels émergent ce qui ne peut correspondre à cette échelle qu'à des faisceaux de nanotubes (Figure III.1 (a)). Dans le cas des nanotubes oxydés, on constate que le dépôt se présente de manière beaucoup plus compacte, même si des amas de tailles similaires sont toujours observables.

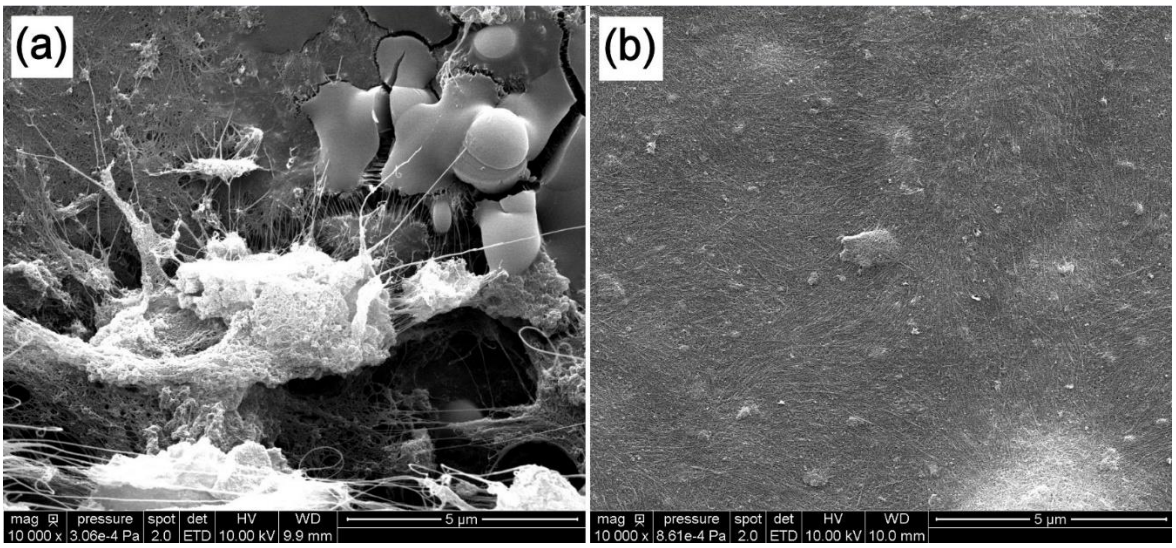


Figure III.1 : Observations au MEB des nanotubes de carbone bruts (a) et oxydés (b). 10 kV.

La Figure III.2 compare ces mêmes échantillons au MET. Ces images montrent dans les deux cas la présence de 3 espèces différentes : (1) des nanotubes présents sous forme de faisceaux, bien que des nanotubes individuels (au moins sur une certaine longueur) soient aussi visibles ; (2) des amas de forme très différente, constitués d'un mélange de carbone désorganisé et de nanotubes ; (3) des nanoparticules de catalyseur qui apparaissent sous la forme de taches à très fort contraste. Des travaux antérieurs de l'équipe NNCED du CIRIMAT ont montré que les amas de carbone désorganisé sont issus de la décomposition catalytique du méthane sur la magnésie qui constitue le support sur lequel sont générées les nanoparticules catalytiques de Co:Mo [307]. D'autres travaux ont démontré que les nanoparticules métalliques de Co:Mo sont encapsulées de manière étanche dans des coques de carbone concentriques (oignons de carbone), et donc parfaitement inaccessibles [308] . Enfin, on note dans le cas des DWNTs Ox (Figure III.2 (c, d)) que les nanotubes sont partiellement recouverts de fragments de carbone oxydé (cette conclusion est elle aussi issue de travaux antérieurs de l'équipe NNCED) [309]. Les nanotubes oxydés contiennent aussi une proportion plus faible de résidus

catalytiques de Co et Mo, qui sont partiellement éliminés lors de l'oxydation par HNO_3. Les nanotubes échantillons comportent généralement 15% de nanotubes monoparoi, 80% de nanotubes biparois et 5% de nanotubes triparois [284]. Le diamètre externe des DWNTs individuels varie globalement entre 1 et 3 nm, celui des faisceaux dépassant rarement quelques dizaines de nm.

L'éclairage apporté par le MET permet de mieux comprendre ce que l'on observe au MEB puisqu'il s'agit exactement du même échantillon, mais préparé de manière très différente. Dans le cas du MET, les nanotubes sont aussi dispersés que possible et il est facile d'observer tous les composants de l'échantillon. Les échantillons sont préparés à partir de prélèvements réalisés immédiatement après extraction des nanotubes et n'ont donc jamais été séchés après cette étape. Lors de la préparation des échantillons pour le MEB, le nanomatériau est beaucoup plus compact du fait de la forte agglomération qu'il subit lors du séchage par lyophilisation avant sa préparation pour l'observation.

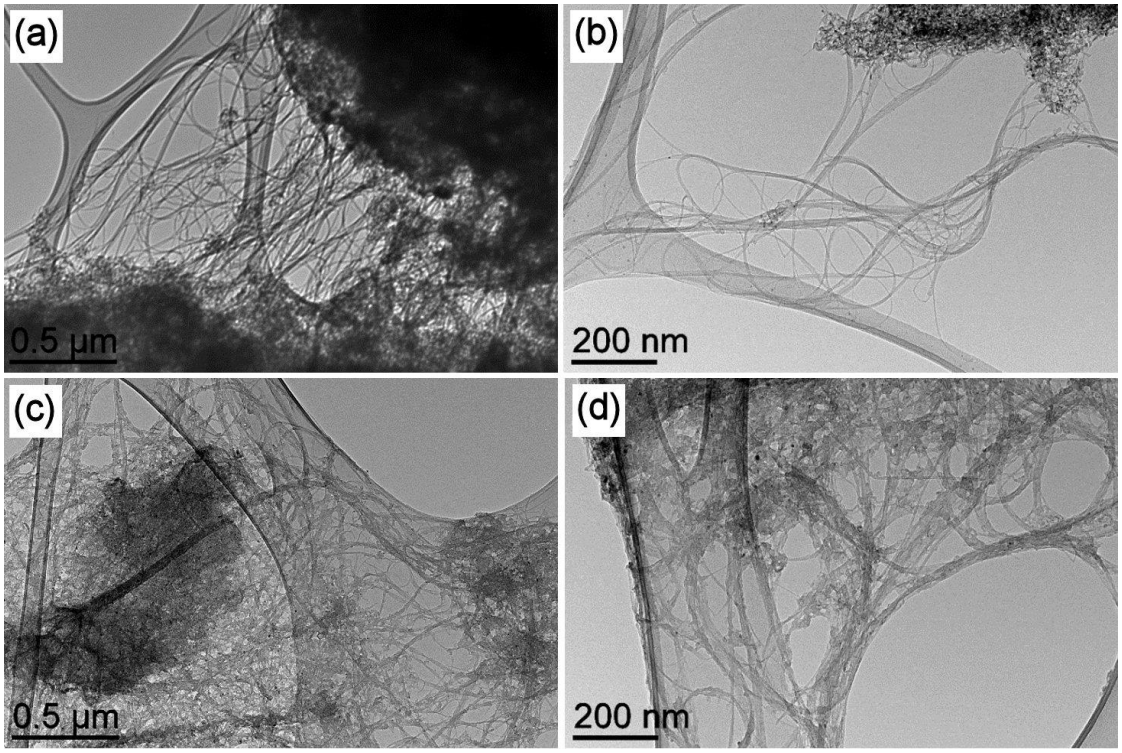


Figure III.2 : Observations au MET des nanotubes de carbone bruts (a, b) et oxydés (c, d). 120 kV.

L'analyse par XPS des échantillons de DWNTs bruts et oxydés est montrée sur la Figure III.3. La comparaison des bandes C1s Figure III.3(a, b)) fait essentiellement ressortir l'augmentation de la contribution du carbone de type sp^3 avec l'oxydation, ainsi que l'augmentation de la contribution des fonctions carboxyliques à 288,3 eV. Dans les deux cas, cette bande est très caractéristique d'un carbone majoritairement sous hybridation sp^2. Cette évolution de la teneur en oxygène est d'autant plus flagrante lorsque l'on s'intéresse à la bande O1s (Figure III.3(c, d)) dont l'intensité augmente très fortement.

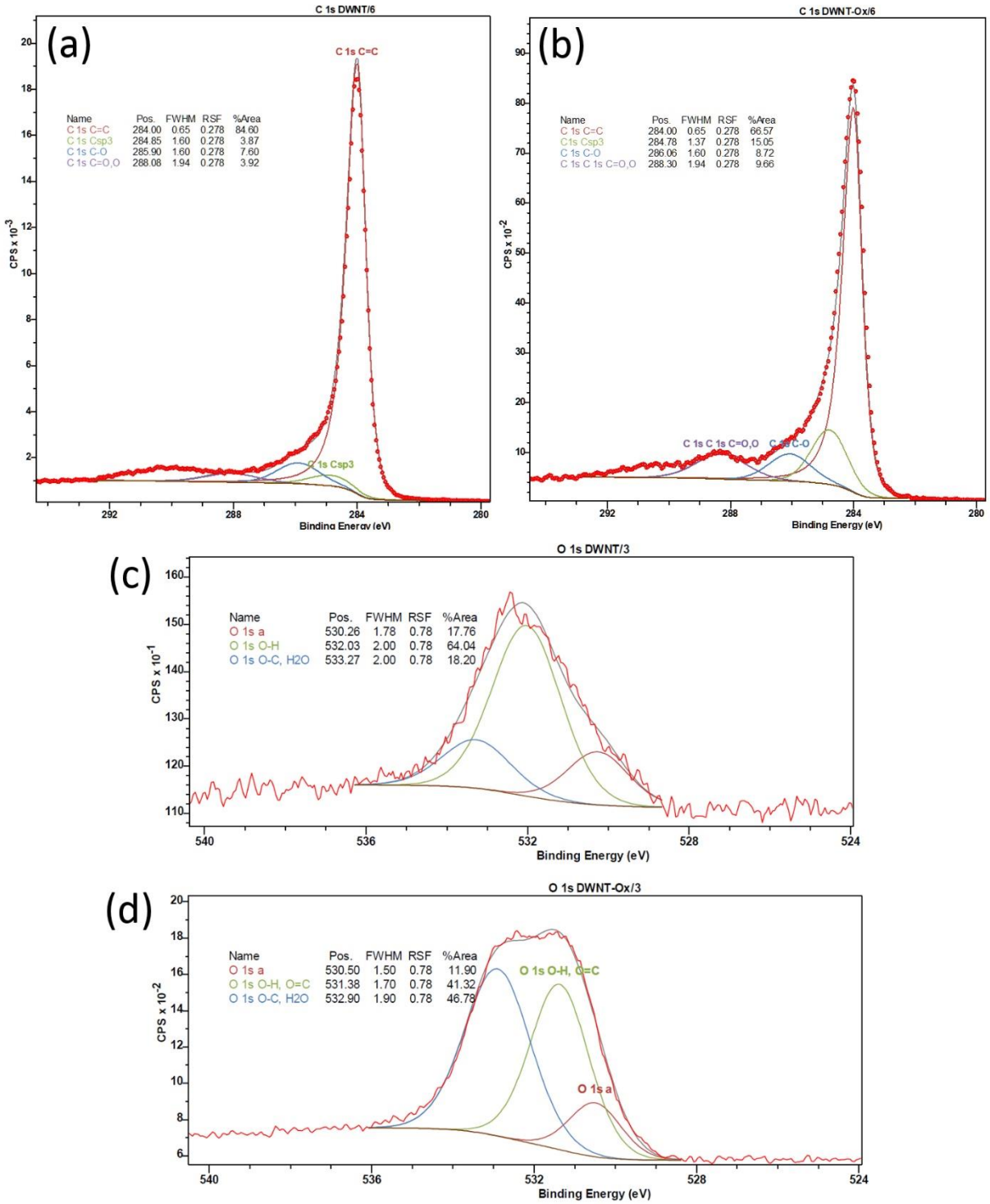


Figure III.3 : Analyse XPS des échantillons de DWNTs bruts (a, c) et oxydés (b, d) : (a) bande C1s des DWNTs bruts, (b) bande C1s des DWNTs oxydés, (c) bande O1s des DWNTs bruts et (d) bande O1s des DWNTs oxydés.

L'analyse thermogravimétrique sous air (Figure III.4) met en évidence deux différences principales entre les DWNTs bruts (Figure III.4 (a)) et oxydés (Figure III.4 (b)) : la perte de masse démarre dès 80°C pour les DWNTs oxydés alors qu'elle ne débute vraiment que vers 200°C dans le cas des nanotubes bruts. Cette perte de masse plus précoce est expliquée par la décomposition des

fonctions oxygénées (acides carboxyliques en particulier) qui se forment lors de l'oxydation par HNO_3 [3]. La perte de masse principale, liée à la combustion des nanotubes, se produit vers 430°C pour les DWNTs B alors qu'elle est légèrement retardée dans le cas des DWNTs Ox (470°C). Ceci peut s'expliquer par l'élimination d'une partie des métaux lors de l'oxydation. En effet, ces métaux catalysent aussi l'oxydation des nanotubes. Il est difficile de corréler les pertes de masse à l'analyse élémentaire du fait de la superposition de plusieurs phénomènes conduisant à une prise de masse (oxydation des résidus de catalyseur) ou à une perte de masse (décomposition des fonctions oxygénées conduisant à l'élimination conjointe de carbone et d'oxygène, combustion du carbone en tant que tel).

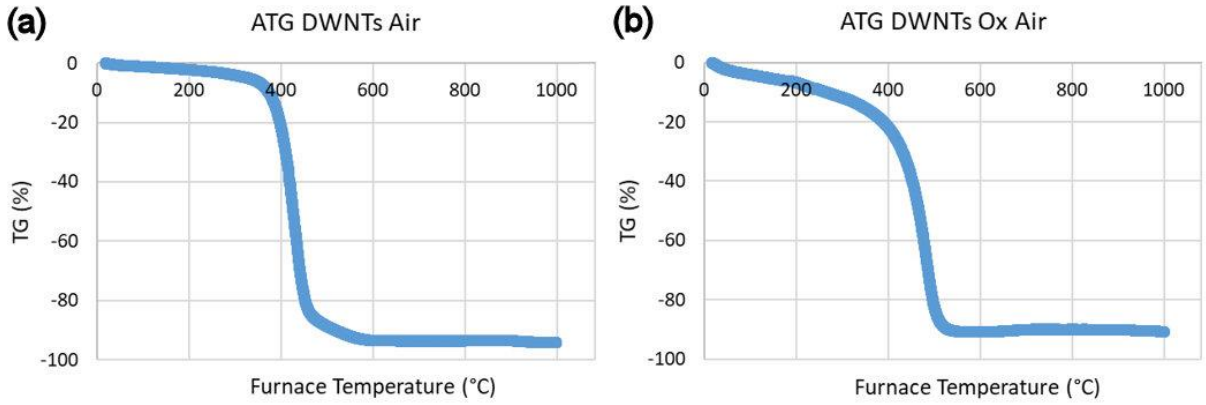


Figure III.4 : Analyse thermogravimétrique sous air (1°C/min) (a) des nanotubes de carbone bruts et (b) des nanotubes de carbone oxydés.

L'analyse comparative des DWNTs bruts et oxydés par adsorption d'azote est montrée sur la Figure III.5. Sur cette figure sont représentés les isothermes d'adsorption et de désorption. Les données permettent de calculer la surface spécifique, estimée à 980 m^2/g dans le cas des DWNTs B et seulement 504 m^2/g après oxydation. La diminution de surface spécifique peut s'expliquer essentiellement par la plus forte agglomération des DWNTs lors du séchage dans le cas des DWNTs Ox. Les isothermes d'adsorption et de désorption obtenus pour les matériaux DWNTs B et DWNTs Ox sont de type IV, caractéristiques de matériaux mésoporeux. Ils présentent une augmentation très progressive de la quantité de gaz adsorbée pour les pressions relatives les plus basses, c'est-à-dire, inférieures à 0,4. Ce domaine est généralement attribué à l'adsorption monomoléculaire : à la fin de celui-ci, la surface du matériau est entièrement recouverte d'une couche de molécules de gaz adsorbée. Pour les pressions relatives plus élevées, la surface du solide se recouvre d'une couche qui s'épaissit progressivement : l'adsorption est multimoléculaire, En fin d'isotherme, il y a une augmentation rapide de l'adsorption correspondant à une condensation du gaz par capillarité dans les mésopores (tous les pores finissent par se remplir). Ce phénomène n'est pas totalement réversible et entraîne l'apparition d'une hystérésis, c'est-à-dire un décalage de l'isotherme de désorption par rapport à l'isotherme d'adsorption.

Les différences de formes entre les isothermes des DWNTs B et DWNTs Ox peuvent s'expliquer par l'ouverture des nanotubes (au moins pour une partie d'entre eux) au cours de l'oxydation, qui donne accès au canal interne de ces derniers.

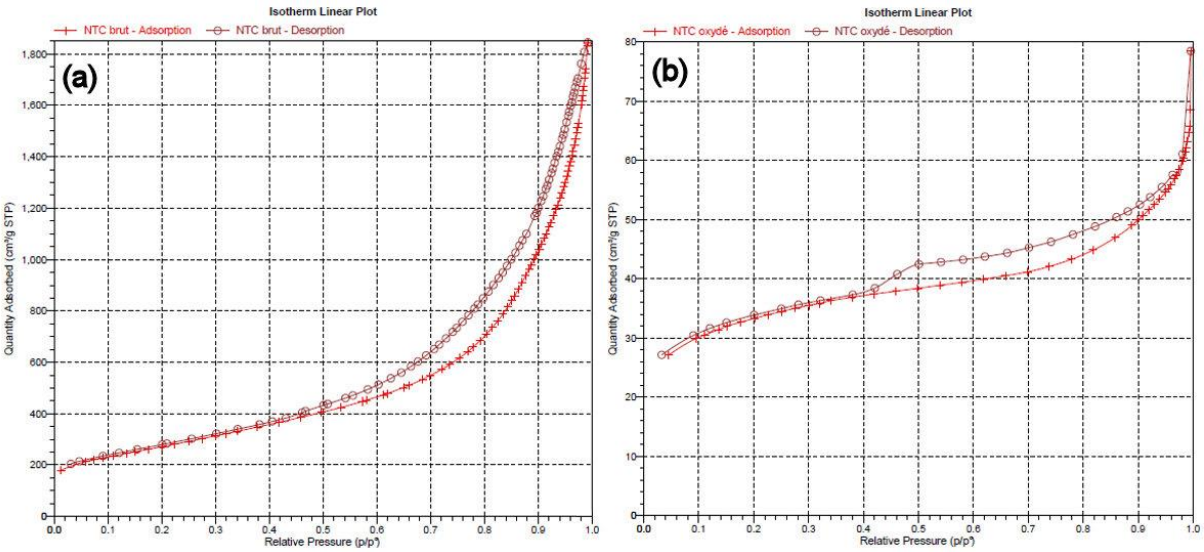


Figure III.5 : Analyse par adsorption d'azote (a) des nanotubes de carbone bruts et (b) des nanotubes de carbone oxydés.

L'analyse Raman des nanotubes de carbone Figure III.6 met en évidence plusieurs différences. Pour des conditions d'analyse identiques (acquisition de 30 secondes), le signal est environ 3 fois plus intense dans le cas des DWNTs bruts (Figure III.6 (a)).

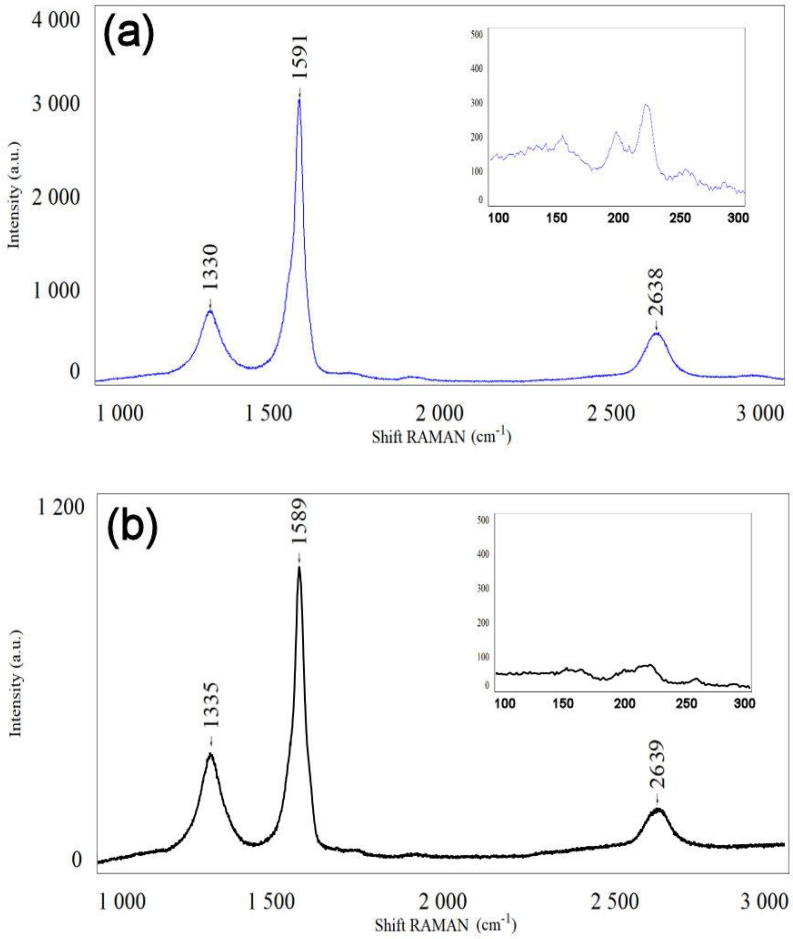


Figure III.6 : Analyse par spectroscopie Raman (a) des nanotubes de carbone bruts (encart : gamme des RBM) et (b) des nanotubes de carbone oxydés (encart : gamme des RBM).

La qualité structurale est généralement mesurée par le rapport d'intensité des bandes D (carbone de type sp^3, représentatif des défauts de structure dans les nanotubes de carbone, 1330 cm^{-1}) et G (carbone de type sp^2, 1591 cm^{-1}). Le rapport ID/IG est de 0,18, ce qui traduit une relativement bonne qualité structurale des DWNTs bruts. En revanche, dans le cas des DWNTs oxydés, le rapport ID/IG augmente à la valeur de 0,37, ce qui met en évidence une altération du réseau carboné hexagonal dans ces nanotubes. On note aussi pour ces deux échantillons la présence de la bande G' (environ 2640 cm^{-1}). Finalement, on peut relever l'atténuation des signaux RBM (modes de respiration radiale, très sensibles au diamètre des nanotubes de carbone) dans le cas des DWNTs oxydés, très probablement liée à leur endommagement, si ce n'est à la disparition de certains d'entre eux.

III.2.2 Graphène à quelques feuillets (FLG) et oxyde de graphène

Rappelons tout d'abord que le FLG est d'origine industrielle et est fourni sous forme de poudre contenant du déoxycholate de sodium afin de faciliter sa redispersion/stabilisation dans l'eau. Pour nos travaux, l'élimination du déoxycholate de sodium est nécessaire car cette molécule détergente est généralement cytotoxique. Le FLG est donc préalablement lavé à l'eau désionisée (sur membrane de filtration de porosité 0,45 µm).

L'observation au MEB (Figure III.7) du FLG (Figure III.7 (a)) et du GO (Figure III.7 (b)) met bien en évidence la nature 2D de ces nanomatériaux. La présence de feuillets superposés est observable dans ces conditions (présence de marches), même s'il est impossible de les dénombrer de manière précise. Cependant, la transparence aux électrons (surtout visible dans le cas du FLG) permet de confirmer qu'il s'agit bien de FLG. Dans le cas du GO, beaucoup moins conducteur, la métallisation qu'il a été nécessaire de réaliser pour permettre l'observation de l'échantillon est visible sur l'image. Dans les deux cas, les dimensions latérales varient globalement entre 1 et 5 microns. Des particules plus larges (jusqu'à 10 microns) sont occasionnellement présentes dans ces deux échantillons.

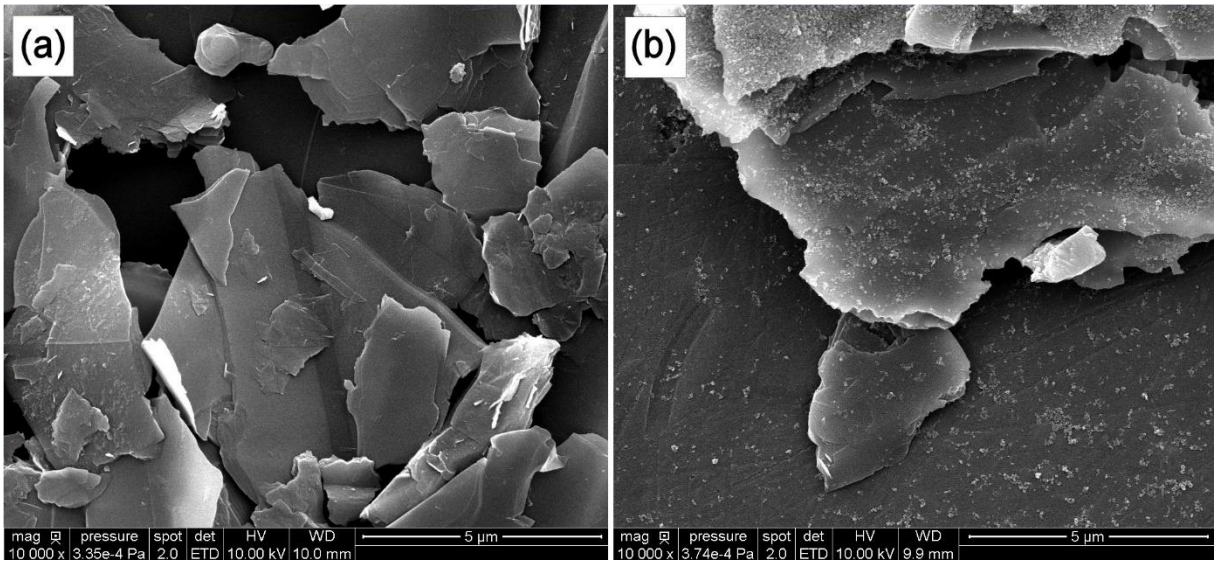


Figure III.7 : Observations au MEB des échantillons (a) de FLG et (b) de GO (10kV).

Comme dans le cas des nanotubes, les observations au MET (Figure III.2) permettent d'obtenir des informations plus détaillées. Dans le cas du FLG, la nature multifeuillets est mise en évidence par la présence de moirés (Figure III.8(a)) et il est aussi possible dans certains cas et grâce à des observations à haute résolution de compter le nombre de feuillets (on en distingue 7 sur la Figure III.8(b)).

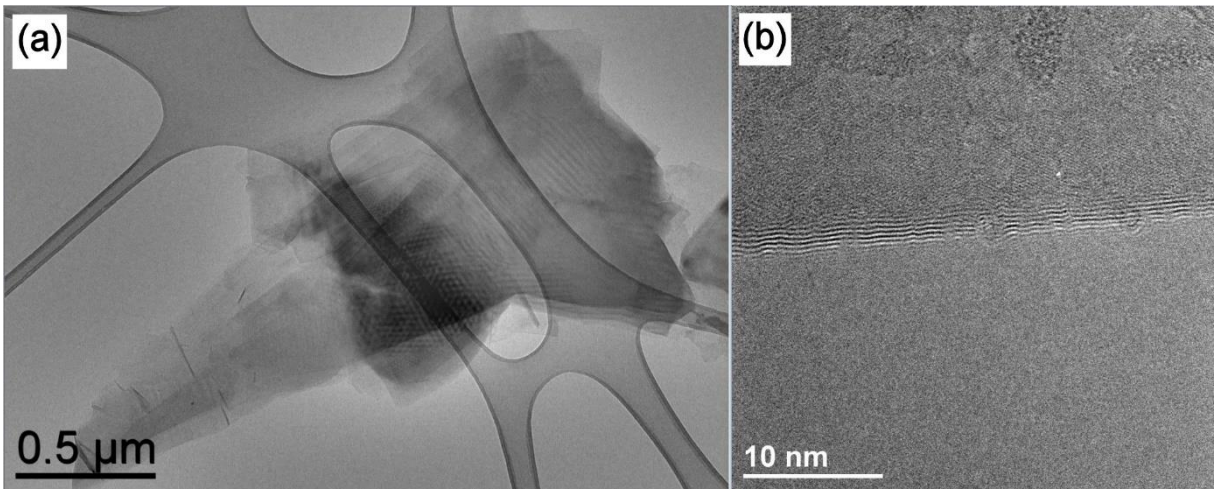


Figure III.8 : Observations au MET du FLG.

Dans le cas du GO, les observations au MET mettent en évidence un matériau beaucoup plus défectueux avec la présence de ridules (Figure III.9(a)) et les observations à haute résolution ne permettent généralement pas de discerner le nombre de feuillets. L'absence de moirés traduit aussi la nature beaucoup plus désorganisée du réseau hexagonal du carbone.

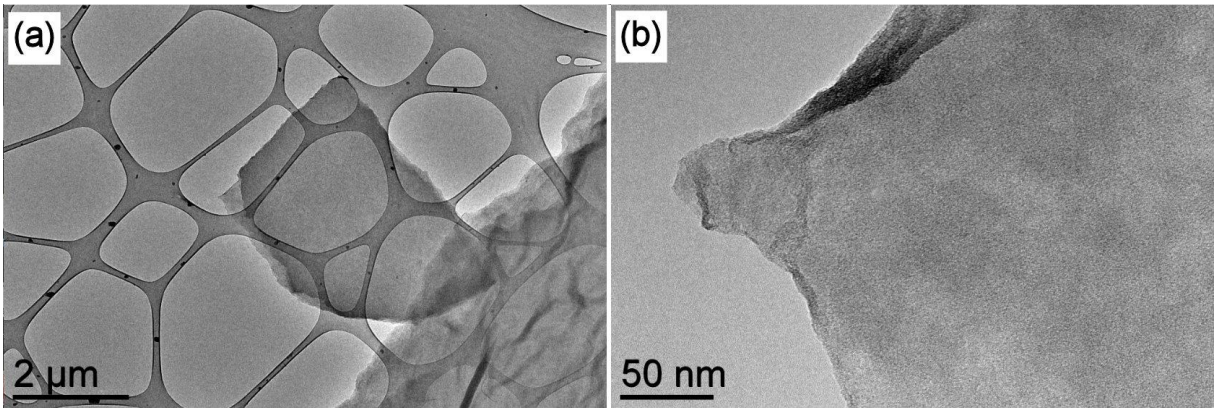


Figure III.9 : Observations au MET du GO. (a) Une morphologie plissée apparait pour les particules les plus larges. (b) absence de moirés dans le cas de GO multifeuillets, illustrant la structure beaucoup plus désordonnée.

L'analyse par XPS des échantillons de FLG et de GO est présentée sur la Figure III.10. On y distingue clairement les différences de qualité structurale du carbone en comparant la bande C1s du FLG (Figure III.10(a)) et du GO (Figure III.10(c)), qui d'une part s'élargit et d'autre part se décale vers les plus fortes énergies. Les contributions des liaisons avec l'oxygène sont, elles aussi, très clairement marquées dans le cas du GO. L'analyse de la bande O1s du FLG ne présente pas beaucoup d'intérêt puisque l'oxygène ne représente qu'une très faible proportion de l'échantillon (de l'ordre de 5%m), alors que cet élément représente 30%m du GO. On notera la présence d'un peu de sodium dans le GO, provenant très probablement de l'étape de neutralisation à la soude. Il faut noter que l'analyse en particulier de la bande C1s est une étape délicate. En effet, c'est souvent le pic du carbone sp^2 à 284,05 eV qui est utilisée pour corriger les spectres en énergie. Il existe donc plusieurs possibilités d'interpréter la position de la bande C1s dans le cas du GO, puisque le maximum d'énergie est mesuré à 284,8 eV, qui est normalement la position du carbone sp^3. Ceci reviendrait à dire que le carbone sp^2 serait très minoritaire dans l'échantillon de GO. Il est possible d'analyser différemment les données en procédant à un recalage en énergie (ce qui revient à repositionner le maximum du signal à 284,05 eV), en considérant que le carbone reste majoritairement sp^2 puisque l'on conserve une morphologie en

feuillets. Il est difficile en pratique d'apporter des éléments très solides pour justifier plutôt d'une approche que d'une autre. C'est la raison pour laquelle nous considérons qu'il n'est pas très raisonnable de proposer une d'analyse beaucoup plus fine de ces données.

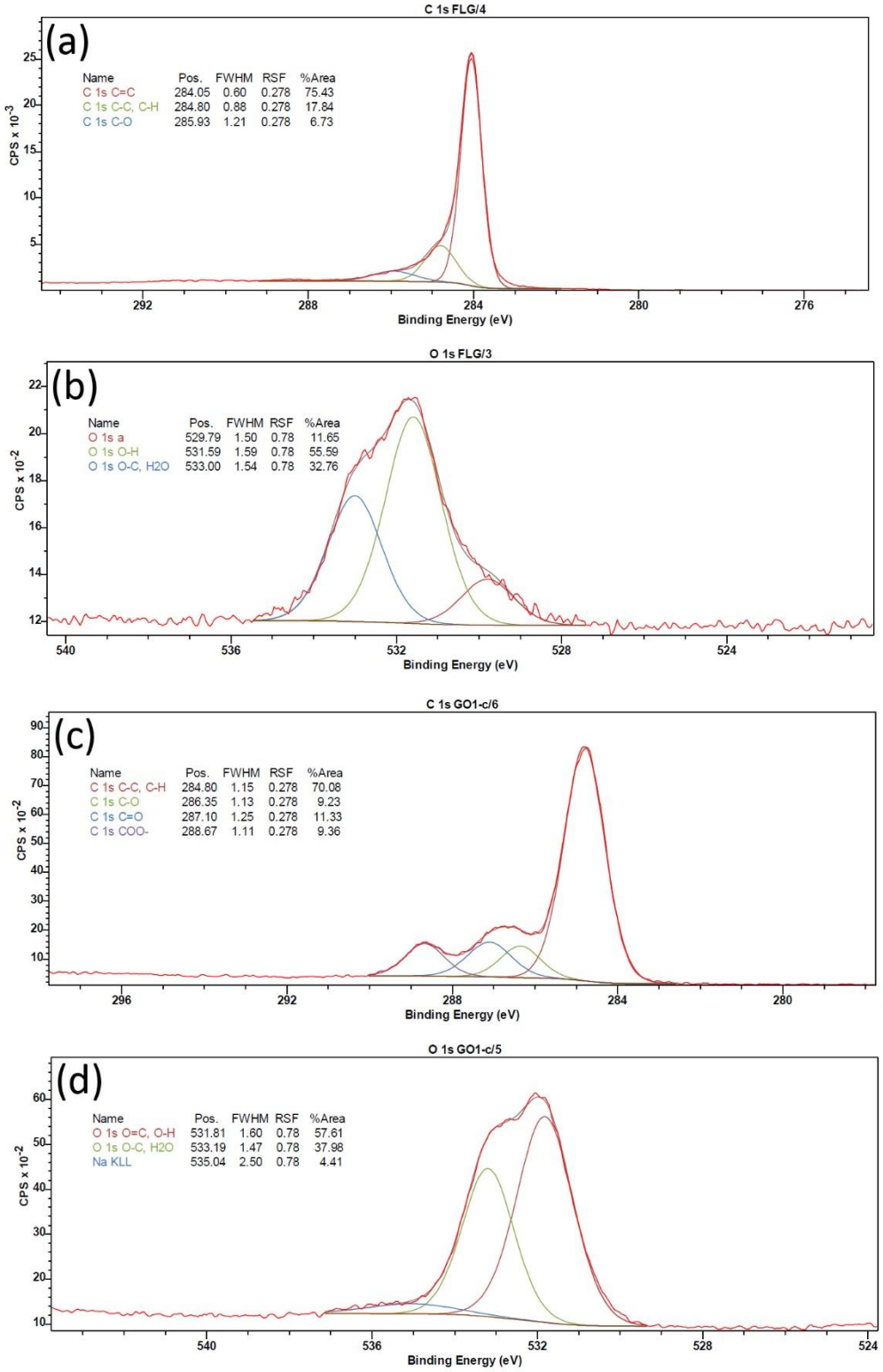


Figure III.10 : Analyse XPS des échantillons de FLG (a, b) et de GO (c, d) : (a) bande C1s du FLG, (b) bande O1s du FLG, (c) bande C1s du GO et (d) bande O1s du GO.

L'analyse thermogravimétrique sous air Figure III.11 compare le FLG avant et après lavage à l'eau désionisée. Sur la Figure III.11(b) correspondant au FLG lavé, la très faible perte de masse entre 200 et 400°C correspondant à un faible résidu de déoxycholate de sodium. La perte de masse principale se situe vers 600°C.

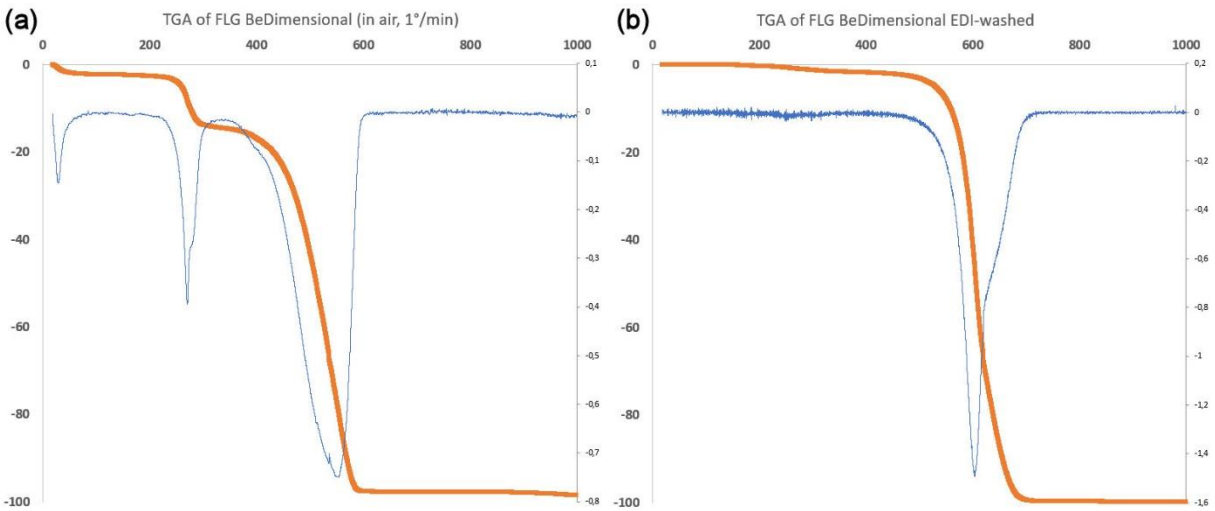


Figure III.11 : Analyses thermogravimétriques sous air (1°/min) du FLG (a) avant et (b) après lavage à l'eau désionisée (élimination du déoxycholate de sodium).

La Figure III.12 montre le résultat de l'analyse thermogravimétrique sous azote de l'oxyde de graphène. Cette analyse est réalisée sous azote afin de pouvoir mettre en évidence la décomposition des fonctions oxygénées sans interférences avec la combustion du carbone. Après une perte d'eau jusqu'à 100°C, la décomposition des fonctions oxygénées se déroule en plusieurs étapes avec des pertes de masse principalement à 140°C puis 690°C pour une perte totale de l'ordre de 80% à 1000°C. Noter que cette perte de masse ne correspond pas uniquement à un départ de carbone mais plutôt au départ combiné de carbone et d'oxygène (CO, CO_2) du fait de la décomposition des fonctions organiques contenant à la fois du carbone et de l'oxygène. L'analyse par XPS de cet échantillon a conduit à une teneur en oxygène de l'ordre de 30% m, ce qui traduit bien l'impossibilité de déterminer très facilement la teneur en oxygène par ATG sans coupler cette analyse par exemple à de la spectrométrie de masse et à de la spectroscopie infra-rouge (ce qui n'a pas été fait ici).

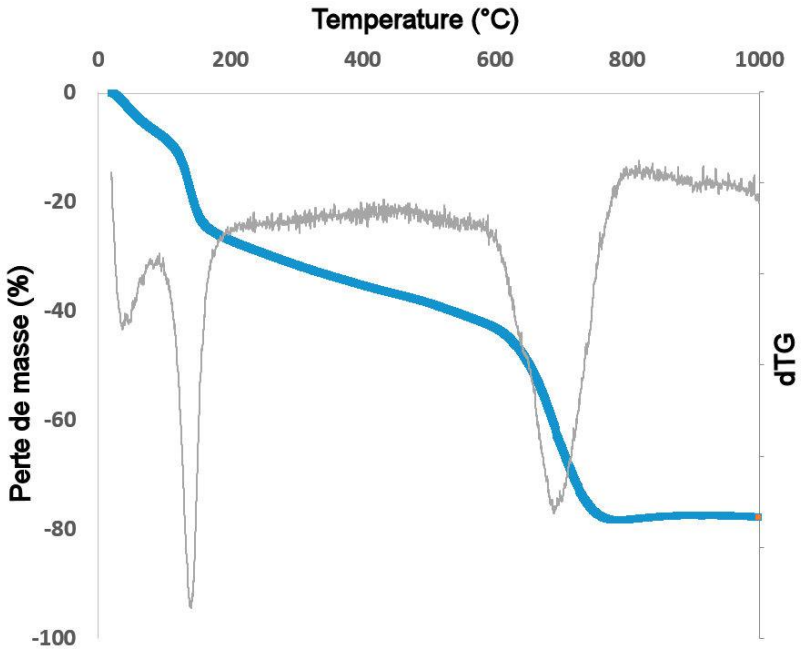


Figure III.12 : Analyse thermogravimétriques sous argon(1°/min) du GO, mettant en évidence la décomposition progressive des différentes fonctions oxygénées.

L'analyse par adsorption d'azote met en évidence des caractéristiques très comparables pour les deux échantillons (FLG : Figure III.13(a) ; GO : Figure III.13(b)). Les valeurs de surface spécifique sont très faibles, de l'ordre de 3-4 m²/g pour le FLG et de 8 m²/g pour le GO. Pour rappel, la surface spécifique théorique du graphène est de 2600 m²/g. Des valeurs aussi faibles sont très probablement le reflet de la forte agglomération des particules au cours du séchage préalable aux analyses par adsorption. A noter que dans le cas du GO, le dégazage préalable est réalisé. L'allure des isothermes observés est caractéristique de matériaux mésoporeux et multicouches (pores en formes de fentes). Il n'y a pas de décalage observé entre les isothermes d'adsorption et de désorption du FLG, il n'y a donc pas de phénomène de condensation dans les pores de ce matériau. Un faible décalage est visible entre les isothermes du GO, correspondant donc à un léger phénomène de condensation dans les pores des nanoparticules.

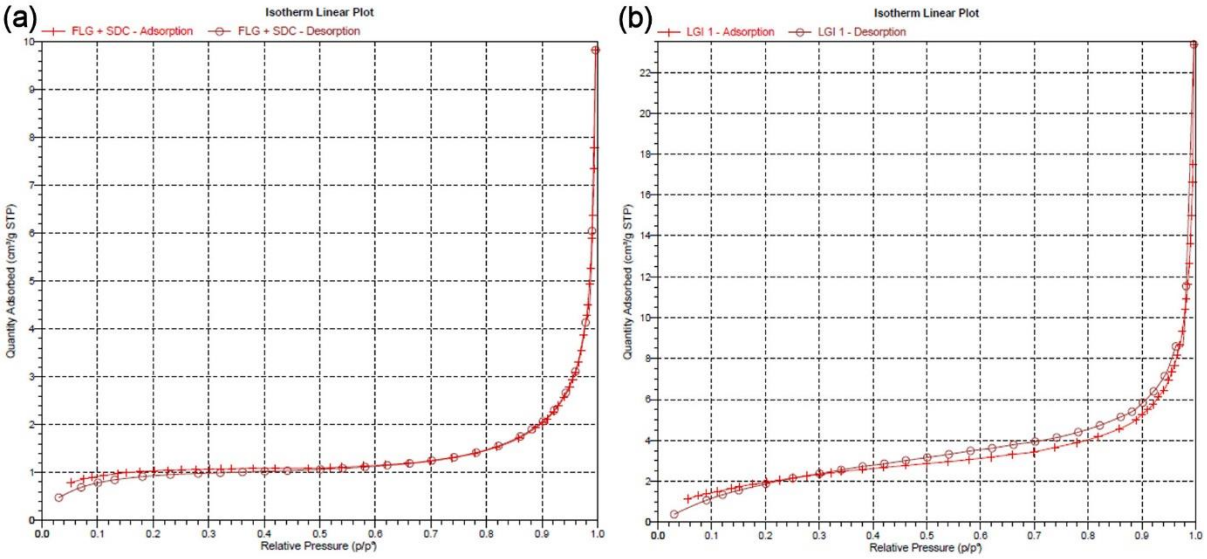


Figure III.13 : Analyse par adsorption d'azote (a) du FLG et (b) de l'oxyde de graphène.

L'analyse par spectroscopie Raman (λ=633 nm) permet, comme dans le cas des NTCs, d'accéder essentiellement à la qualité structurale des échantillons (rapport ID/IG) Il existe une bibliographie très abondante mais aussi très controversée sur l'utilisation des données issues de la largeur à mi-hauteur de la bande G' pour remonter au nombre de feuillets, en particulier dans le cas du FLG. Toutefois, cette exploitation requiert de nombreuses hypothèses et est valable essentiellement pour les échantillons présentant très peu de feuillets. Elle dépend aussi de nombreux facteurs environnementaux tels que la nature du substrat, la longueur d'onde d'analyse, *etc*. La grande disparité des particules dans nos échantillons rend ce type d'analyse très incertaine. La Figure III.14 compare les spectres Raman dans la gamme de 1000 à 3000 cm^{-1} obtenus dans des conditions identiques (30s d'acquisition). Le rapport ID/G est de 0,10 pour le FLG (Figure III.14(a)), ce qui traduit une très bonne qualité structurale, telle qu'on peut l'attendre d'un échantillon préparé par exfoliation de graphite. Ceci est en bon accord avec les images de MET (Figure III.9) et en particulier des moirés qui ont pu être observés. Dans le cas du GO, le rapport ID/G est de 1,27. Cette valeur très élevée dénote le désordre structural de cet échantillon, tel que l'observation au MET le laissait penser.

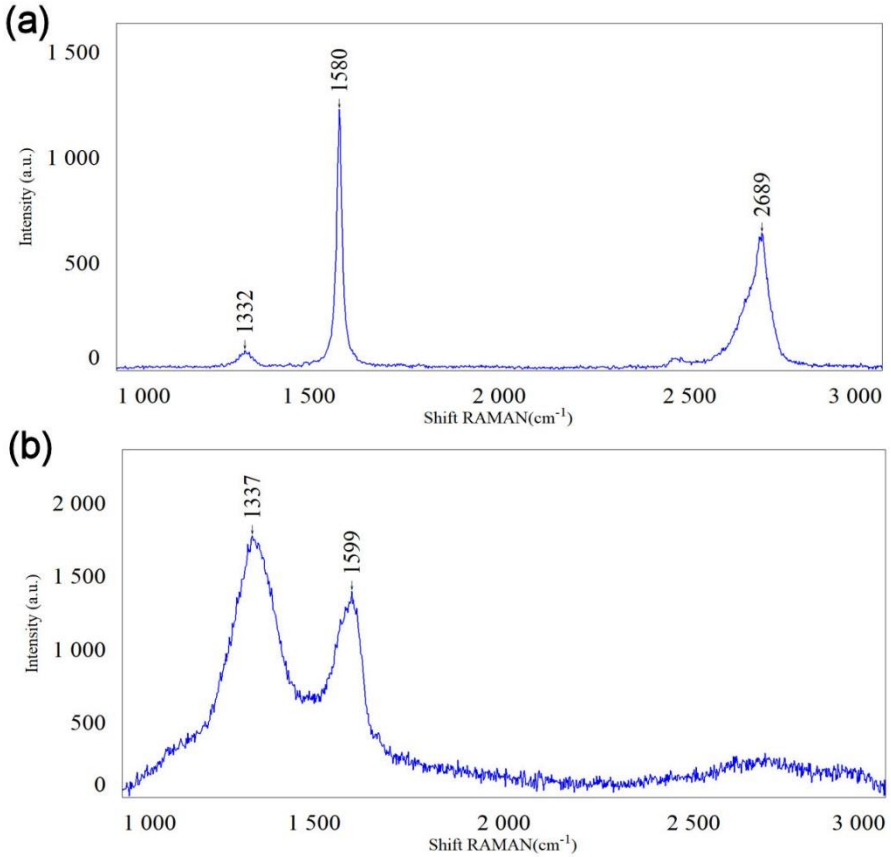


Figure III.14 : Analyse par spectroscopie Raman (a) du FLG et (b) de l'oxyde de graphène.

Dans le cas des échantillons bidimensionnels, nous avons aussi procédé à une analyse par diffraction des rayons X (DRX) afin de voir s'il était possible d'obtenir des informations à la fois sur la pureté des échantillons (pureté chimique, mais aussi présence de graphite résiduel dans le cas du GO) et sur l'espacement entre les feuillets. La comparaison présentée sur la Figure III.15 doit toutefois être prise avec un certain recul car la DRX est aussi sensible à un certain nombre d'autres paramètres. Par exemple, les particules les plus diffractantes ont tendance à dominer le signal.

La Figure III.15 compare le diffractogramme de l'échantillon de FLG avec celui obtenu dans les mêmes conditions d'analyse pour un échantillon de graphite naturel. Le pic principal à 26,4° correspond à la distance (002) de 3,4 Å telle qu'attendue dans le graphite. La bibliographie met à disposition de nombreux exemples d'analyse du graphite par DRX. Les travaux publiés par Khan et al [310] montrent par exemple un diffractogramme du graphite identique à celui que nous avons mesuré pour le FLG, en citant la référence JCPDS 00-012-0212. La faible largeur à mi-hauteur du pic, identique à celle de l'échantillon de graphite naturel, met en évidence un nombre de feuillets important. Ceci traduit, malgré les observations réalisées au MET, la présence dans l'échantillon de particules très agglomérées (superposition de plaquettes). Ceci est en bon accord avec la très faible surface spécifique mesurée de seulement quelques m²/g.

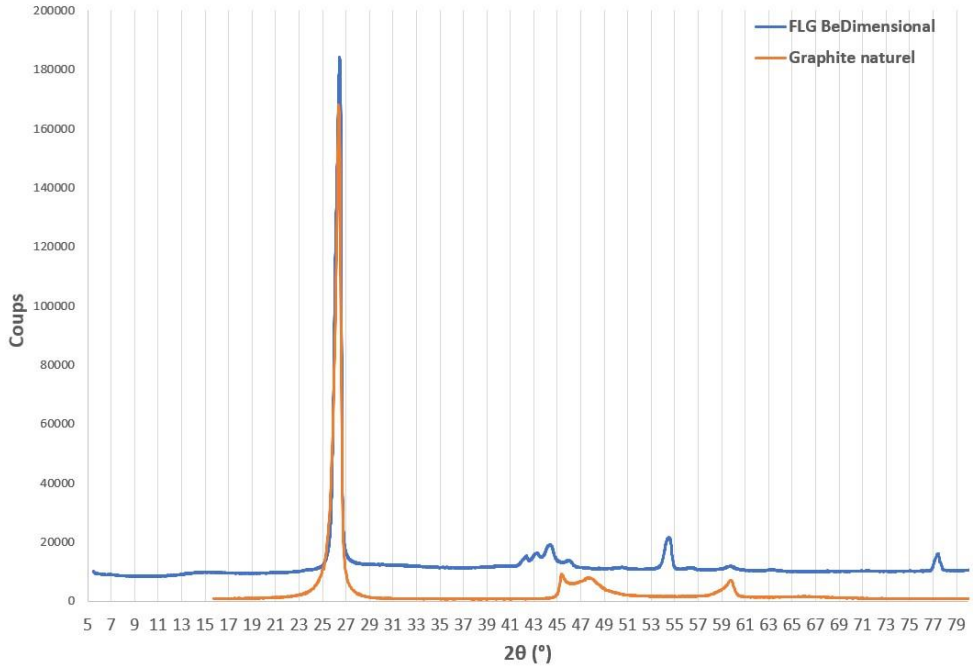


Figure III.15 : Analyse par diffraction des rayons X de l'échantillon de FLG et comparaison avec un échantillon de référence de graphite naturel.

L'analyse par DRX de l'échantillon de GO est très différente (Figure III.16). Bien que le signal soit très bruité, on y distingue nettement le pic à 11,5° correspondant à une distance (002) entre les feuillets de GO de 7,7 Å. La largeur à mi-hauteur est beaucoup plus importante que dans le cas du FLG, et le calcul de la taille des cristallites selon la direction (002), et donc de l'épaisseur des particules, donne ici une valeur approximative de 2,3 nm, ce qui correspond donc à environ 3 feuillets. Le pic aux environs de 63° correspond au substrat silicium utilisé pour l'analyse, ce même pic étant présent sur l'analyse réalisée sur le support seul. Finalement, l'absence du pic (002) du graphite sur le diffractogramme traduit l'oxydation totale du graphite mis en œuvre pour cette synthèse.

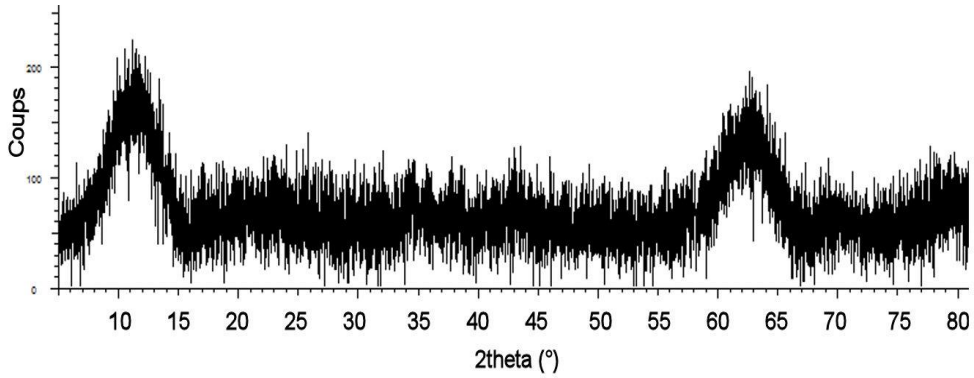


Figure III.16 : Analyse par diffraction des rayons X de l'échantillon de GO.

III.3. Etude de la cinétique de polymérisation du silicone :

En premier lieu le silicone SYLGARD184 a été sélectionné comme support pour préparer des surfaces antimicrobiennes car ce silicone est de faible coût et son approvisionnement est facile. Ce polymère est généralement utilisé en microfluidique ainsi que pour l'encapsulation de composants en microélectronique [288,311]. Ce silicone bi-composants polymérise en 48 heures à 25°C et sa polymérisation peut être accélérée par élévation de la température [287]. Un spray de nanoparticules carbonées a été appliqué sur ce silicone de façon à bloquer ces particules dans le silicone tout en leur permettant d'affleurer à la surface. L'objectif était de déterminer le moment idéal pour appliquer le spray afin que les nanoparticules ne soient pas recouvertes par le polymère mais que ces dernières soient seulement enchâssées en surface. Pour répondre à cet objectif une étude a été menée sur la cinétique de polymérisation du SYLGARD184.

Les surfaces silicone sont préparées directement dans les puits de plaques de culture 12 puits en polystyrène de façon à pouvoir ensuite réaliser directement les tests antimicrobiens sans transfert d'échantillon. La quantité de silicone versée dans les puits permet de recouvrir totalement la surface d'un puits tout en assurant une manipulation facile des échantillons par la suite. En effet, le volume (et donc l'épaisseur) n'a aucune importance puisque c'est l'effet de la surface de l'échantillon que nous cherchons à évaluer. Lorsque le silicone est totalement polymérisé nous obtenons ainsi des échantillons 21 mm de diamètre et 2 mm de hauteur. D'après la bibliographie le silicone SYLGARD184 polymérise en 48 heures à 25°C, 35 minutes à 100°C, 20 minutes à 125°C et 10 minutes à 150°C et les conditions idéales de réticulation ne devraient pas excéder 60°C [287]. Nous avons souhaité accélérer le processus de polymérisation en augmentant la température, nous avons donc décidé de chauffer le silicone à 60°C lors de sa préparation pour rester dans les conditions de réticulation idéales, sans risquer d'endommager le support en polystyrène. Le polystyrène peut en effet commencer à se dégrader à partir de 70°C.

III.3.1 Analyse de texture :

Une analyse de texture est réalisée pour déterminer la durée de réticulation à 60°C et identifier la fenêtre temporelle idéale à laquelle appliquer le spray de nanoparticules sur le polymère. Cette analyse est le plus souvent utilisée pour caractériser des produits alimentaires, cosmétiques, ou pharmaceutiques. La bibliographie ne semble pas mentionner d'exemples d'application de cette technique sur du PDMS.

Ces analyses de textures sont effectuées sur le silicone d'intérêt contenu dans les puits d'une plaque de culture 12 puits. Les mesures sont réalisées après exposition des échantillons pendant une

durée déterminée à la température de 60°C à l'aide d'une étuve. Les différents temps d'exposition étudiés sont de 0-10-20-30-40-50-60-70 et 80 minutes et les mesures sont réalisées sur 3 échantillons par condition.

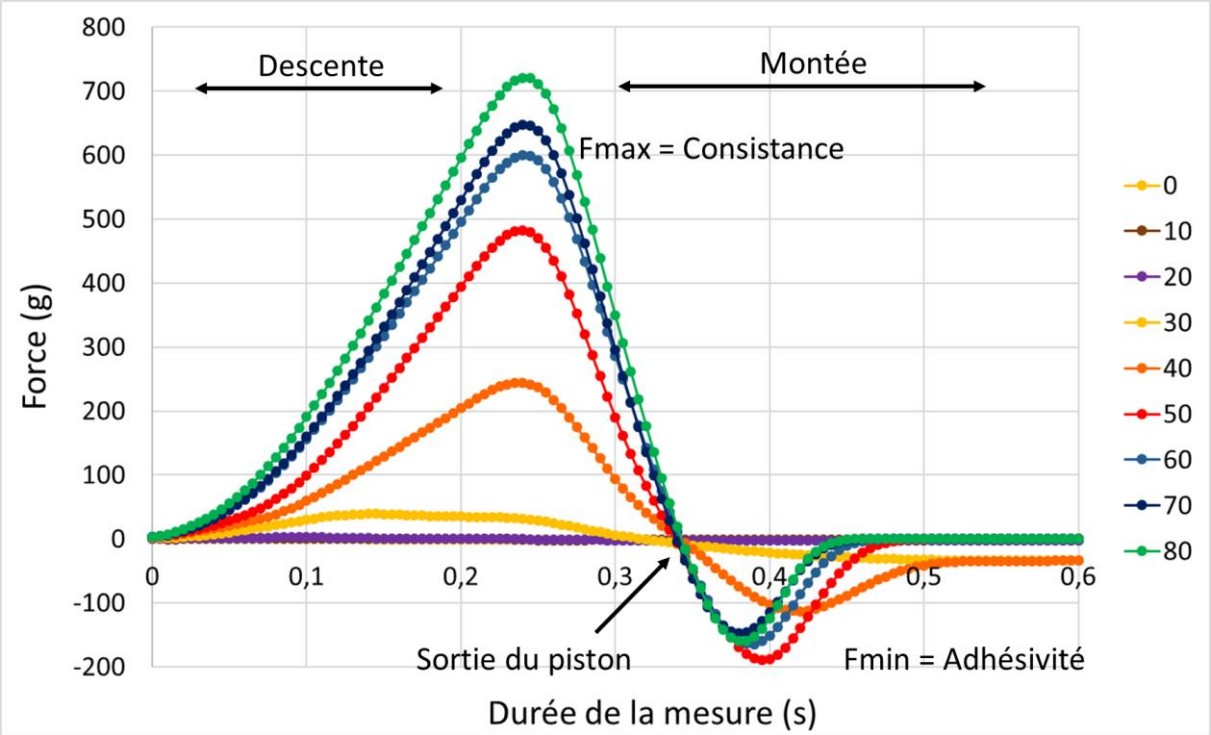


Figure III.17 : Courbes de textures du silicone après 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 et 80 minutes à 60°C. Moyenne sur 3 cycles de mesures.

Les courbes de textures (moyenne sur 3 cycles de mesures) réalisées sur les échantillons pour les différentes conditions étudiées sont présentées en Figure III.17. Le premier cycle de mesure lors de la descente de la sonde correspond à l'augmentation des valeurs de force jusqu'à l'atteinte de Fmax qui caractérise la consistance du matériau. Le deuxième cycle où la sonde monte correspond au reste de la courbe. Le passage des valeurs de force en négatif correspond à la sortie de la sonde du matériau, l'aire sous les courbes négatives caractérise l'adhésivité du matériau.

Pour rappel, l'objectif est de déterminer la durée de réticulation idéale à 60°C pour appliquer le spray de nanoparticules de manière à ce que les nanoparticules soient bloquées dans le silicone. Le suivi du paramètre d'adhésivité est donc déterminant. L'adhésivité ne doit pas être trop élevée pour que les nanoparticules ne s'enfoncent pas complètement dans le polymère, mais elle doit être suffisante pour que les nanoparticules pénètrent la surface. Nous remarquons que l'allure des courbes correspondant au paramètre d'adhésion est très différente selon la condition analysée, il est difficile de comparer les différentes mesures à partir des valeurs d'aire sous la courbe. Ainsi il semble plus approprié d'utiliser les valeurs Fmin obtenues pour pouvoir comparer les différentes mesures.

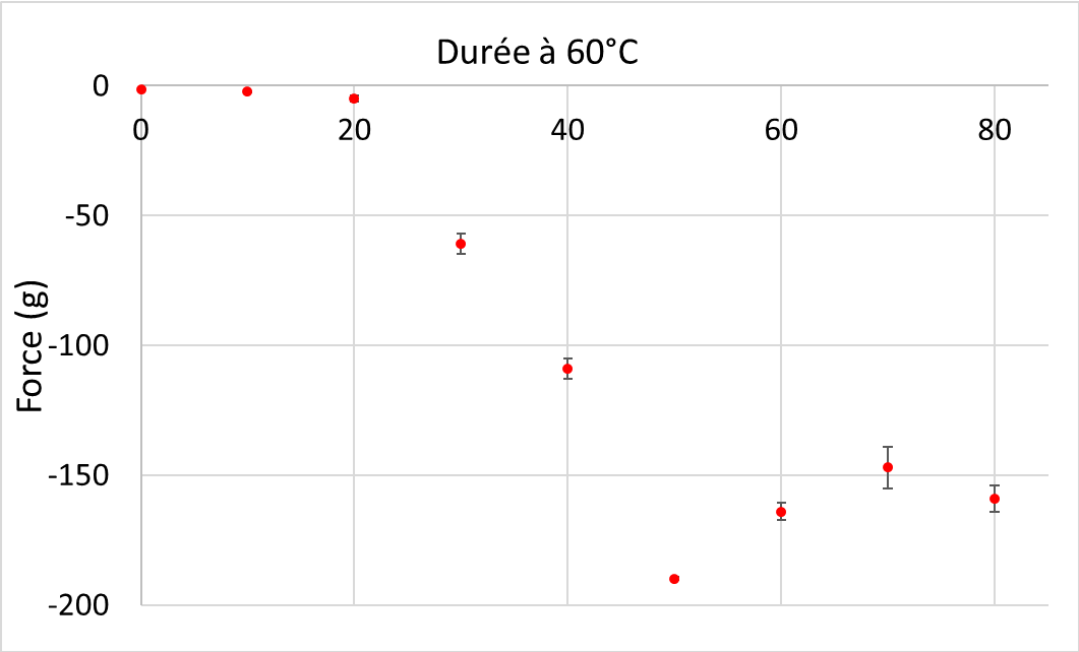


Figure III.18 : Valeurs Fmin (g) mesurées sur les échantillons silicone pour différentes durées passées à l'étuve à 60°C. n=3.

Le paramètre d'adhésivité peut être étudié sur les courbes à partir de la remontée du piston. Cette partie de la courbe renseigne sur la présence de matière adhérente ou non, c'est-à-dire si du silicone est encore présent sur la sonde et s'écoule. Plus la polymérisation est avancée, moins il y a de filant, et plus la courbe rejoint l'axe des abscisses (Force = 0 g) rapidement après le minimum de force. D'après la Figure III.17 et la Figure III.18, l'allure des courbes, et donc la force minimale atteinte, est très différente selon les conditions étudiées. Les valeurs aux durées d'expositions 0, 10 et 20 minutes sont comparables entre elles et les valeurs Fmin sont proches de 0 g. Autrement dit il n'y a pas de modification de la texture du silicone pendant les 20 premières minutes d'exposition à 60°C. La texture commence ensuite à évoluer puisque pour la condition 30 minutes, les valeurs d'adhésivité augmentent pour atteindre un Fmin à environ -60 g. Cette adhésivité s'accentue encore au cours du temps comme le montrent les mesures suivantes où la force minimale atteinte est dans l'absolu bien supérieure. Fmin diminue considérablement lors des mesures après 30, 40 et 50 minutes à 60°C (Figure III.18), l'allure des courbes est transformée (Figure III.17). Celles-ci présentent des pentes plus élevées lorsqu'elles passent en dessous de l'axe des abscisses pour atteindre Fmin et elles rejoignent ensuite plus rapidement l'axe des abscisses. Une forme de pic est alors observée, plus la largeur du pic à mi-hauteur est faible, plus la polymérisation est avancée et moins il y a de matière adhérente. La valeur Fmin de 50 minutes est d'environ -190 g et est beaucoup plus faible que celle de 40 minutes d'environ -110 g (*Figure III.18*), cela signifie que l'adhésivité augmente. Les valeurs Fmin des mesures à 60 ; 70 et 80 minutes sont plus élevées que celle de 50 minutes et se situent aux alentours de -160 g, cela signifie que la force d'adhésion a diminué entre 50 et 60 minutes. L'intervalle entre 30 et 50 minutes est très intéressant car on y observe de grandes variations de texture avant d'atteindre une force maximale d'adhésivité.

Pour bloquer en partie des nanoparticules de carbone en surface du silicone, il est nécessaire de limiter l'état filant de celui-ci sans toutefois atteindre un état complètement polymérisé où le silicone serait imperméable à tout agent extérieur. La texture du silicone entre 40 et 50 minutes semble correspondre aux caractéristiques recherchées. Il apparaît comme le dernier intervalle de changement de la texture du silicone avant le pic d'adhésivité. L'étude est alors complétée par des points

intermédiaires avec des mesures effectuées après 40, 42, 44, 46, 48 et 50 minutes d'exposition à la chaleur dans l'étuve à 60°C. La Figure III.19 montre que les différentes valeurs Fmin caractérisant l'adhésivité diminuent jusqu'au point maximal à 46 minutes. Puis la valeur Fmin se stabilise pour les points suivants à 48 et 50 minutes.

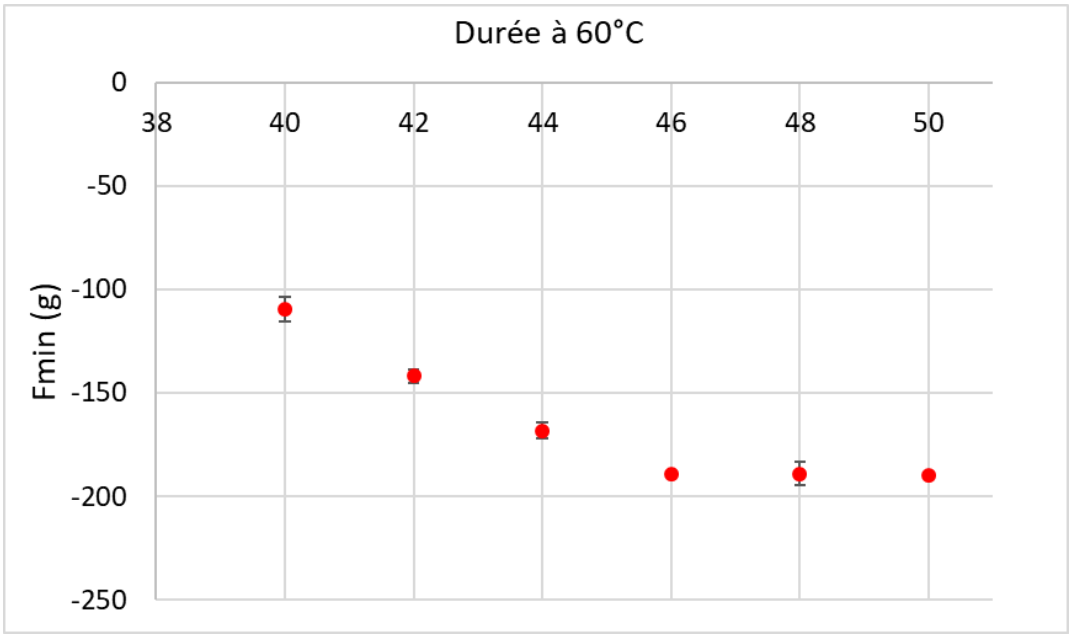


Figure III.19 : Valeurs Fmin (g) mesurées sur les échantillons silicone pour différentes durées passées à l'étuve à 60°C. n=3.

Une propriété de texture complémentaire à prendre en compte est la conservation de ladite texture recherchée du silicone durant le spray de nanomatériaux carbonés. Ainsi la texture du silicone ne doit pas varier pendant au moins 8 minutes qui est la durée maximale d'un spray de suspension aqueuse de NMCs. Des mesures sont donc effectuées sur les échantillons 8 minutes après leur sortie d'étuve.

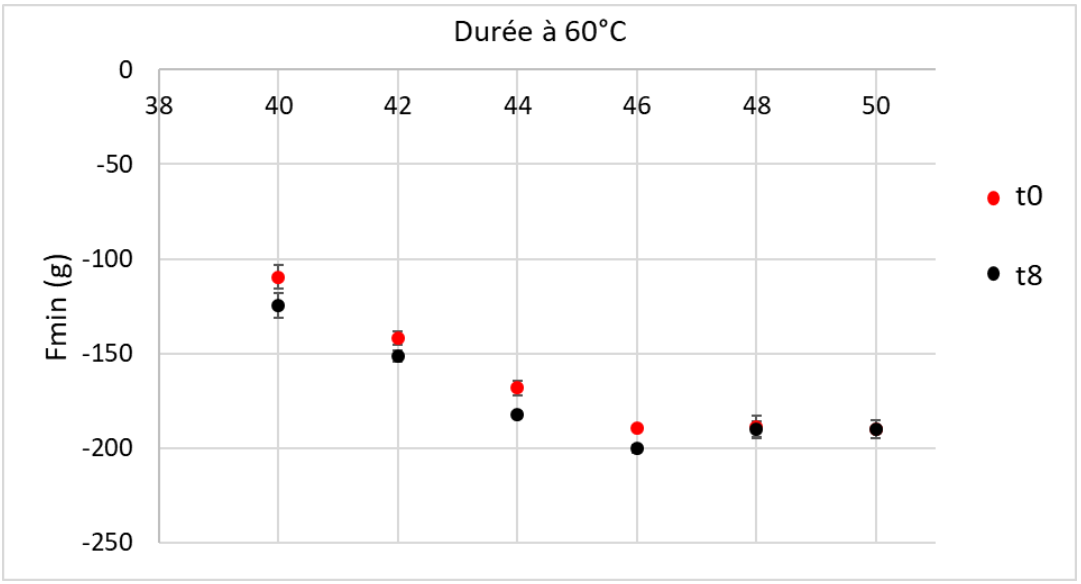


Figure III.20 : Valeurs Fmin (g) mesurées sur les échantillons silicone pour différentes durées passées à l'étuve à 60°C et après 8 minutes hors de l'étuve. n=3.

Les mesures effectuées sur les échantillons 8 minutes après leurs sorties d'étuve révèlent que les valeurs Fmin sont proches de celles mesurées à t0 avec un écart d'environ 10 g pour les durées 40, 42, 44, et 46 minutes à 60°C (Figure III.20). Les valeurs Fmin mesurées en sortie d'étuve et 8 minutes plus tard semblent équivalentes pour les échantillons ayant passés 48 et 50 minutes à 60°C.
Ainsi les analyses de texture sur les échantillons silicone ayant passé différentes durées à 60°C permettent de caractériser l'adhésivité du polymère grâce à l'allure des courbes obtenues lors du cycle de remontée de la sonde et la valeur Fmin atteinte. L'allure des courbes évolue beaucoup jusqu'à la condition 50 minutes où celle-ci s'approche de son allure finale. Les pentes des courbes lors du passage sous l'axe des abscisses augmentent progressivement jusqu'à la condition 50 minutes où elle se stabilise. La valeur Fmin est atteinte de plus en plus rapidement et la valeur Fmin minimale est obtenue pour la condition 50 minutes. La force d'adhésivité maximale est donc atteinte pour la condition 50 minutes. Après avoir atteint la valeur Fmin, les différentes courbes rejoignent de plus en plus rapidement l'axe des abscisses, cela signifie qu'il y a de moins en moins de filant et que l'adhésivité du polymère augmente jusqu'à la condition 50 minutes où l'allure des courbes se stabilise et les valeurs Fmin réaugmentent pour se stabiliser également. Les mesures de texture ont donc permis d'identifier l'intervalle 40-50 minutes comme le dernier intervalle de variation de texture avant d'atteindre un état maximal d'adhésivité à 50 minutes. En affinant l'étude de texture sur cet intervalle, nous remarquons que la valeur Fmin minimale semble atteinte et se stabiliser entre 46 et 50 minutes, avant que les valeurs ne réaugmentent pour se stabiliser vers 60 minutes. Les valeurs Fmin mesurées 8 minutes après la sortie d'étuve révèlent que celles-ci ne semblent pas varier par rapport à la mesure réalisée en sortie d'étuve à partir de la condition 48 minutes, ce qui permet de garantir l'absence de variation de l'état de surface du silicone pendant la durée maximale d'un dépôt par pulvérisation dans nos conditions de travail.

Pour pouvoir bloquer des nanoparticules en surface du silicone sans que celles-ci ne s'enfoncent complètement dans le polymère, une contrainte sera d'appliquer le spray de nanoparticules lorsqu'il n'y a plus de « filant », et que le silicone se situe dans un état d'adhésion maximale. Il est également nécessaire d'éviter l'état final de polymérisation du silicone où les nanoparticules seraient « rejetées » de la surface du polymère. Une contrainte supplémentaire est de garantir l'absence de variation de l'état de surface du silicone pendant la durée maximale d'un dépôt par pulvérisation qui est de 8 minutes dans les conditions de travail. D'après toutes les analyses réalisées, nous allons appliquer la durée de chauffe de 48 minutes à 60°C au polymère avant d'effectuer le spray de nanoparticules de carbone sur ce dernier. Comme démontré ci-dessus, cela correspond à la condition où l'adhésivité maximale du polymère est atteinte et où l'on n'observe pas de variation de texture pendant 8 minutes après la sortie d'étuve.

Pour étudier la variation de l'état de surface, la méthode de mesure d'angle de contact a également été utilisée. Cette approche complémentaire permet de confirmer les résultats obtenus grâce au texturomètre.

III.3.2 Etude de l'angle de contact

Pour poursuivre l'étude de la cinétique de polymérisation du SYLGARD184, des mesures d'angle de contact ont été effectuées en déposant une goutte d'eau déionisée à la surface du silicone polymérisé à 60°C aux différentes durées. L'étude de ce silicone en particulier avec l'évolution de l'angle de contact au cours de la polymérisation, a déjà été effectuée et des exemples sont présents dans la bibliographie[289].

Les échantillons sont préparés de la même façon que précédemment, dans des puits de diamètres identiques à ceux des plaques de culture 12 puits. Ainsi la même quantité de silicone est introduite

que pour les autres tests (0,6 g). Afin de pouvoir observer les angles formés à la surface de l'échantillon, la hauteur des puits est réduite.
3 réplicas sont effectués par mesure, et comme précédemment le silicone est étudié pour des durées de 0, 10, 20, 30, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 60 et 70 minutes de polymérisation à 60°C. Les valeurs obtenues sont reportées en Figure III.21.

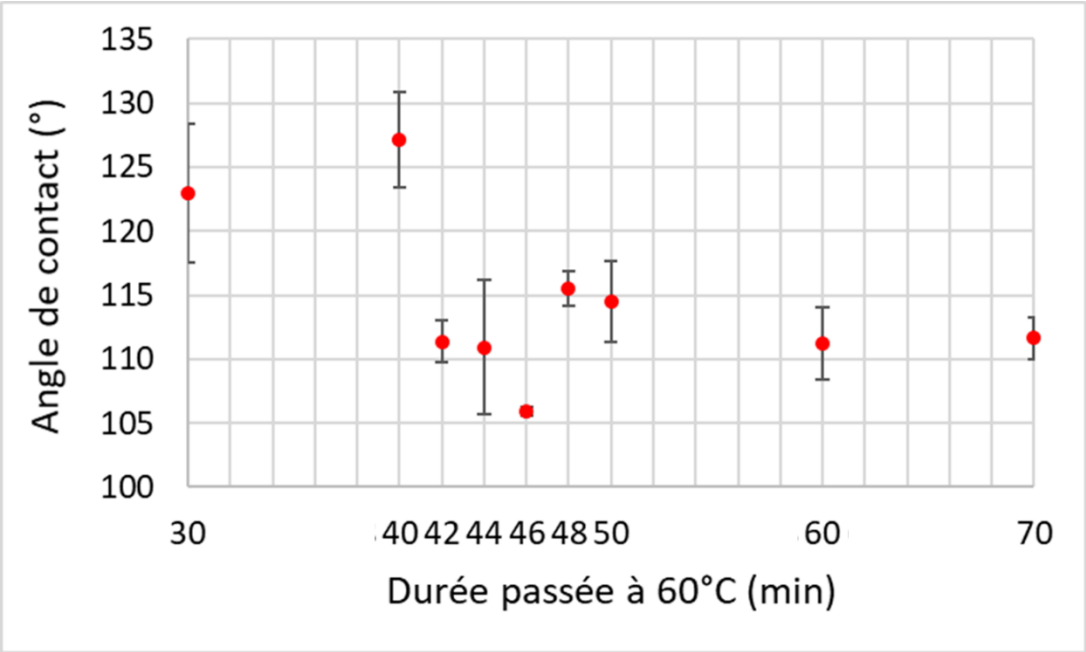


Figure III.21 : Valeurs d'angle de contact mesurées sur les échantillons silicone pour différentes durées passées à l'étuve à 60°C. n=3.

L'écart type entre les différents réplicas se situe entre 0,35 et 5,42° (Figure III.21). Les mesures de l'angle de contact ne sont pas réalisables avant le point 30 minutes car le polymère n'est pas encore suffisamment réticulé et la goutte d'eau « s'enfonce » dans le silicone. A partir de 30 minutes à 60°C, les mesures sont possibles. Cela coïncide avec la transition de texture observée lors des mesures réalisées avec le texturomètre. Un maximum d'angle de contact de127° est atteint à 40 minutes avant que les angles ne diminuent pour les durées 42, 44 et 46 minutes en atteignant 106°. L'angle de contact mesuré à 48 minutes est plus élevé avec une valeur de 116°, et la même valeur est mesurée pour la condition 50 minutes. Les valeurs d'angle de contact diminuent ensuite légèrement et pour se stabiliser vers 112°.

Ainsi, comme lors des analyses de texture précédemment effectuée, l'intervalle 40-50 minutes semble à privilégier car nous assistons à des variations entre le maximum d'angle et une stabilisation à partir de 50 minutes. Une transition semble s'effectuer à 46 minutes lorsque le minimum d'angle de contact est atteint. Ces résultats viennent renforcer la conclusion précédente où le maximum d'adhésivité du silicone était mesuré au point 46 minutes. Ainsi l'étude d'angle de contact semble mettre en valeur un dernier état de transition entre 46 et 48 minutes avant d'atteindre la forme finale qui ne présente que de faibles variations par la suite.

III.3.3 Conclusion

Les mesures de texture et les mesures d'angle de contact ont mis en évidence un état de transition de texture vers 48 minutes de polymérisation à 60°C avant de se stabiliser. C'est à ce moment que le silicone semble atteindre une adhésivité maximale tout en n'observant pas de variation d'adhésivité pendant 8 minutes, ce qui est la durée maximale d'un spray de nanoparticules de carbone. Ainsi nous pouvons conclure que le moment le plus adapté pour appliquer un spray de nanoparticules dans le but

de bloquer ces nanoparticules en surface du polymère se situe après 48 minutes de polymérisation à 60°C.

III.4. Dépôt de NMCs sur le SYLGARD184

Nous souhaitons valider le protocole que nous avons établi pour déposer des NMCs sur silicone de manière à ce que les nanoparticules de carbone soient bloquées dans le polymère tout en émergeant de sa surface. Pour cela nous décidons d'observer la surface de nos échantillons en microscopie électronique à balayage pour déterminer si nos attentes sont respectées. Après avoir caractérisé le silicone avant dépôt, nous étudions ici l'influence des différents paramètres expérimentaux que nous mettrons en œuvre pour l'ensemble des NMCs : influence de la durée de polymérisation sur la qualité des dépôts, influence du nettoyage aux ultrasons sur la quantité restante de NMC, influence de la présence d'agent dispersant (CMC) lorsque ce dernier est ajouté. Nous avons choisi par commodité de réaliser cette étude avec le nanomatériau le mieux maitrisé, les nanotubes de carbone bruts.

III.4.1 Référence silicone seul.

Tout d'abord la surface de l'échantillon référence silicone SYLGARD184 seul, totalement polymérisé, est observée.

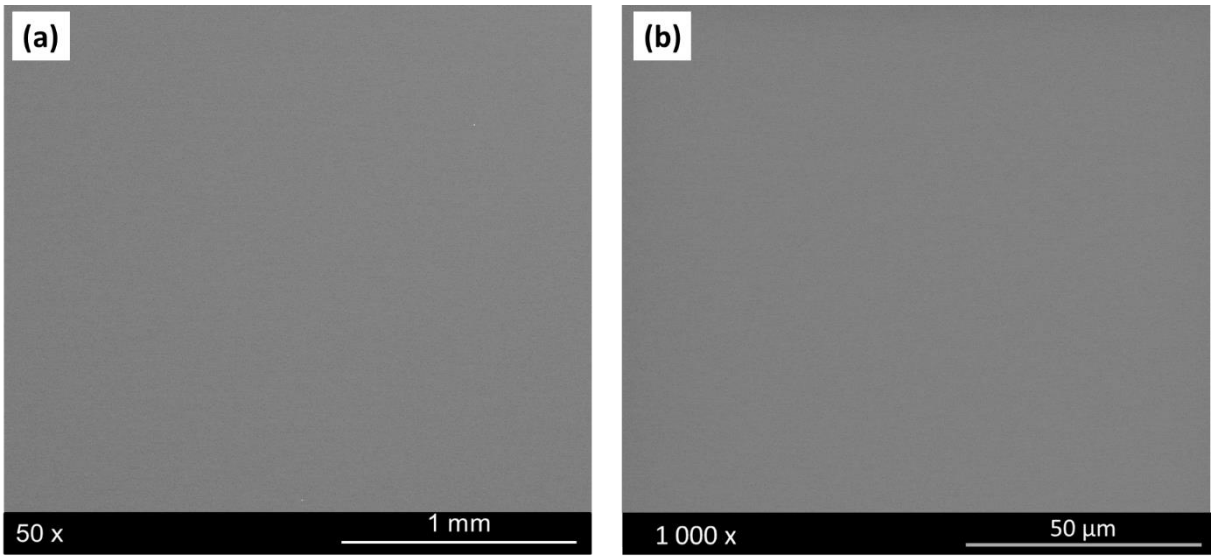


Figure III.22 : Observations MEB d'une surface silicone SYLGARD184 référence (a) 50 x et (b) 1 000 x

La surface apparait comme étant uniforme et sans aspérité aux deux grandissements utilisés.

III.4.2 Protocole : paramètres de polymérisation.

Nous souhaitons valider le protocole mis au point après l'étude menée sur le silicone SYLGARD184 à l'aide de mesures de texturométrie et d'angle de contact. D'après notre étude nous devrions observer des particules enchâssées à la surface du silicone SYLGARD184 lorsque que le spray de la suspension de nanoparticules est réalisé après que le polymère ait passé 48 minutes à 60°C. Pour valider ce protocole nous préparons des matériaux selon le même processus de pulvérisation mais en modifiant la durée que le polymère passe à 60°C avant le spray. Avec l'observation en microscopie électronique à balayage de la surface du matériau préparé, nous souhaitons vérifier notre théorie qui est que lorsque le spray est réalisé après une durée de polymérisation à 60°C inférieure à 48 minutes,

les particules s'enfoncent dans le polymère et ne sont pas visibles en surface, tandis que si le spray est réalisé après une durée de polymérisation à 60°C supérieure à 48 minutes alors les particules ne peuvent s'enfoncer, et devraient donc être bloquées, à la surface du polymère.

Nous utilisons une suspension aqueuse de nanotubes de carbone bruts car leur synthèse est maîtrisée au CIRIMAT [284] et cet échantillon est le plus facile d'accès pour cette étude. Des échantillons nanoparticules de carbone sur silicone SYLGARD184 sont donc préparés conformément au protocole décrit précédemment, avec des durées de polymérisation du silicone SYLGARD184 à 60°C différentes. La durée idéale de 48 minutes déterminée précédemment, une durée inférieure de 40 minutes, une supérieure avec un ajout de 30 minutes à 60°C, c'est-à-dire une durée de 1 heure 18, et enfin une durée de 5 heures à 60°C pour une polymérisation totale sont testées. Une fois le spray réalisé, les échantillons sont placés dans une cuve à ultrasons remplie d'eau pendant 2 minutes pour éliminer les particules non bloquées dans le polymère.

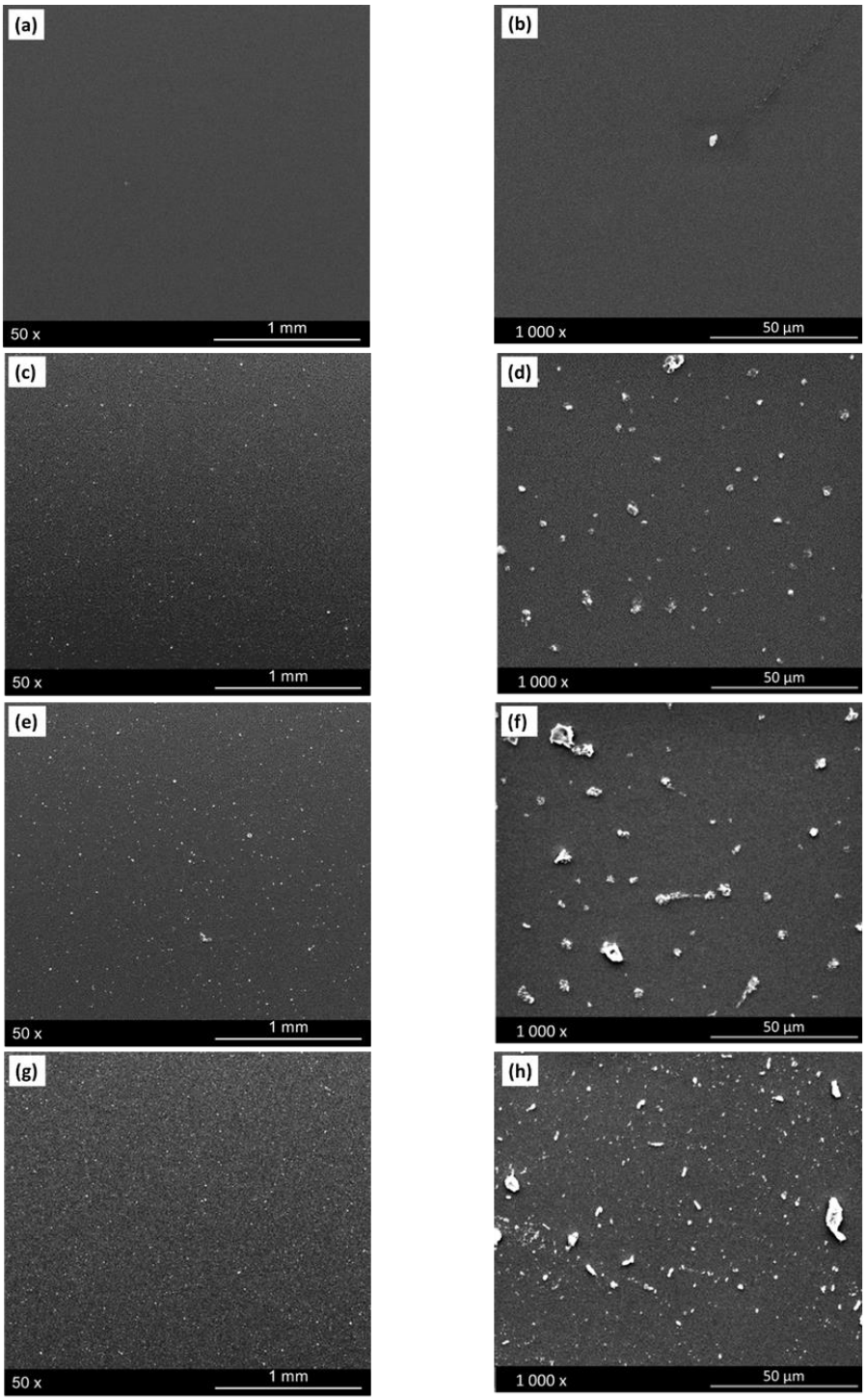


Figure III.23 : Observations au MEB de dépôts de nanotubes de carbone sur SYLGARD 184 différentes durées de polymérisation à 60°C : (a, b) 40 minutes ; (c, d) 48 minutes ; (e, f) 1h18 minutes et (g, h) polymérisation totale du silicone.

Les observations du dépôt obtenu lorsque le silicone a passé 40 minutes à 60°C ne révèlent pas (ou presque) de DWNTs en surface, nous n'observons que du silicone (comme pour l'échantillon référence silicone seul) ce qui est conforme à nos attentes (Figure III.23(a, b)). Le silicone semble trop « mou » pour que les nanoparticules soient bloquées en surface, elles s'enfoncent sûrement dans le polymère.

Lorsque le spray est réalisé après que le silicone ait passé 48 minutes à 60°, nous observons des amas de nanoparticules de carbone en surface du polymère (Figure III.23(c)). Contrairement à l'observation de silicone seul ou du matériau réalisé avec 40 minutes de polymérisation à 60°C, de nombreux agglomérats plus clairs sont visibles sur le silicone qui correspond au fond plus foncé de l'image. Ces amas sont répartis de façon homogène sur la surface de l'échantillon. Lorsque le grandissement augmente (x1 000), nous observons des amas de nanoparticules de tailles différentes qui sont toujours répartis de façon homogène (Figure III.23(d)). Des différences de contraste sont observables sur les amas, et même entre les amas. Cela semble signifier que les agglomérats de nanotubes de carbone sont plus ou moins enfoncés dans le silicone et qu'une partie de ces agglomérats semble s'enfoncer dans le polymère tandis qu'une autre semble émerger. Ces observations correspondent à nos attentes de bloquer des nanoparticules en surface du silicone de façon à ce qu'elles émergent de la surface.

Cependant des observations similaires sont obtenues pour les échantillons avec spray réalisé après que le silicone ait passé 30 minutes supplémentaires à 60°C (Figure III.23.c ; 1h18 minutes), et après polymérisation totale du silicone (Figure III.23.d). Des amas qui sont répartis de façon homogène en surface du silicone présentent des contrastes différents et semblent à la fois émerger et s'enfoncer dans le polymère. Ces observations sont contraires à nos attentes de « rejet » où, dépassé un certain seuil de polymérisation, les nanoparticules ne devraient pas être capables de s'enfoncer dans le polymère.

Nous nous interrogeons sur ce comportement particulier du silicone. Le SYLGARD184 trouve majoritairement des applications dans le domaine de la microfluidique. La bibliographie mentionne la présence de chaînes non réticulées au sein du polymère [312,313]. Ces huiles polymères interviennent peut-être pour bloquer les nanoparticules en surface du silicone lors de l'impact. Il peut également s'agir de la force de pulvérisation du spray qui pourrait peut-être s'avérer suffisante pour que les particules puissent s'enfoncer dans le silicone totalement polymérisé.

Suivant ces observations, nous décidons d'effectuer le spray de nanoparticules de carbone sur le silicone complètement polymérisé, ce qui facilite grandement la préparation des échantillons. Le silicone peut ainsi être préparé en amont, et non sous la contrainte de 48 minutes avant de pulvériser la suspension de NMC.

III.4.3 Traitement aux ultrasons :

Après avoir ajusté le moment auquel effectuer le spray sur le silicone, nous souhaitons vérifier que le traitement ultrasons réalisé après celui-ci permet bien de décrocher les nanoparticules non bloquées dans le polymère. Les échantillons sont placés dans une cuve à ultrasons remplie d'eau pendant 2 minutes. L'eau de la cuve est ensuite filtrée et le filtre est teinté de noir. Il semble donc qu'à la suite du traitement, des DWNTs se soient décrochés de la plaque (et du silicone contenu dans celle-ci) pour se retrouver en suspension dans l'eau de la cuve.

Nous souhaitons comparer les surfaces d'un échantillon avant et après traitement aux ultrasons pour vérifier l'impact de celui-ci sur la quantité de nanoparticules présente en surface du silicone. Pour cela nous observons en microscopie électronique à balayage la surface de deux échantillons préparés dans les mêmes conditions, l'un avant traitement aux ultrasons (Figure III.24(a, b)) et l'autre après (Figure III.24(c, d)). Nous remarquons qu'il y a nettement moins d'amas en surface du silicone après traitement US qu'avant. Ce traitement est donc efficace pour éliminer les nanoparticules de carbone non bloquées dans le polymère.

Plusieurs traitements aux ultrasons de 2 minutes ont été appliqués successivement sur des échantillons dépôts de DWNTs sur silicone SYLGARD184. Des observations en microscopie

électronique à balayage ont été réalisées sur des surfaces d'échantillons ayant subi un ou plusieurs traitements aux ultrasons et aucune différence n'a été remarquée. Il semble qu'il n'y ait pas de relargages de NMC supplémentaires au-delà d'un traitement aux ultrasons de 2 minutes.

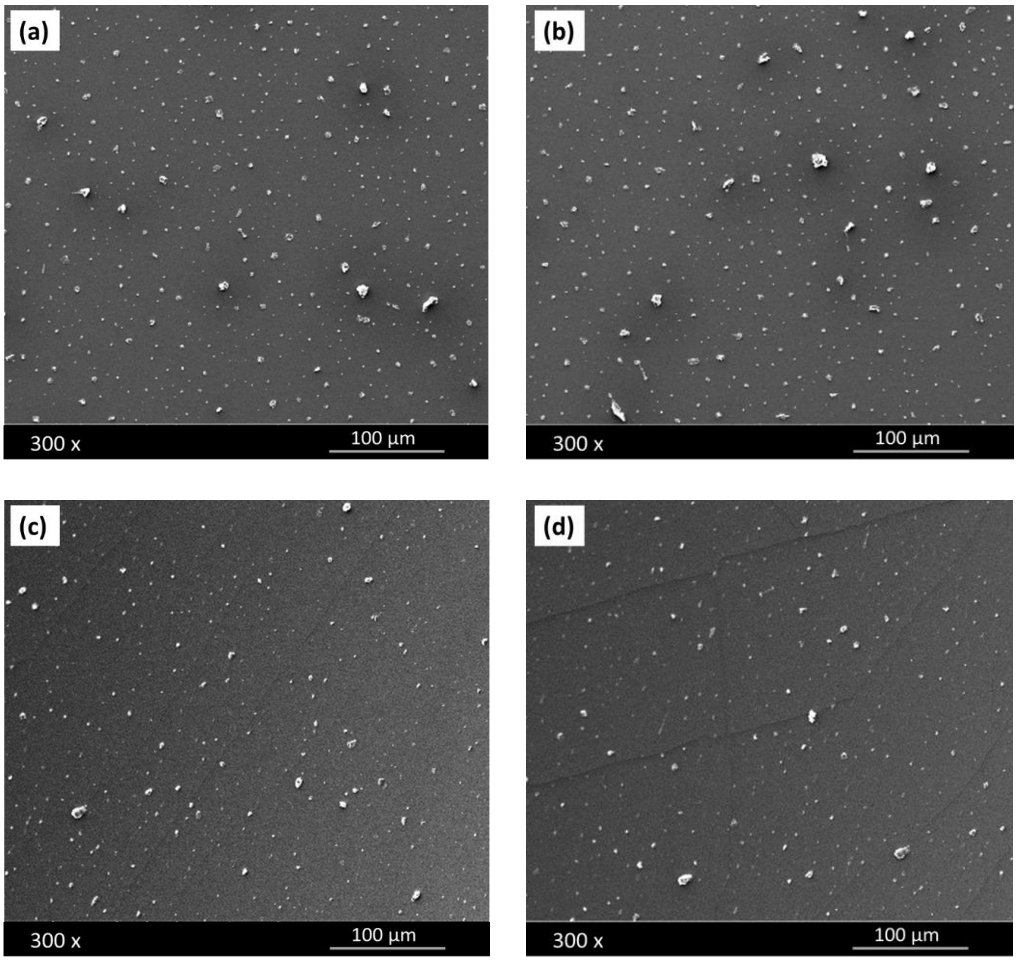


Figure III.24 : Observations au MEB de dépôts de nanotubes de carbone sur SYLGARD184 ; spray réalisé après polymérisation totale du silicone, (a, b) avant et (c, d) après traitement ultrasons.

III.4.4 Impact de la présence de dispersant (CMC)

Le dispersant CMC est utilisé pour obtenir des suspensions aqueuses stables dans le cas des NMCs non oxydés, c'est-à-dire les nanotubes de carbone bruts et le FLG. Nous souhaitons déterminer si l'utilisation de ce dispersant a un impact sur les échantillons préparés, et surtout s'il est totalement éliminé par notre procédure de lavage. En effet, la CMC est utilisée en même concentration massique que les NTCs, ce qui représente une quantité de matière non négligeable.

Pour cela nous préparons dans cette expérience des échantillons en pulvérisant une solution aqueuse de CMC (1 mg/mL, ce qui est la concentration massique de CMC utilisée dans les suspensions de nanomatériaux carbonés) selon le protocole habituel. Nous observons ensuite la surface de deux échantillons préparés dans les mêmes conditions, l'un avant traitement ultrasons et l'autre après Figure III.25.

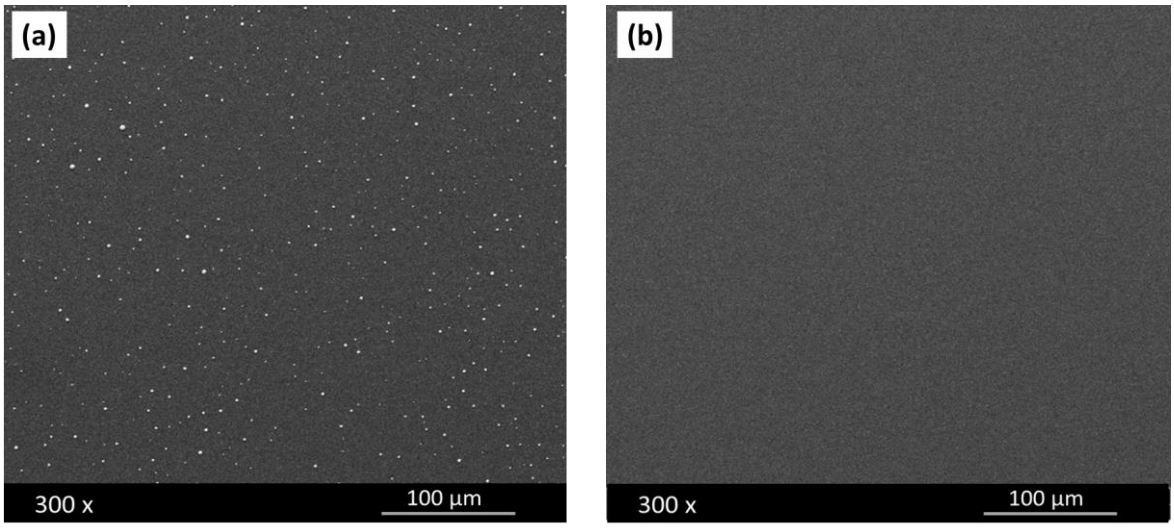


Figure III.25 : Observations au MEB de matériaux CMC sur SYLGARD184 ; spray réalisé après polymérisation totale du silicone, (a) avant et (b) après traitement ultrasons. 10kV

Des dépôts circulaires sont observés sur l'échantillon avant traitement aux ultrasons. Ces dépôts doivent correspondre à la CMC et sont répartis de façon homogène sur la surface de l'échantillon. Ces dépôts ne sont plus visibles après traitement aux ultrasons, ce dernier est donc efficace pour enlever la CMC de la surface du silicone. Nous pouvons supposer qu'un traitement aux ultrasons peut également nettoyer la CMC présente sur les nanoparticules de carbone, au moins en partie. En effet, on ne peut pas exclure qu'une partie de la CMC reste adsorbée en surface des NMCs, même en très petite quantité.

Le résultat de cette expérience conduit à réexaminer le résultat de l'expérience précédente (influence du traitement aux ultrasons sur la densité de particules en surface du matériau traité) : en effet, il n'est pas possible d'exclure qu'une partie de la diminution de la densité de particules en surface ne corresponde pas à la dissolution de particules de CMC isolées. Dans ce cas, l'essentiel des NTCs déposés en surface du silicone résiste bien au lavage aux ultrasons et la quantité décrochée lors du traitement correspond à ce qui se décroche du polystyrène de la plaque de puits. Cette hypothèse est difficile à vérifier car avant nettoyage aux ultrasons, des particules de CMC seule ou de NMCs recouverts de CMC sont indiscernables en surface.

D'après les différentes observations, le protocole mis au point permet donc d'élaborer des dépôts de DWNTs sur le silicone SYLGARD184, avec des nanomatériaux carbonés bloqués en surface, sans conséquences provenant de la CMC ajoutée pour stabiliser les encres. Nous décidons donc de préparer des échantillons à base de silicone SYLGARD184 et des différentes nanoparticules de carbone sélectionnées.

III.5. Dépôt de différents NMCs sur SYLGARD184

Nous comparons ici la surface du Sylgard184 après dépôt des différents NMCs (DWNTs B, DWNTs Ox, FLG et GO) par pulvérisation suivant le protocole décrit précédemment, après polymérisation complète (5 heures à 60°C) du silicone. Nous pulvérisons 2 mL de suspension aqueuse de nanoparticules carbonées de concentration C=1 mg/mL sur une plaque de culture 12 puits contenant 0,6 g de silicone dans chaque puits. Chaque puits reçoit environ 75 µg de nanoparticules carbonées.

Les échantillons sont nettoyés à la cuve à US pendant 2 minutes avant d'être métallisés avec 5 nm de platine. De la laque d'argent est appliquée avant observation.

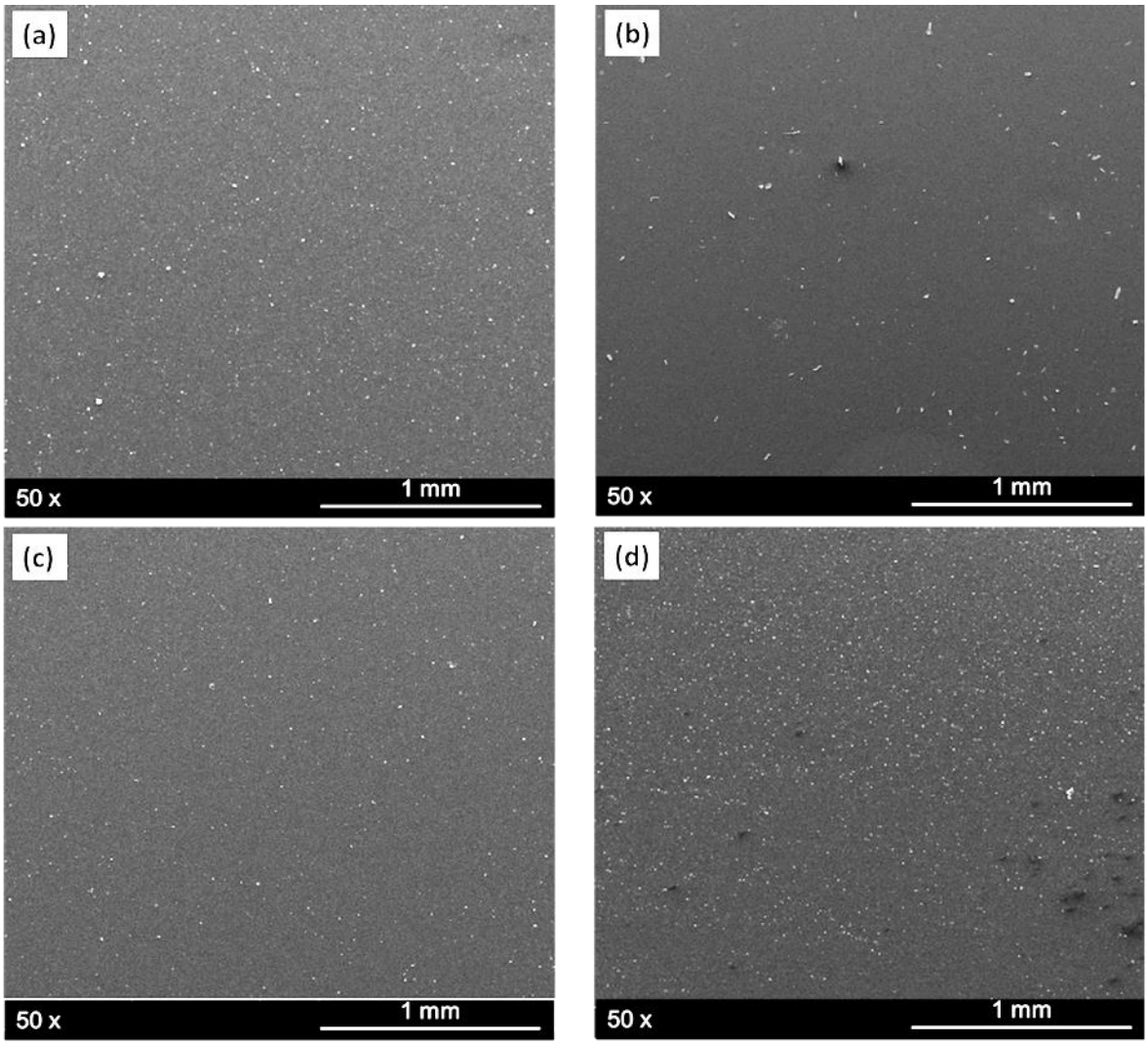


Figure III.26 : Observations au MEB de matériaux nanoparticules de carbone sur silicone SYLGARD184 : (a) DWNTs ; (b) DWNTs Ox ; (c) FLG ; (d) GO. Grandissement x50 ; 10kV.

Nous observons des amas de nanoparticules de carbone (en blanc) sur du silicone (fond plus foncé) sur tous les échantillons (Figure III.26). Les nanoparticules sont réparties de façon homogène sur le matériau.

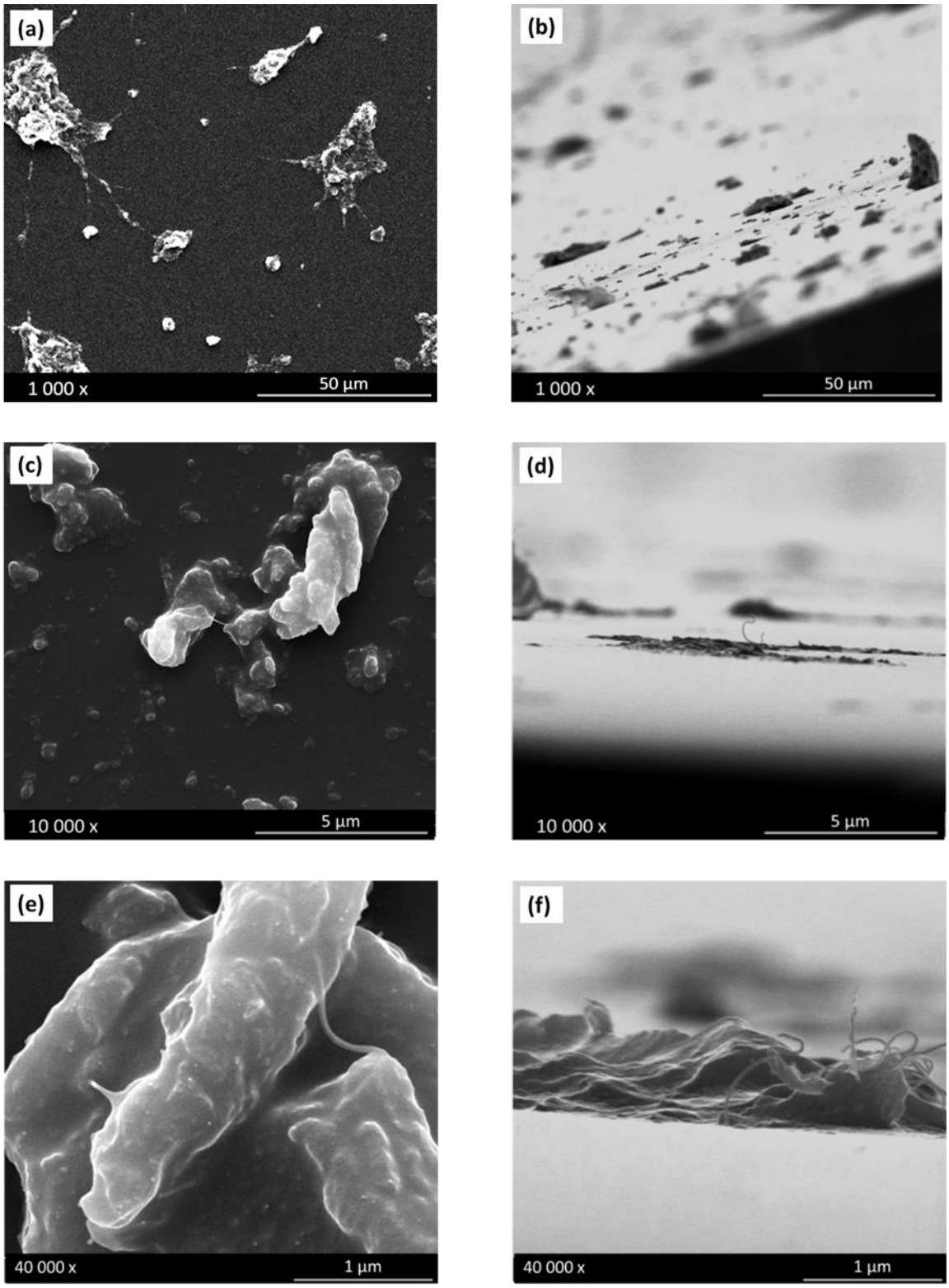


Figure III.27 : Observations au MEB d'un dépôt de DWNTs B sur silicone SYLGARD184 à différents grandissements ; (a, b) x 1000 ; (c, d) x 10 000 ; (e, f) x 40 000. 10kV.

Nous observons des amas de différentes formes en surface, qui semblent plus ou moins enfoncés dans le silicone (Figure III.27). Nous discernons des faisceaux de nanotubes, ces amas correspondent donc à des agglomérats de nanotubes de carbone, tels qu'ils sont déjà observés dans les échantillons de DWNTs bruts (Figure III.1 Figure III.2).

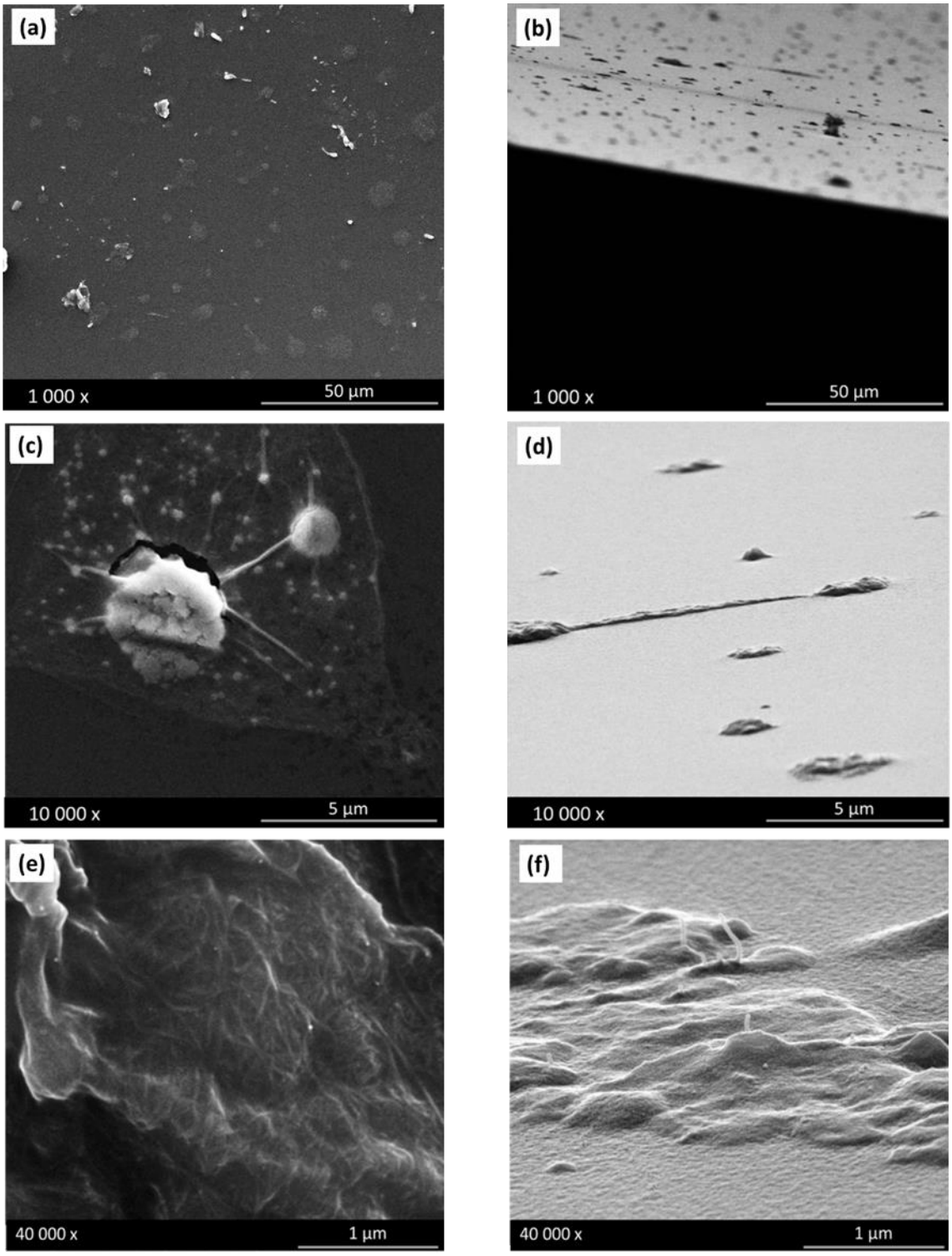


Figure III.28 : Observations au MEB d'un dépôt de DWNTs Ox sur silicone SYLGARD184 à différents grandissements ; (a, b) x 1000 ; (c, d) x 10 000 ; (e, f) x 40 000. 10kV.

En augmentant le grandissement dans le cas du dépôt de nanotubes de carbone oxydés sur silicone SYLGARD184 nous apercevons de nombreux amas de nanoparticules avec des contrastes différents, ce qui traduit probablement un niveau d'enfoncement différent des nanoparticules dans le silicone (Figure III.28). Nous observons des agglomérats de nanoparticules de carbone qui émergent du silicone et nous apercevons également les faisceaux de nanotubes qui constituent les amas. Certains amas sont circulaires. Les nanotubes oxydés se dispersent bien dans l'eau grâce à leurs fonctions oxygénées, cette forme correspond sûrement à celle des gouttes de suspension aqueuse pulvérisées.

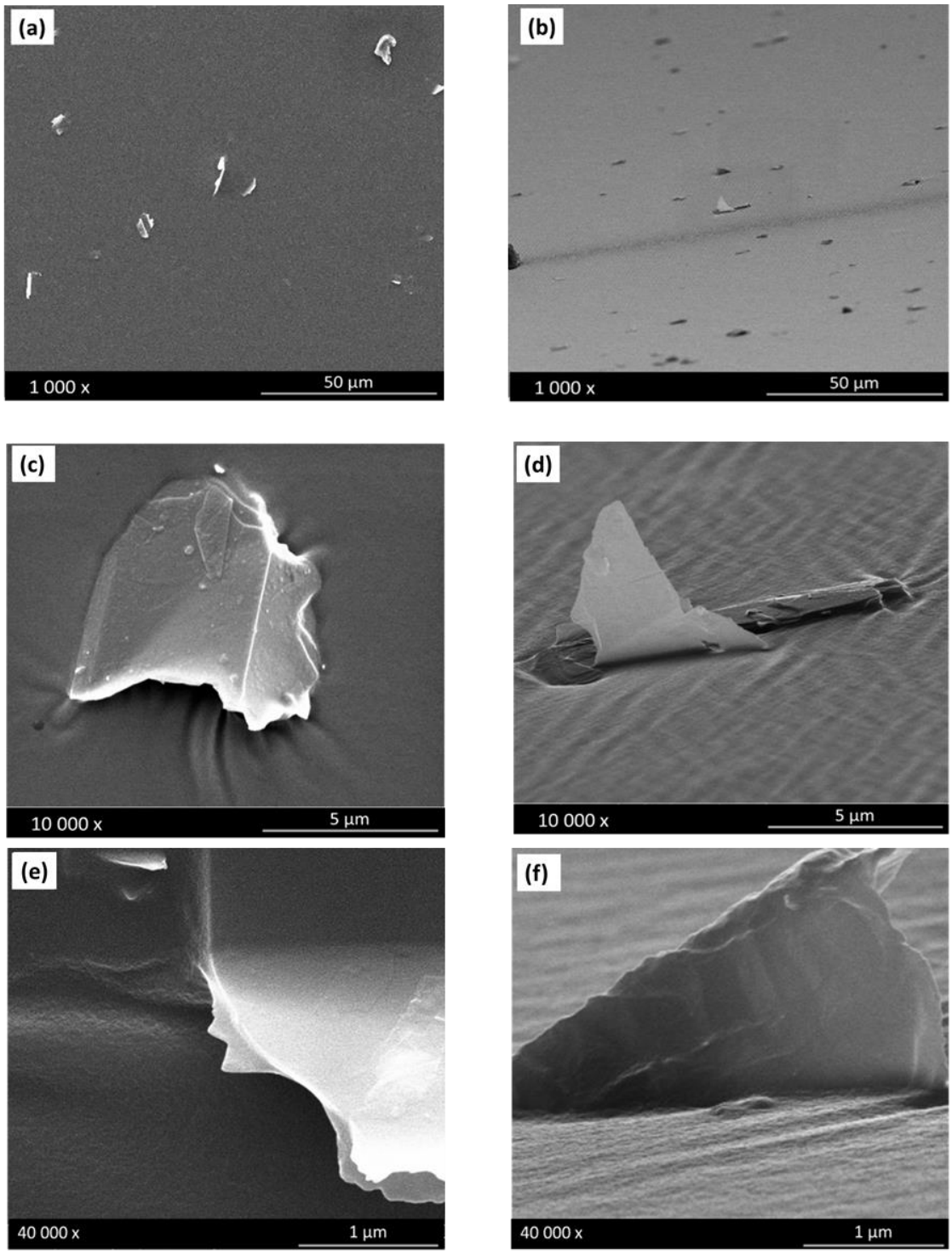


Figure III.29 : Observations au MEB d'un dépôt de FLG sur silicone SYLGARD184 à différents grandissements ; (a, b) x 1000 ; (c, d) x 10 000 ; (e, f) x 40 000. 10kV.

Nous observons des amas de nanoparticules de carbone qui émergent du polymère. Nous pouvons discerner les différents feuillets de graphène sur ces agglomérats de nanoparticules (Figure III.29).

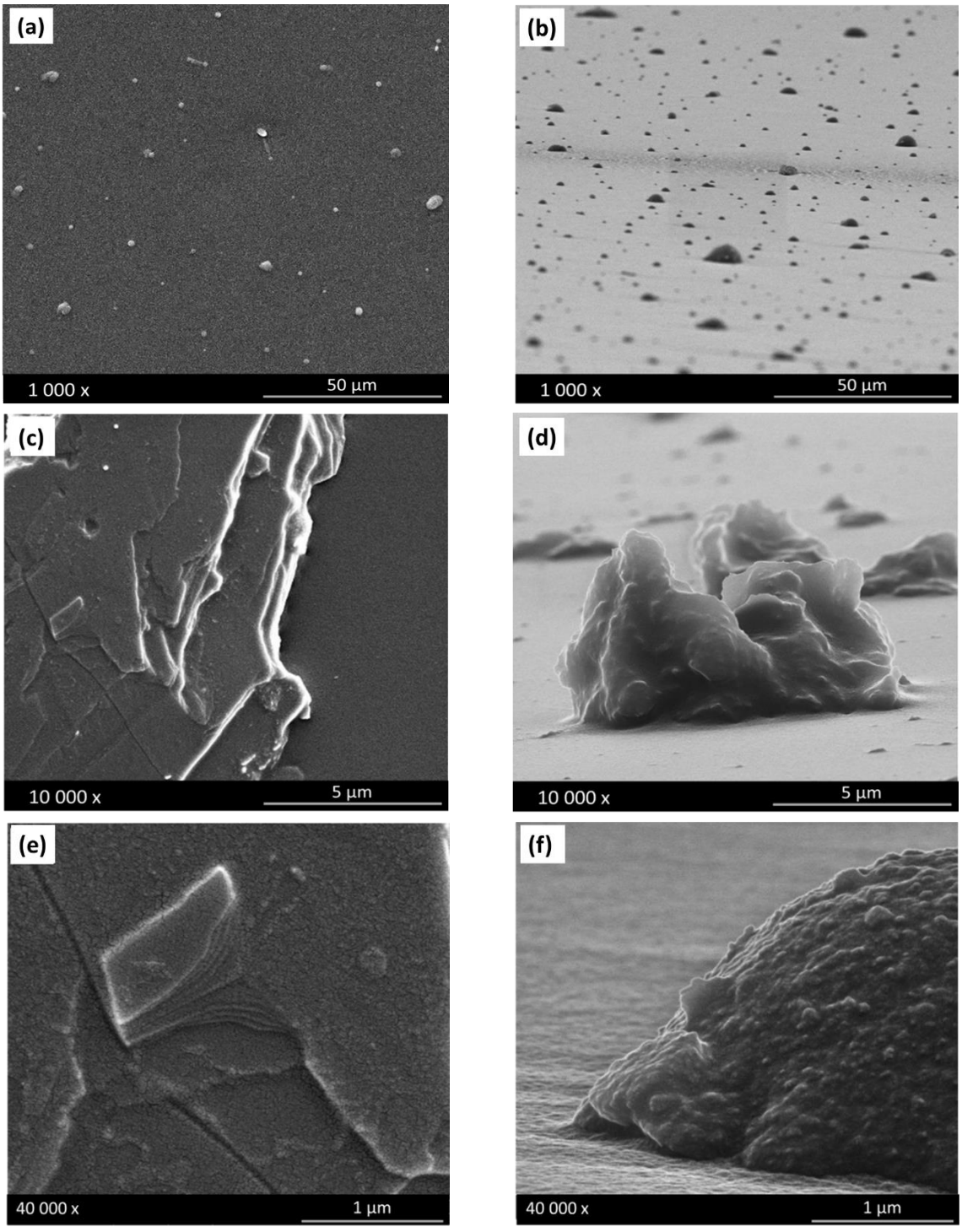


Figure III.30 : Observations au MEB d'un dépôt de graphène oxydé sur silicone SYLGARD184 à différents grandissements ; (a, b) x 1000 ; (c, d) x 10 000 ; (e, f) x 40 000. 10kV.

Nous observons des dépôts circulaires en surface du silicone (Figure III.30). Comme les nanotubes oxydés, le graphène oxydé se disperse bien dans l'eau grâce à ses fonctions oxygénées. Il

semble que ces dépôts soient des amas de graphène oxydé qui s'assemblent selon la forme d'une goutte. Nous identifions bien les feuillets de graphène sur certains amas.

Ainsi nos différentes observations révèlent la présence de nanoparticules de carbone en surface du silicone, dont une partie sous forme d'agglomérats. A fort grandissement nous pouvons identifier les nanoparticules qui constituent ces agglomérats, nous distinguons en effet des faisceaux de nanotubes ainsi que des feuillets de graphène selon les cas. Les différentes orientations d'observation suggèrent que ces nanoparticules ont à la fois une partie enfouie dans le polymère, et à la fois une partie émergeant de la surface. Les différents critères d'élaboration semblent donc respectés. Les différences de formes de dépôts selon la nature des NMCs, d'une part non oxydés (DWNTs et FLG) et d'autre part oxydés (DWNTs Ox et GO) peuvent s'expliquer par leur différence de stabilité en milieu aqueux. Grâce à leurs fonctions oxygénées, les nanoparticules oxydées se dispersent mieux dans l'eau, la forme circulaire de leurs amas est sans doute liée à celle des gouttelettes d'eau pulvérisées.

Suite à ces résultats satisfaisants, nous avons souhaité valider ce protocole d'élaboration sur un autre silicone. Nous choisissons d'utiliser le silicone de grade biomédical MED-4917 avantor Nusil [291]. Ce silicone élastomère de faible consistance est aussi bi-composant, cette fois mélangé en ratio 1 :1. Il trouve des applications en revêtement ou encapsulation par exemple.
Nous décidons de conserver les mêmes paramètres d'élaboration que pour le silicone SYLGARD184 et d'effectuer le spray à polymérisation complète du silicone. Comme précédemment, la présence de nanoparticules bloquées en surface du silicone sera vérifiée par observations au MEB.

III.6. Dépôt de différents NMCs sur MED4917

Comme auparavant les échantillons silicone sont préparés dans des puits de plaques de cultures en polystyrène. D'après sa fiche technique le silicone MED4917 polymérise en 30 minutes à 150°C [291]. Pour ne pas risquer d'endommager le support polystyrène qui peut commencer à se dégrader à partir de 70°C, nous décidons de garder la même température de travail de 60°C pour accélérer la polymérisation du silicone. Après pulvérisation des NMCs en surface du silicone, les échantillons sont nettoyés à la cuve à ultrasons pendant 2 minutes. Ils sont ensuite métallisés et de la laque d'argent est appliquée pour pouvoir réaliser les observations au MEB.

Tout d'abord nous observons les surfaces des échantillons de silicone seul et de silicone après dépôt d'une solution de CMC à 1 mg/mL puis lavage 2 minutes à la cuve à ultrasons sur le silicone MED4917 (Figure III.31).

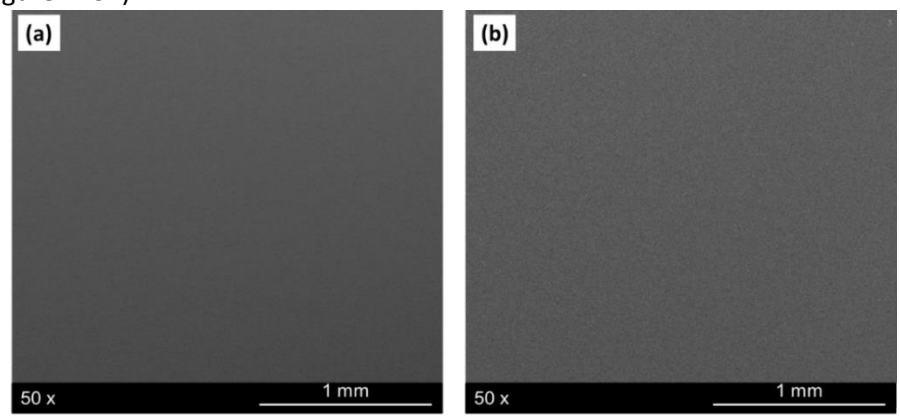


Figure III.31 : Observations au MEB (a) référence silicone MED4917 ; (b) silicone MED4917 après dépôt d'une solution de CMC puis lavage aux ultrasons.

Comme pour le silicone SYLGARD184 nous n'observons rien en surface de l'échantillon après dépôt sur silicone MED4917 de la solution contrôle de CMC puis nettoyage (Figure III.31). Les échantillons de NMCs déposés sur silicone MED4917 sont ensuite observés.

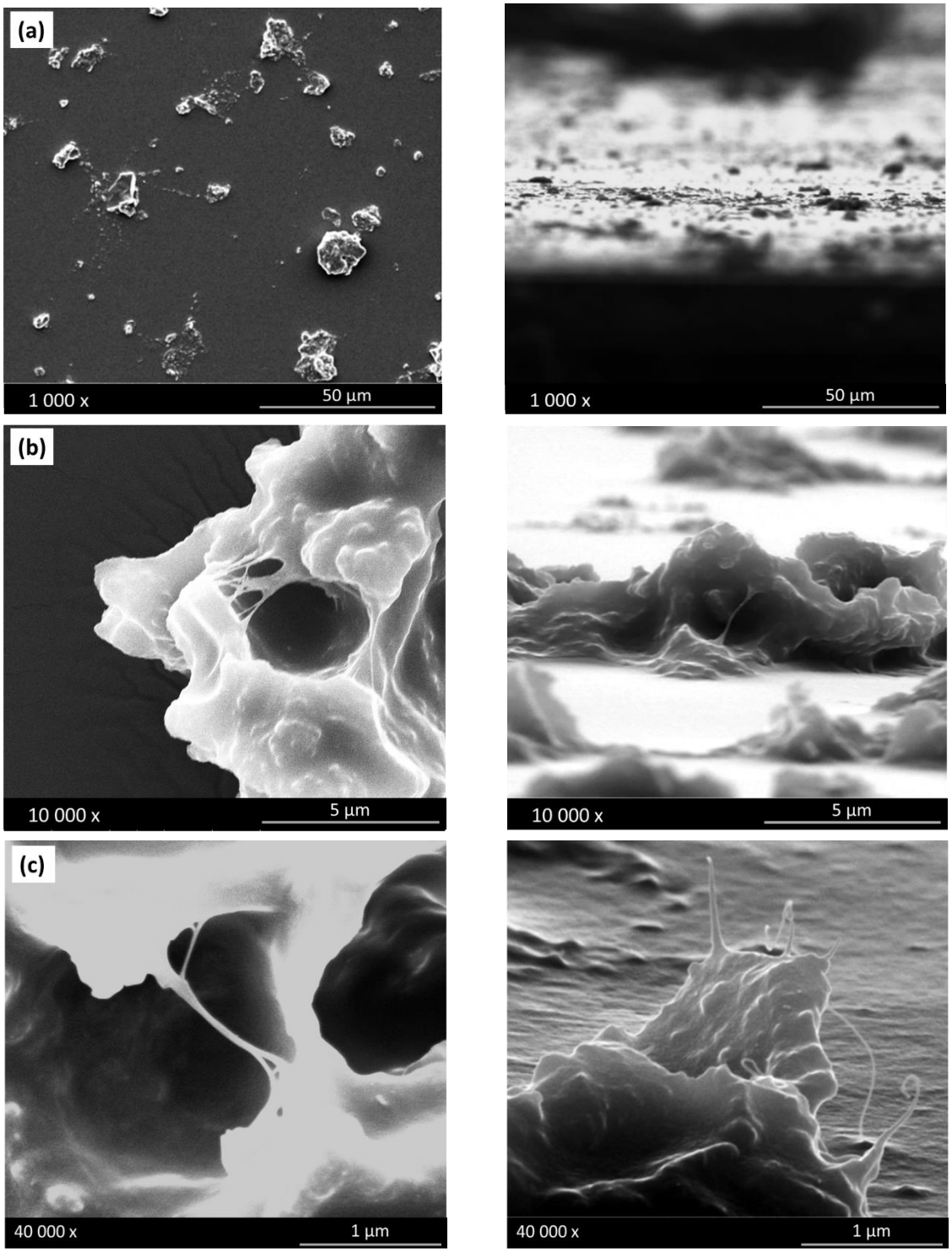


Figure III.32 : Observations au MEB de dépôts de DWNTs B sur silicone MED4917. a) x1 000 ; b) x10 000 ; c) x40 000. 10 kV

A faible grandissement nous observons des amas de nanoparticules en surface du silicone qui sont répartis de façon homogène (Figure III.32). Ces amas semblent émerger du silicone et être en partie bloqués sous la surface. Par endroit nous pouvons observer les faisceaux de nanotubes qui constituent ces amas (Figure III.32).

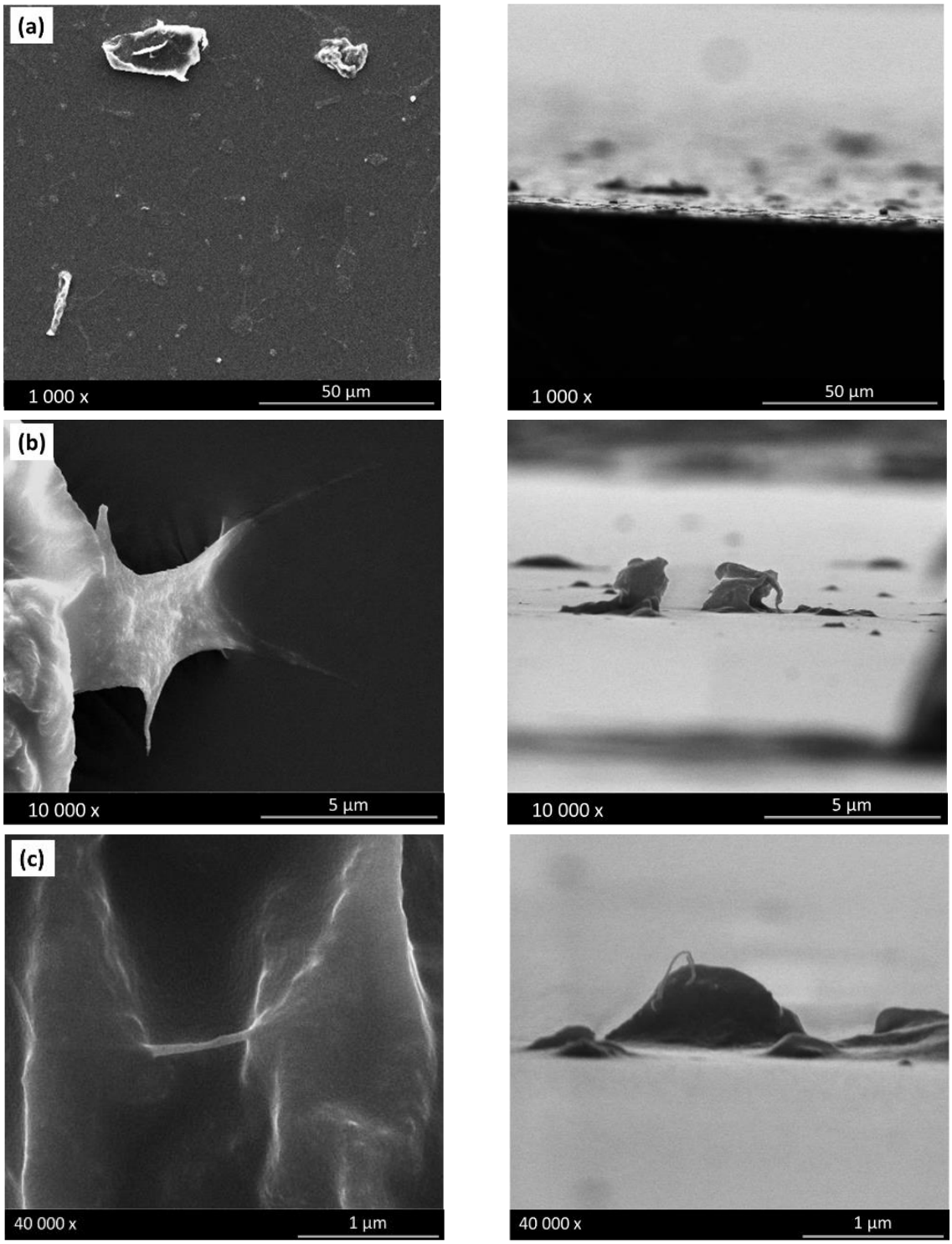


Figure III.33 : Observations au MEB de dépôts de DWNTs Ox sur silicone MED4917. a) x1 000 ; b) x10 000 ; c) x40 000. 10 kV

Comme pour l'échantillon précédent des amas de nanoparticules apparaissent en surface du silicone, qui sont répartis de façon homogène a faible grandissement (Figure III.33). Nous observons des amas ayant des formes circulaires, comme ceux que nous avons pu observer en surface de l'échantillon DWNTs Ox/SYLGARD184. Cela correspond très probablement à la forme des gouttelettes pulvérisées dans lesquelles ces nanoparticules sont très bien dispersées. Ces amas de nanoparticules semblent émerger du silicone et être en partie bloqués sous la surface. Par endroit nous pouvons observer les faisceaux de nanotubes qui constituent ces amas.

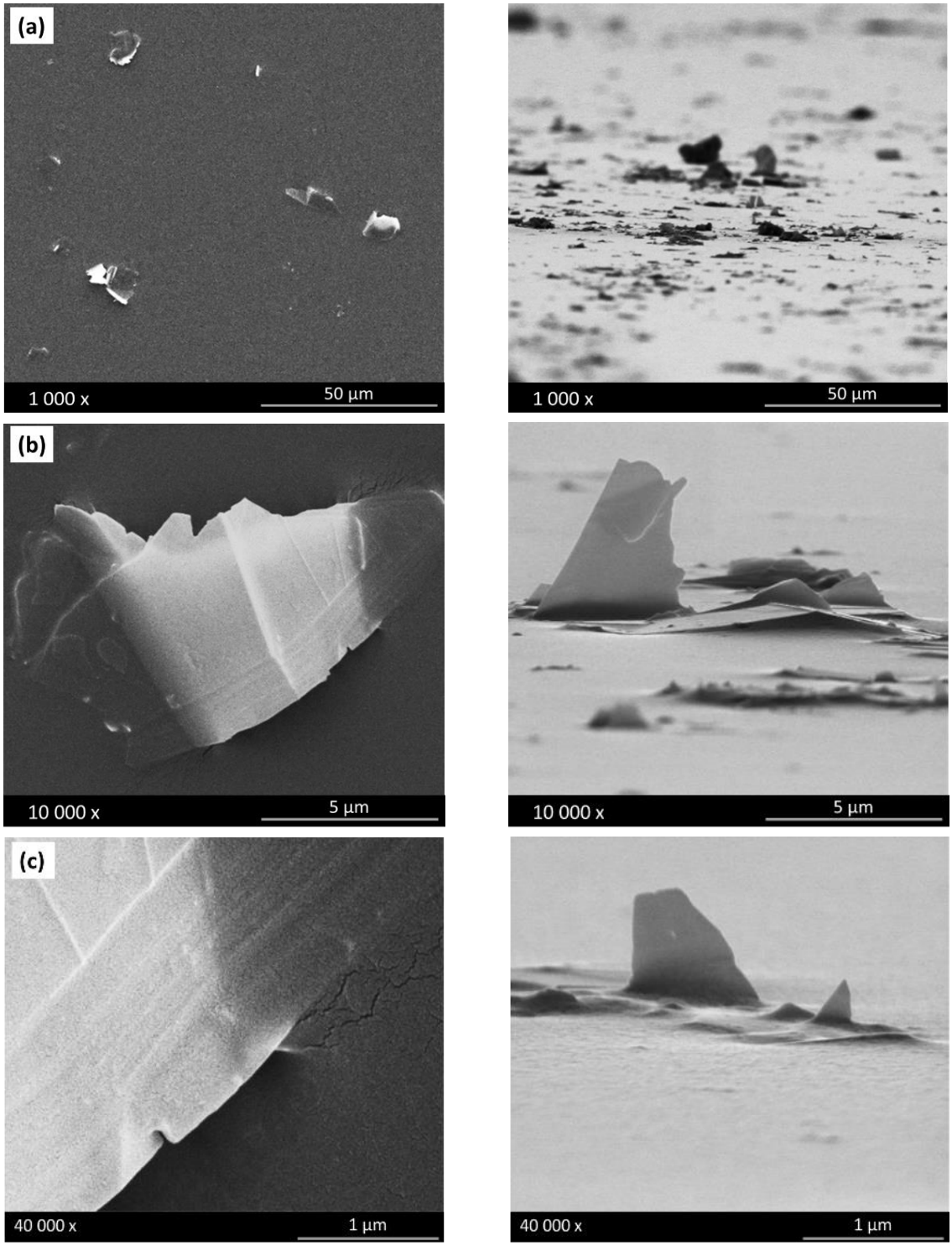


Figure III.34 : Observations au MEB de dépôts de FLG sur silicone MED4917. a) x1 000 ; b) x10 000 ; c) x40 000. 10 kV

A faible grandissement nous observons des amas de nanoparticules en surface du silicone qui sont répartis de façon homogène (Figure III.34). Nous observons des amas de contrastes différents qui semblent avoir une partie bloquée dans le silicone et une autre émergeant de la surface. Nous apercevons des feuillets de graphène qui émergent de la surface du silicone comme des « arrêtes ». Nous apercevons des empilements de feuillets de graphène.

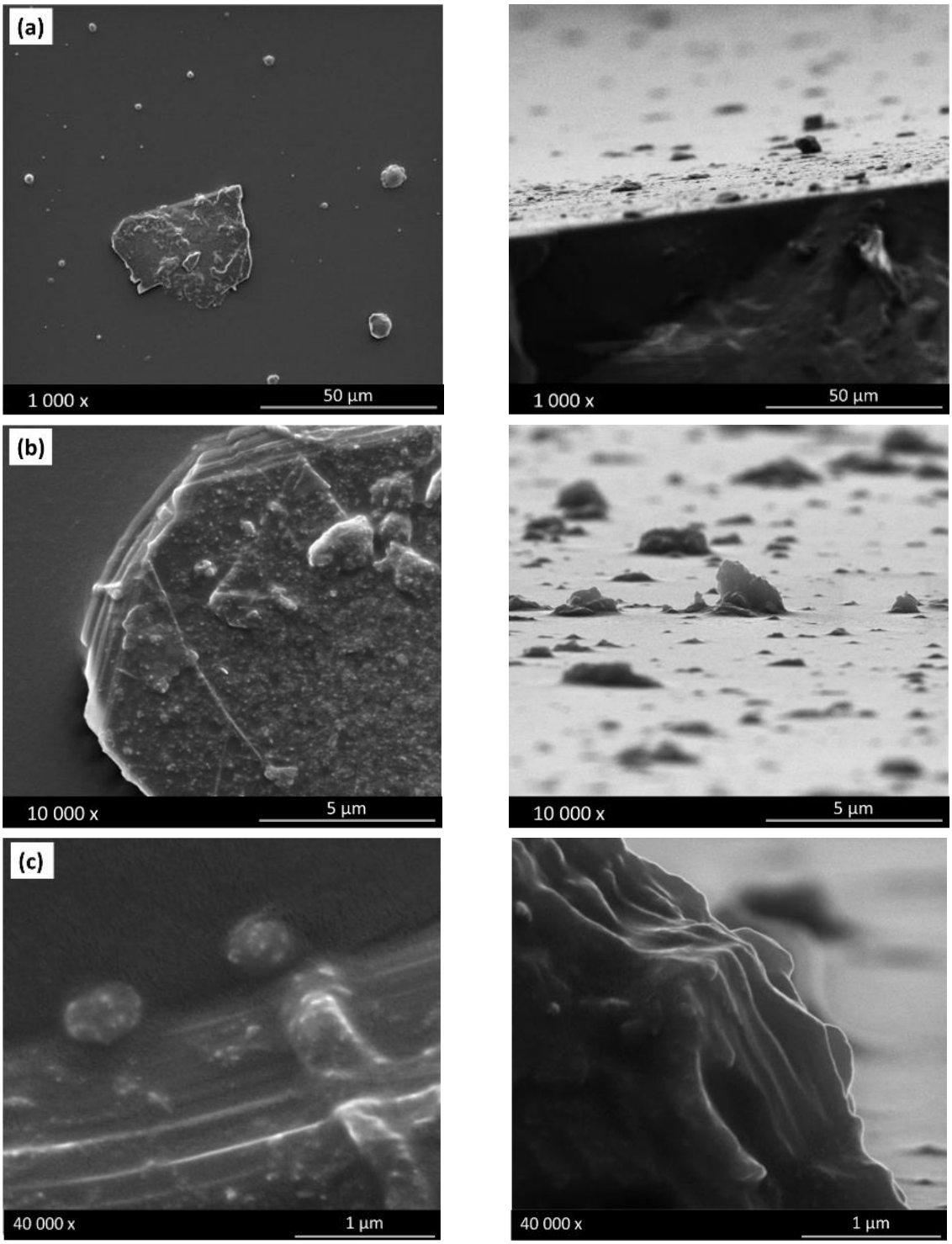


Figure III.35 : Observations au MEB de dépôts de GO sur silicone MED4917. a) x1 000 ; b) x10 000 ; c) x40 000. 10 kV

A faible grandissement nous observons des amas de nanoparticules en surface du silicone qui sont répartis de façon homogène (Figure III.35). Comme pour l'échantillon GO / SYLGARD184, nous observons des amas de formes circulaires en surface du silicone. Cela est sans doute dû aux fonctions oxygénées du GO qui permettent une bonne dispersion dans l'eau, ces formes circulaires sont très probablement celles des gouttes de la suspension aqueuse de GO pulvérisée. Comme pour les autres échantillons, les amas de nanoparticules semblent avoir une partie bloquée dans le silicone et une autre émergeant de la surface. Nous apercevons des empilements de feuillets de graphène sur les amas.

Ainsi nous avons observé les échantillons de silicone MED4917 après dépôt par pulvérisation des différents NMCs selon deux orientations différentes. Comme dans le cas du silicone SYLGARD184, les différentes observations révèlent la présence des NMCs vraisemblablement enchâssés en surface du silicone. A faible grandissement nous avons pu observer des amas de nanoparticules (en blanc) en surface du silicone (fond plus foncé). Ces amas sont répartis de façon homogène sur la surface des échantillons. A plus fort grandissement nous pouvons identifier les nanoparticules qui constituent ces agglomérats, nous distinguons en effet des faisceaux de nanotubes ainsi que des feuillets de graphène selon les matériaux. A partir des différents angles d'observation, il semble que ces nanoparticules aient à la fois une partie enfouie dans le polymère, et à la fois une partie émergeant de la surface. Ces observations sont similaires à celles des réalisées dans le cas du silicone SYLGARD 184. De même que précédemment, les nanoparticules de nanotubes oxydés et de graphène oxydé s'assemblent en amas circulaire en surface du silicone.

Nous démontrons ainsi l'adaptabilité du protocole que nous avons développé puisqu'il fonctionne sur deux silicones différents. Ainsi ce protocole, qui est relativement facile à mettre en œuvre, pourrait potentiellement être étendu à d'autres matériaux polymères, même s'il resterait à valider que les silicones ne jouent pas un rôle particulier en ce qui concerne la bonne adhésion des NMCs à leur surface.

III.7. Autre méthode d'élaboration :

Nous avons mis au point un protocole permettant de réaliser des matériaux correspondant à nos attentes, cependant nous voulons déterminer si d'autres voies d'élaboration sont possibles.
Une méthode alternative serait d'incorporer une fraction de silicone non polymérisé dans la suspension de nanoparticules à pulvériser. Avec une très faible quantité de silicone non polymérisé ajoutée à la suspension il serait toujours possible de pulvériser le mélange. D'après les observations précédentes, le spray de nanoparticules de carbone permet de fixer une partie de ces nanoparticules dans le polymère. Cependant certaines nanoparticules ne sont potentiellement pas bloquées dans le silicone et peut-être éliminées lors du traitement à la cuve à ultrasons. Avec l'incorporation d'une fraction de silicone dans la suspension à pulvériser, la polymérisation progressive du silicone de la suspension sur le silicone du support permettrait de fixer progressivement les nanoparticules non bloquées. Cela permettrait peut-être de bloquer toutes les nanoparticules en surface en évitant les pertes de matière lors du traitement à la cuve à ultrasons.

Nous ne pouvons pas utiliser de suspension aqueuse de NMCs pour tester cette hypothèse car le silicone n'est pas miscible avec l'eau, nous devons donc trouver un solvant adéquat. Nous décidons de préparer la suspension de nanomatériaux carbonés dans du cyclohexane car c'est un solvant du silicone. Nous avons choisi d'utiliser des nanoparticules de graphène oxydé pour réaliser ces tests car c'est l'un des NMCs qui montre la meilleure acticité antimicrobienne (Chapitre 5). Cependant le graphène oxydé se dispersant très mal dans le cyclohexane, nous allons donc tester le mélange silicone + cyclohexane + GO en le le dispersant à la cuve à ultrasons juste avant pulvérisation. Nous utilisons

une proportion 1:4 en masse de silicone non polymérisé par rapport à la quantité de GO dans la suspension. Nous effectuons un test en utilisant la concentration habituelle de nanoparticules en suspension de 1 mg par ml de solvant, et en ajoutant 0,25 mg de silicone non polymérisé. Nous testons ce protocole avec les deux silicones SYLGARD184 et MED4917. Nous réalisons ensuite des observations MEB pour évaluer les dépôts et déterminer s'ils correspondent aux différents critères établis.

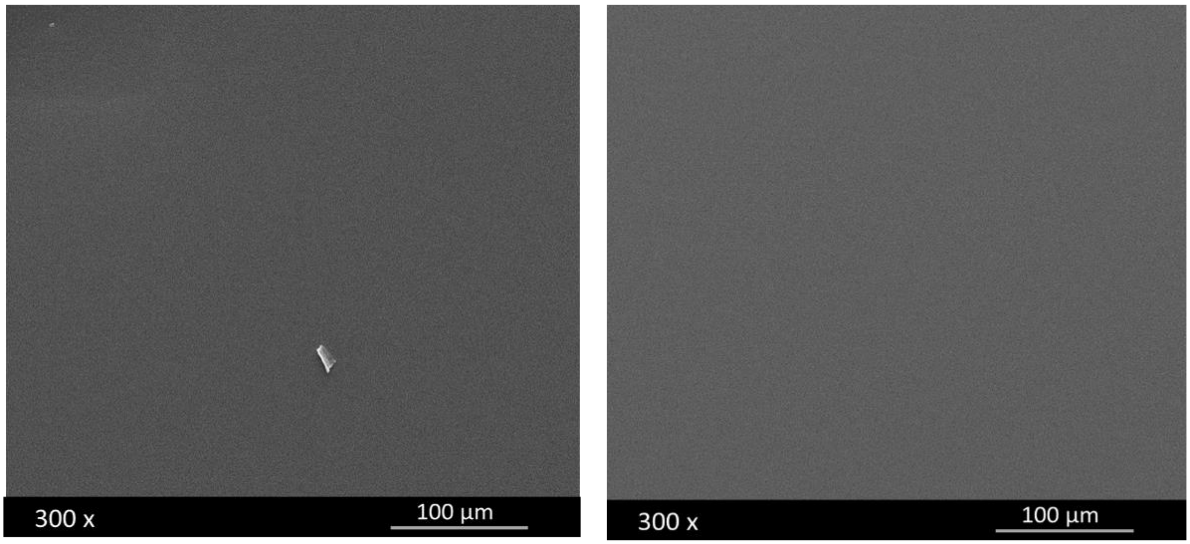


Figure III.36 : Observations au MEB d'un matériau silicone SYLGARD184 avec pulvérisation en surface d'une suspension GO-cyclohexane-SYLGARD184 non polymérisé.

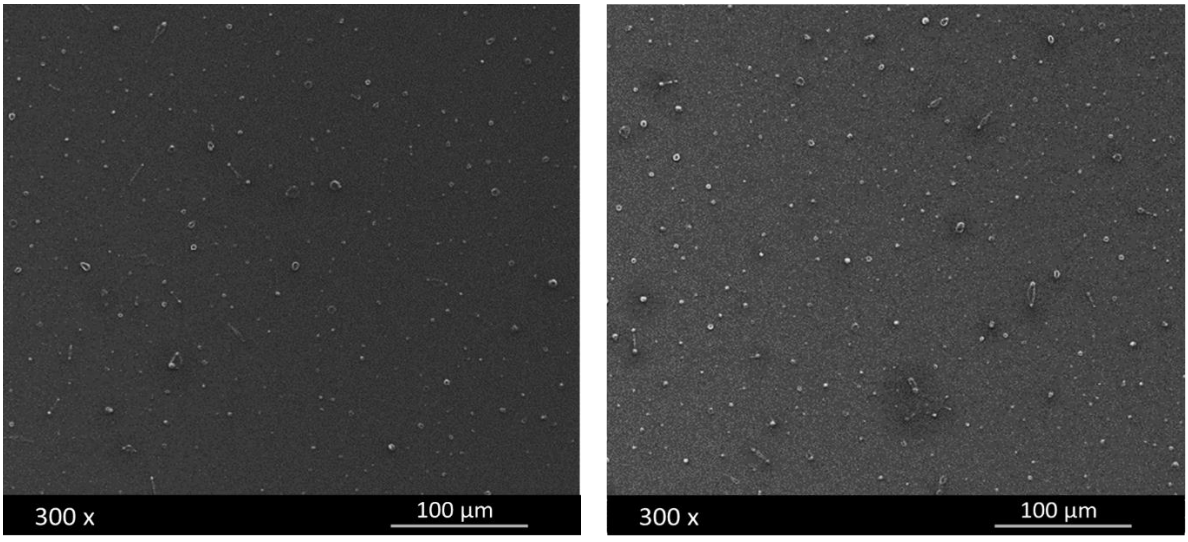


Figure III.37 : Observations au MEB d'un matériau silicone SYLGARD184 avec pulvérisation en surface d'une suspension aqueuse GO.

Nous n'observons pas, ou très peu, de nanoparticules en surface des matériaux préparés par pulvérisation d'une suspension cyclohexane-GO-SYLGARD184 non polymérisé(Figure III.36), contrairement aux matériaux préparés par pulvérisation d'une suspension aqueuse de GO où de nombreux dépôts sont visibles en surface du silicone (Figure III.37). Les nanoparticules ont sans doute

été recouvertes de silicone et seul quelques amas émergent. Il est aussi possible que la mauvaise dispersion du GO dans ces conditions ait conduit au blocage des particules dans l'aérographe.

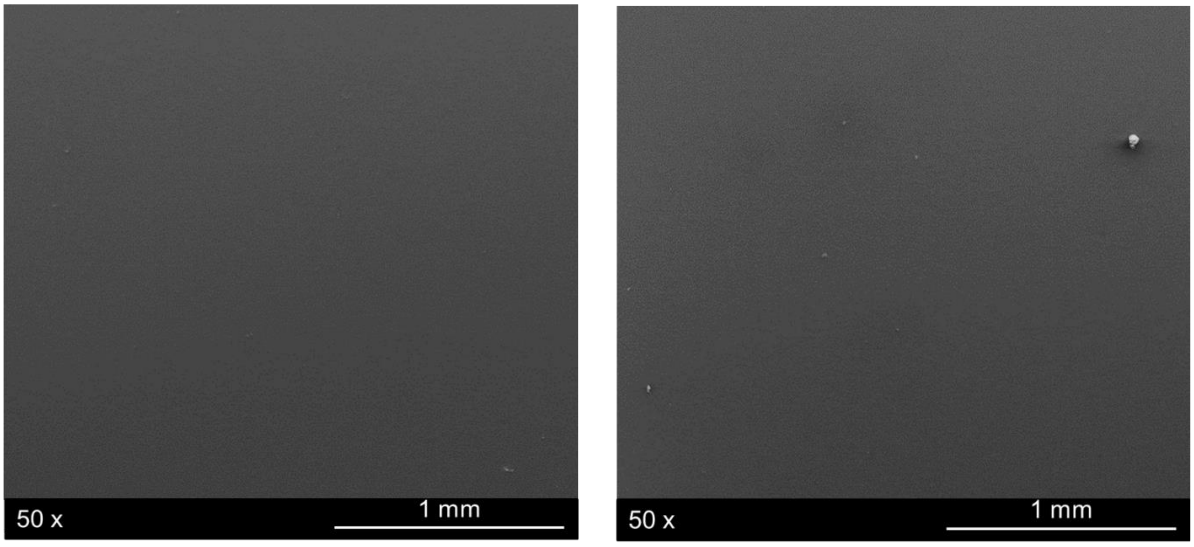


Figure III.38 : Observations au MEB d'un matériau silicone MED4917 avec pulvérisation avec pulvérisation en surface d'une suspension GO-cyclohexane-MED4917 non polymérisé

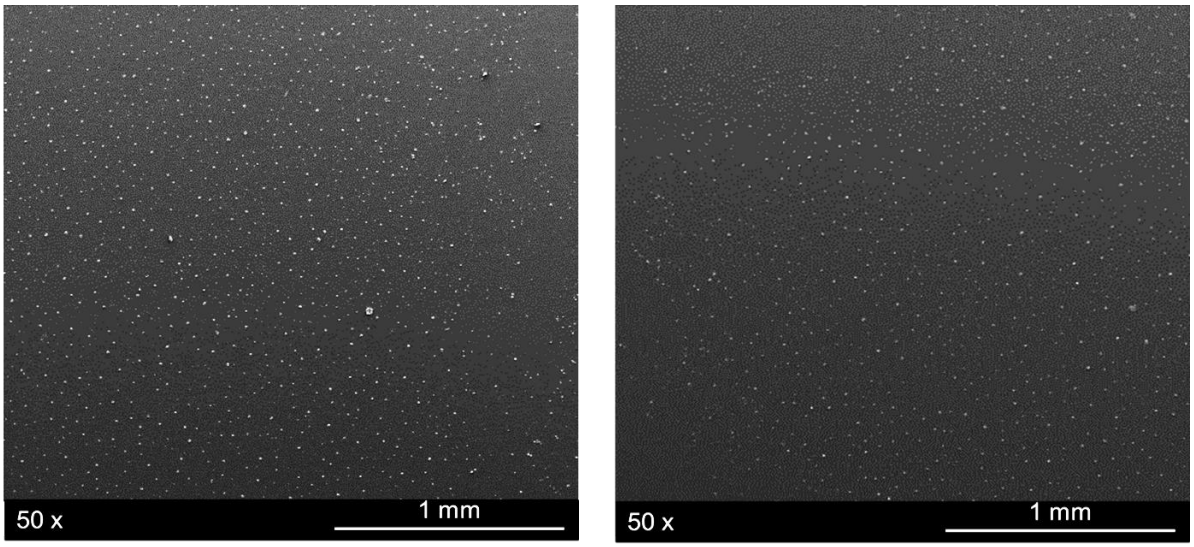


Figure III.39 : Observations au MEB d'un matériau silicone MED4917 avec pulvérisation en surface d'une suspension aqueuse GO.

Les observations sont similaires à celles réalisées sur les échantillons à base de SYLGARD184 (Figure III.36 Figure III.37). Nous n'observons pas, ou très peu, de nanoparticules en surface des matériaux préparés par pulvérisation d'une suspension cyclohexane-GO-MED4917 non polymérisé (Figure III.38), contrairement aux matériaux préparés par pulvérisation d'une suspension aqueuse de GO où de nombreux dépôts sont visibles en surface du silicone (Figure III.39). Les nanoparticules ont sans doute été recouvertes de silicone et seul quelques amas émergent, ou bien elles sont restées en partie bloquées dans l'aérographe suite à leur mauvais état de dispersion.

Ainsi ce protocole ne permet pas d'atteindre les améliorations escomptées. Nous n'observons pas de nanoparticules de carbone en surface des matériaux silicone, contrairement aux matériaux

élaborés avec le premier protocole. Les nanoparticules ont sans doute été recouvertes de polymère, ou bien n'ont pas atteint leur cible.
Nous conservons donc le premier protocole de pulvérisation d'une suspension aqueuse de nanomatériaux carbonés sur du silicone pour obtenir des matériaux avec des nanoparticules de carbone bloquées dans le polymère et affleurants à sa surface. Il serait toutefois intéressant de poursuivre ces essais avec du FLG qui présenterait peut-être une meilleure stabilité en suspensions dans le cycohexane. En effet, l'approche incluant du silicone non polymérisé dans la préparation laisse entrevoir un protocole plus facile à étendre à tout type de surface.

III.8. Angle de contact :

L'objectif est de déterminer si la présence de ces nanoparticules modifie les propriétés hydrophobes de la surface du silicone. Pour cela nous réalisons des mesures d'angle de contact sur nos différents échantillons (Figure III.40). Nous déposons une goutte d'eau sur la surface de l'échantillon et nous relevons l'angle de contact 2s après le dépôt. Nous réalisons 3 réplicas pour chaque échantillon.

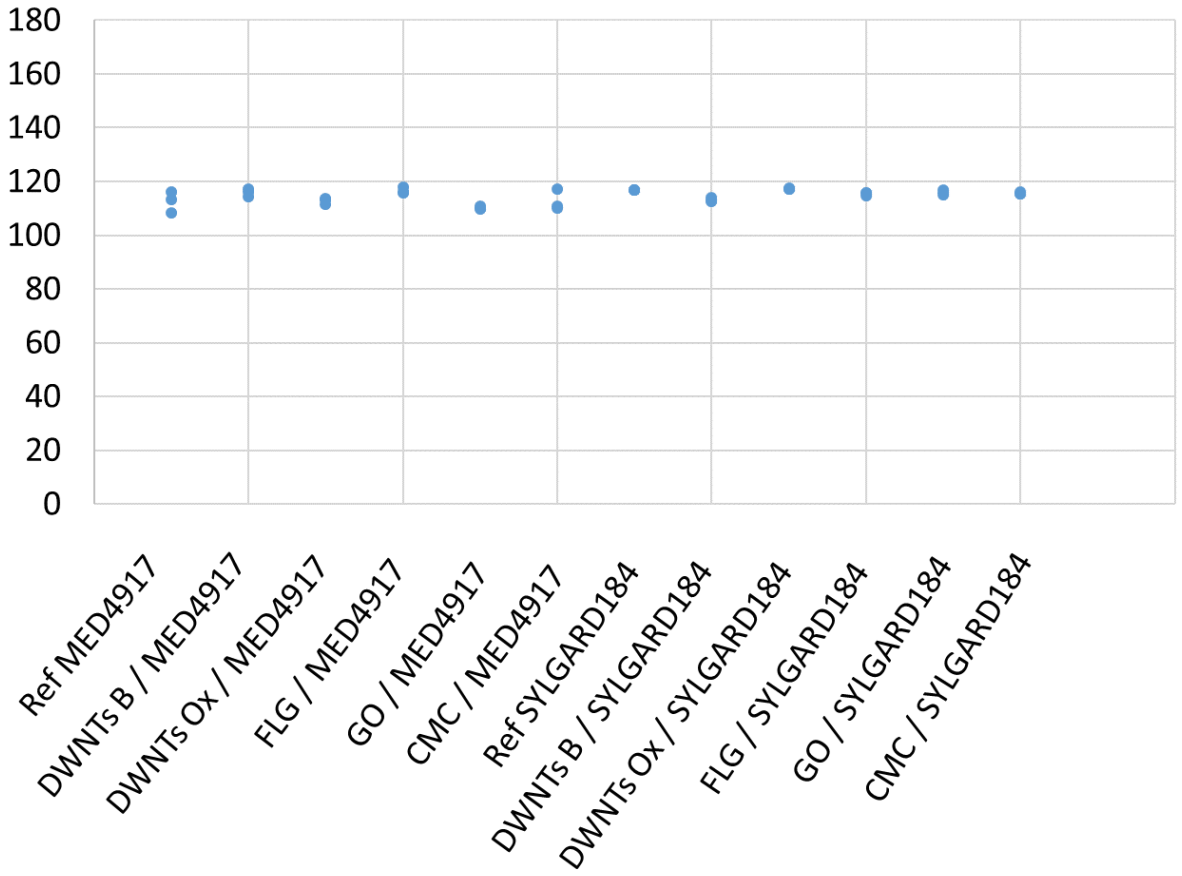


Figure III.40 : Mesures d'angle de contact sur les matériaux références silicones, les matériaux dépôts NMCs sur silicone et dépôt CMC sur silicone. n=3

Tous les angles de contacts mesurés sont compris entre 108 et 118°, l'écart type est de 2,6° entre toutes les mesures réalisées (Figure III.40). Ces écarts sont très faibles, les différents dépôts ne

semblent donc pas avoir d'influence sur les propriétés hydrophobes de surface du silicone. Cela peut par exemple être lié soit à une quantité trop faible en surface, ou encore au recouvrement des particules par une fine couche de silicone.

III.9. AFM :

Des mesures AFM sont réalisées sur les différents échantillons. Des surfaces de 10 µm x 10 µm sont analysées avec 256 x 256 pixels et des courbes de force sont produites sur chaque pixel des images, ainsi 65 536 courbes de force sont enregistrées pour chaque mesure AFM à la surface des échantillons. Un microlevier de constante de raideur comprise entre 0,591 et 0,796 N/m, une vitesse d'approche de 30 µm/s, une longueur z de 0,28 µm et une force maximale de 2 nN sont appliqués. De nombreuses informations peuvent être extraites de ces courbes de force, notamment la topologie de surface de l'échantillon, les valeurs d'adhésivité, ainsi que les différentes valeurs de pente qui renseignent sur la rigidité de l'échantillon. Des cartographies sont produites à partir de ces mesures où chaque valeur est associée à une couleur et l'intensité des paramètres est représentée par une échelle de couleur, ce qui permet de visualiser la surface de l'échantillon.

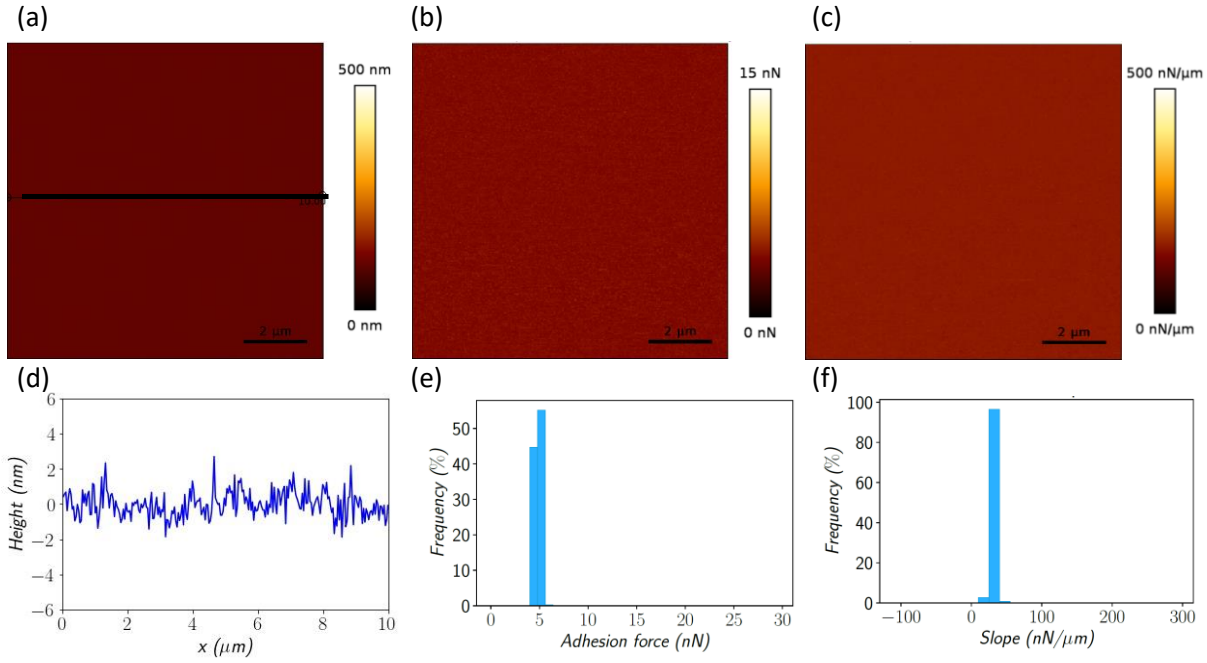


Figure III.41 : Cartographies AFM multiparamétriques d'un échantillon référence S184 ; (a) topographie, (b) adhésivité (c) rigidité, (d) profil en hauteur, (e) histogramme de répartition des valeurs d'adhésion et (f) histogramme de répartition des valeurs de pentes.

Les cartographies de hauteur, d'adhésivité et de rigidité présentent des surfaces uniformes, sans variations de valeurs (Figure III.41(a-c)). Un profil en hauteur tracé selon une section de la surface S184 présente une variation en hauteur inférieure à 5 nm avec un maximum atteint d'environ 3 nm et un minimum d'environ -2 nm (Figure III.41(d)). Les valeurs d'adhésivité et de pente extraites pour chaque courbe de force présentent également très peu de variations, la répartition (en %) de ces valeurs est présentée sur des histogrammes en Figure III.41(e, f). Les valeurs d'adhésion sont regroupées entre environ 4 et 6 nN, et plus de 90% des valeurs de pentes se situent aux environs de 40 nN/µm, ce qui correspond aux cartographies d'aspect lisses. Des cartographies ont également été réalisées sur les échantillons référence silicone MED et CMC / silicone et celles-ci sont équivalentes,

ne présentant pas ou très peu de variation dans les valeurs mesurées. De même, les profils en hauteur et les histogrammes de répartition des valeurs d'adhésion et de pente sont équivalents à ceux de la référence S184.
Les mêmes mesures ont été réalisées sur les matériaux avec dépôts de nanomatériaux carbonés sur silicone.

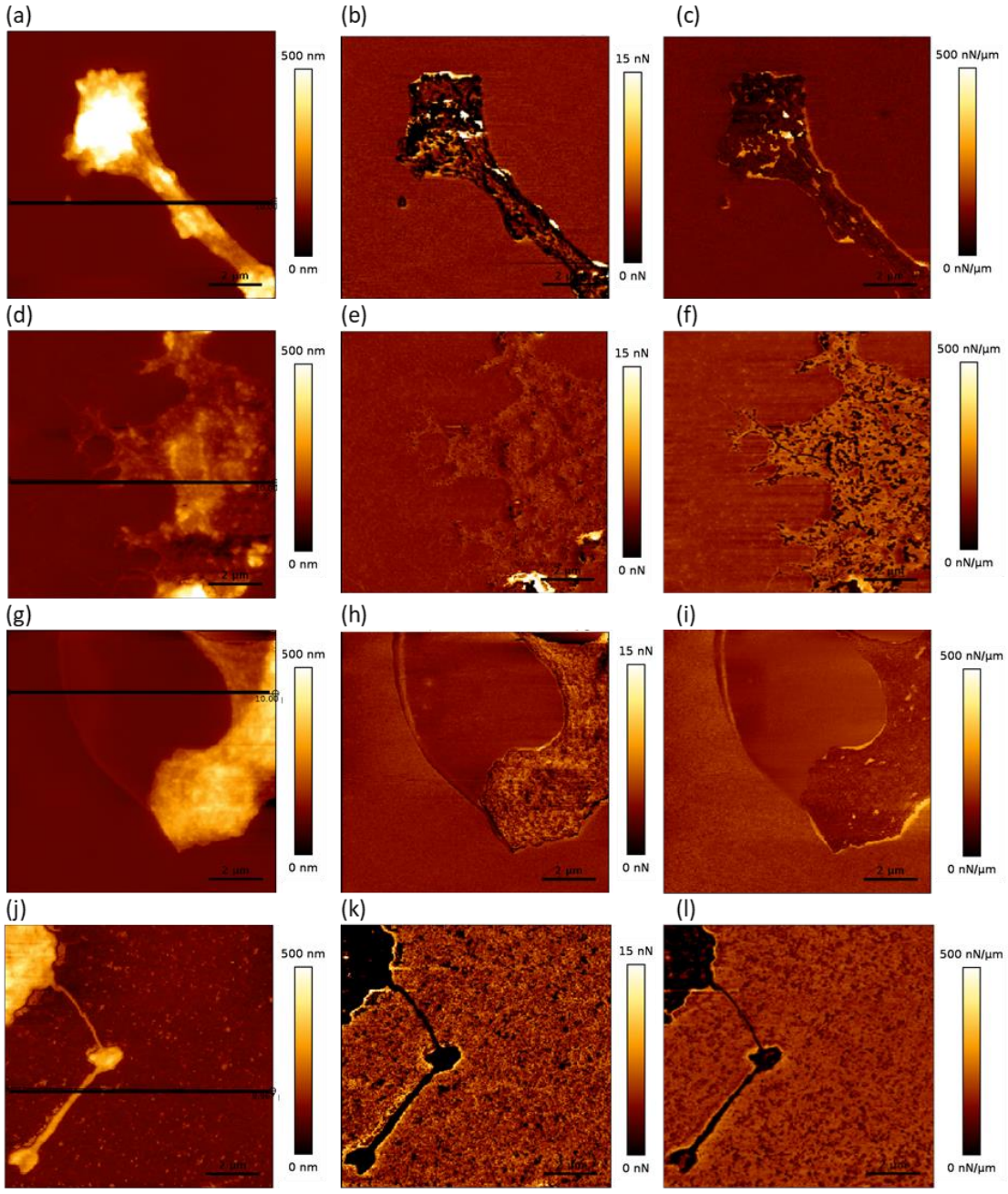


Figure III.42 : Cartographies AFM multiparamétriques (topographie, adhésivité et rigidité) des échantillons (a-c) DWNTs B / S184 ; (d-f) DWNTs B / MED ; (g-i) DWNTs Ox / S184 ; (j-l) DWNTs Ox / MED. (a, d, g, j) cartographie en hauteur ; (b, e, h, k) cartographie en adhésivité ; (c, f, i, l) cartographie en pente.

Les cartographies obtenues pour les échantillons silicone avec dépôts DWNTs B et DWNTs Ox révèlent des amas de nanoparticules en surface des deux silicones, les amas de NMCs présentent ainsi des valeurs de hauteur, d'adhésivité et de pente différentes de celles du silicone (Figure III.42). Sur la

cartographie de hauteur réalisée en surface des échantillons, toutes les nanoparticules de carbone sont représentées en teinte plus « claire » que celle du silicone, signifiant que ces nanoparticules sont surélevées par rapport au silicone. Cela est confirmé par les profils en hauteur réalisés sur des sections des surfaces analysées (Figure III.43). Lorsque la section passe sur du silicone, les profils de hauteur montrent très peu de variation (de l'ordre du nm), comme pour les échantillons références et CMC / silicone. La hauteur mesurée augmente lorsque les sections passent sur des amas de nanoparticules, ces nanoparticules sont donc surélevées par rapport à la surface silicone. Cela est bien visible sur le profil de l'échantillon DWNTs B / S184 lors du passage de la section sur les faisceaux de nanotubes (Figure III.43(a)). Les cartographies réalisées en surface de l'échantillon DWNTs Ox / S184 (Figure III.42.(g-i)) permettent d'observer une forme hémisphérique (en creux) en surface du silicone dans laquelle se trouve un amas de nanotubes de carbone oxydés. Cette forme peut être due à l'impact d'une goutte de la suspension aqueuse de nanoparticules de carbone qui est pulvérisée en surface du silicone. Après évaporation de l'eau, seul reste l'amas de nanoparticules se situant dans la trace de l'impact de la goutte qui reste visible. Le profil en hauteur révèle une très légère augmentation de hauteur sur le contour circulaire observé. Les valeurs d'adhésion et de pente mesurées à l'intérieur de la forme hémisphérique sont légèrement plus faibles que celles du silicone mesurées à l'extérieur. Cela suggère que l'impact de la gouttelette sur le silicone n'a pas causé de modification significative des propriétés de surface.

A la différence des surfaces uniformes des échantillons références et CMC / silicone, des variations de valeur d'adhésivité et de pente sont mesurées en surface des amas de nanoparticules de carbone des échantillons DWNTs B / silicone et DWNTs Ox / S184, et ces valeurs peuvent être supérieures, équivalentes, et inférieures à celles du silicone. Cela est visible sur les histogrammes de répartition des valeurs qui présentent des configurations différentes (Figure III.43(b, c, e, f, h, i)).
Certaines valeurs de pente mesurées sur les échantillons peuvent être négatives, il s'agit d'une erreur due à l'automatisation des calculs de pente. La pente mesurée sur la courbe renseigne sur la force nécessaire pour déformer le matériau étudié, Le silicone se déforme assez facilement et la pente mesurée est relativement faible. Au contraire les nanoparticules sont beaucoup plus rigides, la pente est donc beaucoup plus forte. Or le fit permettant de calculer la pente lors des mesures silicone est inadapté pour les mesures sur les nanoparticules qui sont plus rigides ; la plage de données sélectionnée automatiuement est erronée, cela peut expliquer l'obtention d'une pente négative (Figure A.2, en annexe). Il est difficile de corriger ce problème car il est nécessaire d'automatiser le calcul des pentes pour les 65 536 courbes de force enregistrées pour chaque mesure AFM à la surface des échantillons, il n'est pas envisageable de corriger manuellement les erreurs. Les pentes négatives obtenues correspondent donc aux mesures réalisées sur les nanoparticules, beaucoup plus rigides que le silicone.

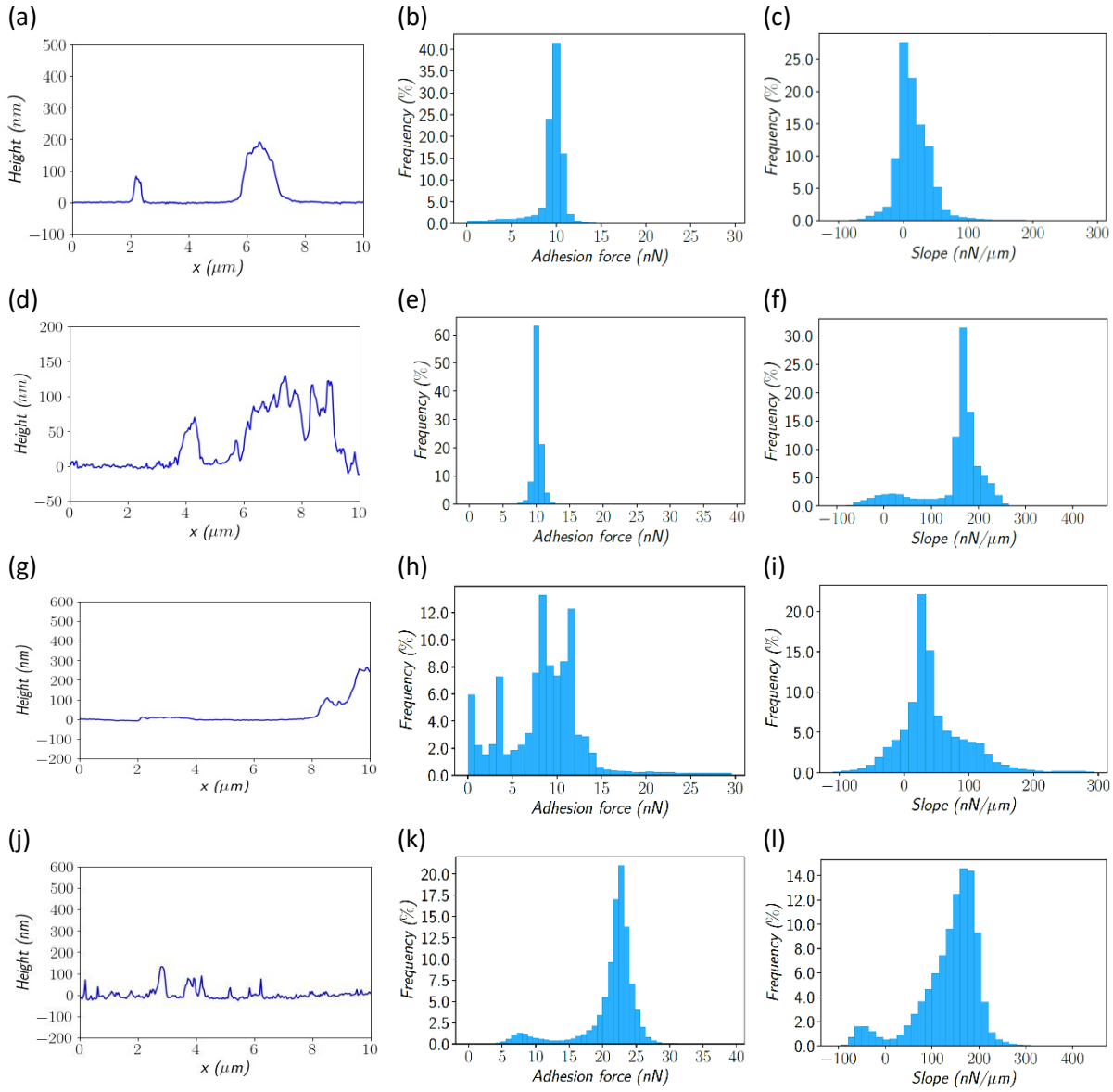


Figure III.43 : (a, d, g, j) Profils en hauteur ; (b, e, h, k) histogramme de répartition des valeurs d'adhésion ; (c, f, i, l) histogramme de répartition des valeurs de pentes des échantilllons (a-c) DWNTs B / S184 ; (d-f) DWNTs B / MED ; (g-i) DWNTs Ox / S184 et (j-l) DWNTs Ox / MED.

Les histogrammes de répartition des valeurs d'adhésion et de pente présentent un pic de valeur majoritaire qui semble correspondre aux valeurs mesurées pour le silicone qui est majoritairement présent en surface des zones étudiées (Figure III.43(b, c, f, i, k, l)). Les valeurs de part et d'autre du pic principal correspondent aux variations de mesures observées en surface des amas de nanoparticules. Cependant nous n'observons pas de pic majoritaire sur l'histogramme d'adhésion de l'échantillon DWNTs Ox / S184 en raison de la légère variation entre les valeurs mesurées à l'intérieur et à l'extérieur de la goutte, les valeurs correspondant aux mesures du silicone sont légèrement distribuées (Figure III.43(h)).

A la différence des autres échantillons, le profil en hauteur d'une section de l'échantillon DWNTs Ox / MED présente de nombreuses variations en hauteur (Figure III.43(j)). La plus importante augmentation de hauteur à environ 120 nm correspond au passage de la section sur un faisceau de nanotubes oxydés bien visible sur la cartographie. Les autres variations de hauteur correspondent à

de nombreux petits amas qui sont répartis dans l'ensemble du silicone de la surface étudiée. Ces petits amas sont visibles sur la cartographie correspondante par de nombreux points de couleur plus claire que la surface silicone (Figure III.42(j)). Ainsi, La présence de nanoparticules apporte du relief en surface, ces amas sont surélevés par rapport à la surface silicone.

Les cartographies d'adhésion et de pente sont également différentes de celles des échantillons précédents, elles représentent les amas de nanoparticules avec des valeurs uniformes sur toute leur surface, et qui sont très différentes de celles du silicone (Figure III.42(k, l)). Ainsi, les deux histogrammes d'adhésivité et de pente présentent des valeurs réparties en deux ensembles (Figure III.43(k, l)). Comme auparavant, en associant les histogrammes aux cartographies nous pouvons déterminer que les valeurs d'adhésivité et de pente les plus importantes correspondent à celles du silicone.

Ainsi les valeurs d'adhésion du silicone sont d'environ 10 nN pour les échantillons DWNTs B / MED et DWNTS B et DWNTs Ox / S184 tandis que celle de l'échantillon DWNTs Ox / MED se situent aux alentours de 22 nN. Les pentes correspondant aux mesures silicone des échantillons DWNTs B et DWNTs Ox / S184 sont équivalentes aux alentours de 10 nN/µm, et celles des échantillons DWNTs B et DWNTs Ox / MED sont d'environ 150 nN/µm. Nous remarquons que ces valeurs sont différentes de celles mesurées sur les échantillons références (Figure III.41(e, f)). Les silicones références présentent des valeurs équivalentes en pente et adhésion autour de 5 nN et 20 nN/µm. Il semblerait que les dépôts de NMCs aient un impact sur les propriétés d'adhésion et de rigidité du support silicone et que cet impact varie selon les échantillons.

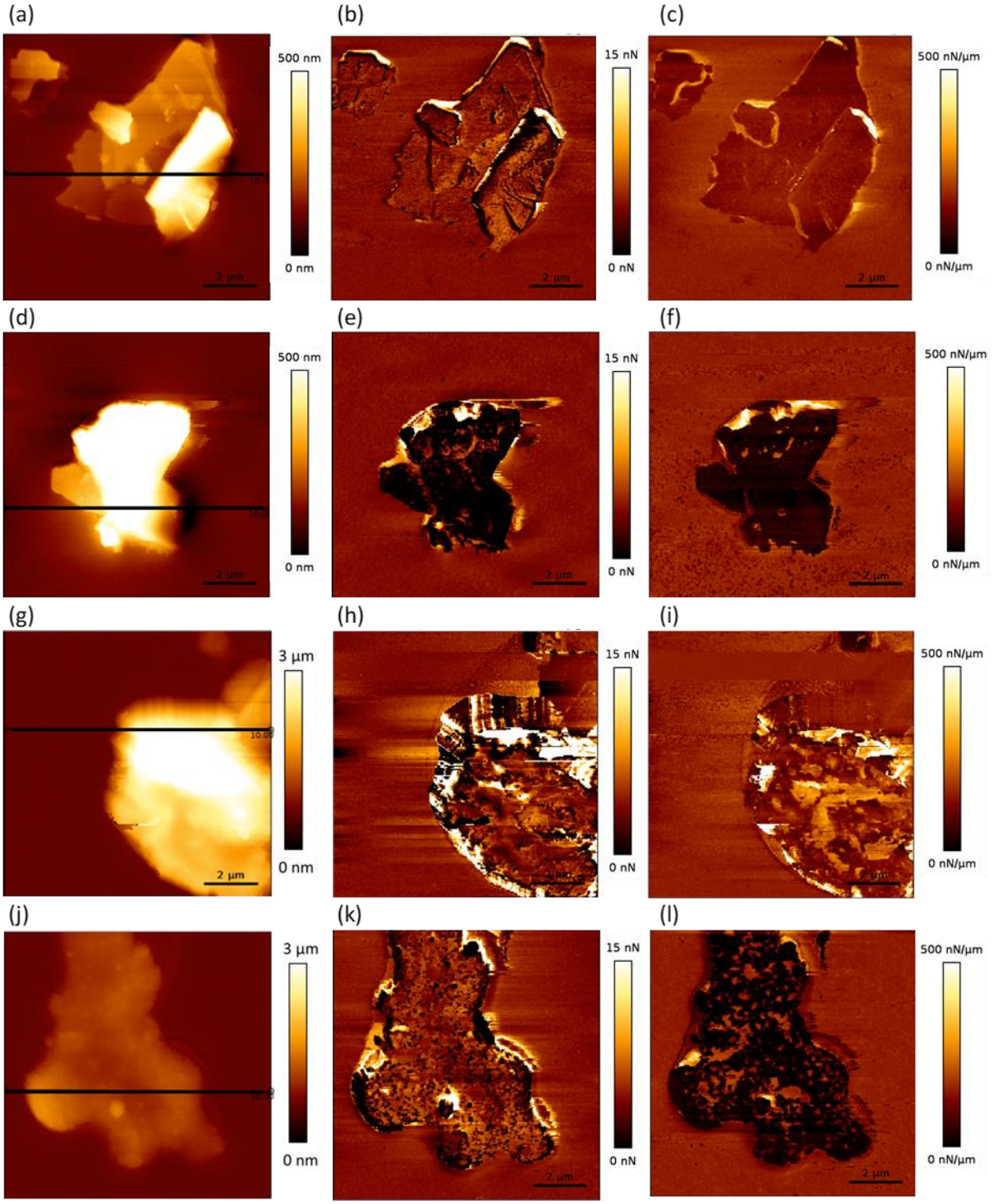


Figure III.44 : Cartographies AFM multiparamétriques (topographie, adhésivité et rigidité) des échantillons (a-c) FLG / S184 ; (d-f) FLG / MED ; (g-i) GO / S184 ; (j-l) GO / MED. (a, d, g, j) cartographie en hauteur ; (b, e, h, k) cartographie en adhésivité ; (c, f, i, l) cartographie en pente.

Comme dans le cas des échantillons nanotubes de carbone sur silicone (Figure III.42), les cartographies obtenues pour les échantillons silicone avec dépôts FLG et GO révèlent des amas de nanoparticules en surface des deux silicones (Figure III.44). Ainsi les amas de NMCs présentent des valeurs de hauteur, d'adhésivité et de pente différentes de celles du silicone. Comme dans le cas des

autres échantillons, les amas de nanoparticules de carbone sont représentés en couleur plus claire que le silicone sur les cartographies en hauteur, ce qui signifie d'après l'échelle d'intensité, que ces nanoparticules sont surélevées par rapport à la surface silicone.

Les profils de hauteur réalisés sur les échantillons FLG / silicone indiquent une hauteur d'environ 0 nm en début de section sur la surface silicone (Figure III.45). Les hauteurs augmentent lorsque les sections traversent un amas de nanoparticules de carbone, puis cela diminue en quittant l'amas pour atteindre des valeurs négatives avant de se stabiliser à nouveau à 0 nm en fin de section correspondant à une surface silicone. La diminution de la hauteur à l'interface entre l'amas de nanoparticules et le silicone indiquent que les nanoparticules ne sont pas juste présentes en surface mais qu'elles plongent dans le silicone. De la même façon que pour les échantillons nanotubes de carbone sur silicone (Figure III.43), des situations différentes sont observées d'une surface analysée à l'autre dans le cas des mesures d'adhésivité et de pente réalisées sur les échantillons FLG et GO sur silicone (Figure III.44). Comme dans le cas de l'échantillon DWNTs Ox / MED, les nanoparticules FLG sont représentées de couleurs plus foncées que le silicone MED sur les cartographies d'adhésion et de pente (Figure III.44 (e, f)). La même situation est également rencontrée lors des mesures de pentes de l'échantillon GO / MED (Figure III.44 (l)). Ces différences de valeur bien définies entre les nanoparticules et le silicone se retrouvent sur les histogrammes correspondants où les valeurs sont réparties en deux groupes marqués (Figure III.45 (e, f, l)). Les autres cartographies réalisées sur les échantillons FLG / S184 et GO / silicone correspondent à celles déjà réalisées sur les échantillons DWNTs B / silicone et DWNTs Ox / S184, c'est-à-dire que les surfaces silicones sont lissent et uniformes tandis que des variations de valeurs mesurées sont observées sur les amas de NMCS. Les histogrammes correspondants représentent des pics de valeur majoritaires qui peuvent être attribués au silicone qui est présent sur la plus grande partie des surfaces étudiées, et un étalement de valeurs de part et d'autre du pic majoritaire qui correspond aux différentes valeurs mesurées sur les amas de NMCs.

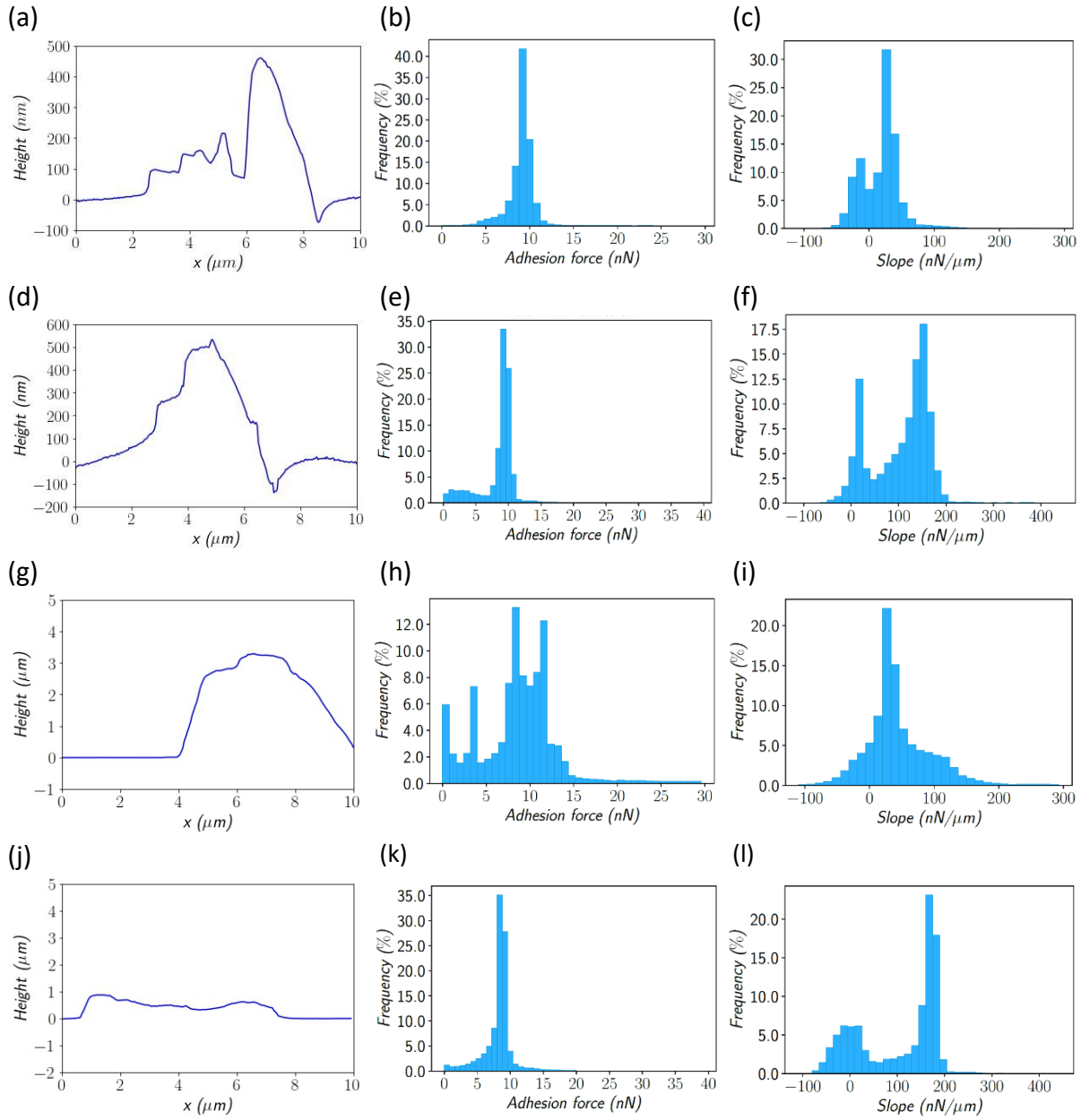


Figure III.45 : (a, d, g, j) Profils en hauteur ; (b, e, h, k) histogramme de répartition des valeurs d'adhésion ; (c, f, i, l) histogramme de répartition des valeurs de pentes des échantillons (a-c) FLG / S184 ; (d-f) FLG / MED ; (g-i) GO / S184 et (j-l) GO / MED.

Les différentes valeurs d'adhésion pouvant être attribuées au silicone se situent aux alentours de 10 nN pour tous les échantillons (Figure III.45). Les valeurs de pentes sont équivalentes entre les échantillons FLG et GO / S184 et se situent aux alentours de 30 nN / µm, et les valeurs de pentes des échantillons FLG et GO / MED sont également équivalentes aux alentours de 170 nN/µm (Figure III.45). Comme pour les échantillons précédents nous constatons que les dépôts de NMCs semblent modifier les propriétés d'adhésion et de rigidité du support silicone, et que ces modifications varient selon les échantillons.

Sur les différentes surfaces analysées, le silicone présente toujours des valeurs de hauteur, d'adhésivité et de pente uniformes. Au contraire, toutes les mesures effectuées sur la surface d'un amas de nanoparticules de carbone présentent des variations. Les différentes valeurs de hauteur,

d'adhésivité et de pente mesurées varient sur la surface d'un amas, et ces valeurs sont également différentes entre les échantillons. De plus, les valeurs de pente et d'adhésion pouvant être attribuées au silicone varient selon les échantillons, suggérant que les dépôts de NMCs influent sur les propriétés d'adhésion et de rigidité du silicone.

La quasi-totalité des mesures effectuées révèlent que les NMCS sont surélevés par rapport à la surface silicone. Quelques mesures effectuées à l'interface des nanoparticules et du silicone révèlent des valeurs négatives, ce qui suggèrent que les nanoparticules de carbone ne sont pas juste en surface mais qu'elles sont également enfouies sous le silicone.

Les valeurs d'adhésivité et de pente mesurées peuvent beaucoup varier sur un même amas. Cela peut être mis en relation avec les mesures de hauteur qui suggèrent que toutes les différences observées sont dues à la variation d'enfoncement des nanoparticules dans le polymère. Les zones d'amas de nanoparticules représentées sur les cartographies avec les mêmes teintes que le silicone indiquent sûrement que ces amas sont recouverts d'une fine couche de silicone. Dans certains cas, les valeurs d'adhésivité et de pente mesurées peuvent être complètement différentes de celles du silicone, cela suggère que ces nanoparticules ne sont pas recouvertes de polymère.

Beaucoup de situations différentes ont donc été observées pour les dépôts sur les deux silicones, mais toutes les configurations indiquent que les NMCs sont ancrés dans le silicone. Certains amas qui ont des valeurs de pente et d'adhésion très inférieures au silicone paraissent émerger de celui-ci, tandis que d'autres amas présentant des valeurs très contrastées peuvent émerger en quelques points et être recouverts de silicone en d'autres.

III.10. Spectroscopie Raman

Les échantillons sont caractérisés avec un microscope confocal RAMAN Labram HR 800 Yvon Jobin utilisant un laser 633 nm. Des spectres et des cartographies sont réalisés selon différentes hauteurs z des échantillons nanoparticules de carbone sur silicone analysés. Les analyses sont réalisées avec un objectif x 100, un filtre 10%, 30 s d'acquisition et 3 accumulations sur une plage spectrale comprise entre 500 et 3400 cm^{-1}.

D'après les tests antibactériens réalisés (chapitre V), les matériaux silicone avec dépôts de GO et de DWNTs Ox en surface sont ceux qui présentent la plus forte activité antibactérienne sur les bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement. Nous avons donc priorisé l'analyse des dépôts de GO et dépôt de DWNTs Ox sur silicone S184 et MED en spectroscopie Raman.

L'objectif, complémentaire des analyses par AFM, est d'abord de déterminer si des nanoparticules de GO ou de DWNTs Ox sont ancrées dans le silicone, puis de déterminer si ces nanoparticules émergent de la surface ou si elles sont enfoncées dans le polymère

III.10.1 Analyse de matériaux dépôt de GO sur silicone :

Pour obtenir des informations sur l'ancrage des nanoparticules dans le silicone et sur leur capacité à émerger de la surface, plusieurs spectres sont réalisés sur un amas de nanoparticules selon différentes hauteurs z. Pour les dépôts de GO / silicone, des spectres ont été réalisés sur un amas de GO selon une amplitude allant de +3 à -10 µm par rapport au plan 0 (Figure III.46).

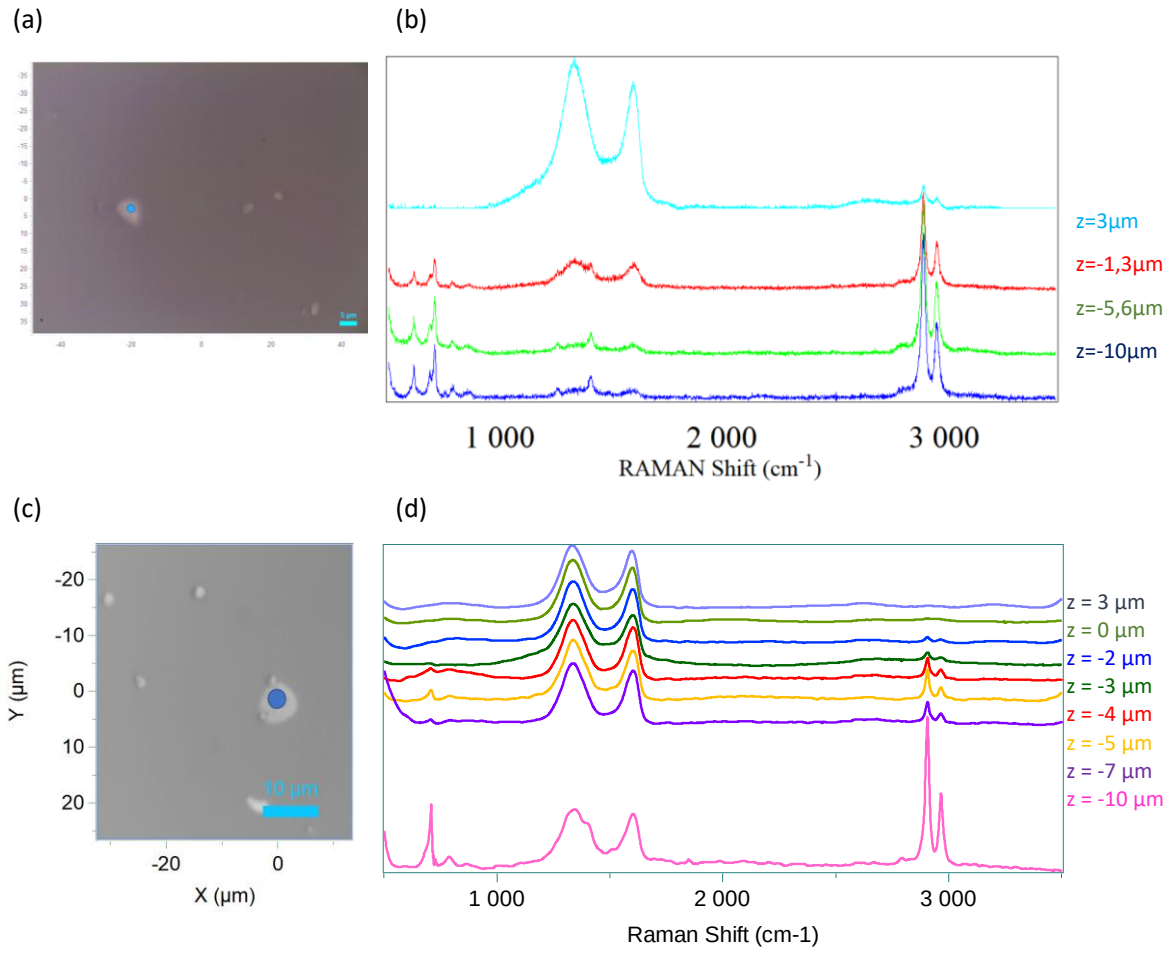


Figure III.46 : (a, c) image optique 2D avec emplacement spot localisé et (b, d) analyse confocale Raman correspondante, (a, b) GO / S184 et (b, d) GO / MED.

4 spectres ont été réalisés sur un amas de GO sur silicone S184 à z = 3 µm ; z = -1,3 µm ; z = -5,6 µm et z = -10 µm (Figure III.46(a, b))) et 8 spectres ont été réalisés sur un amas de GO sur silicone MED à z = 3 µm ; z = 0 µm ; z = -2 µm ; z = -3 µm ; z = -4 µm ; z = -5 µm ; z = -7 µm et z = -10 µm (Figure III.46(b, d)). Les bandes à z = 1337 cm^{-1} et z = 1599 cm^{-1} sont présentes sur tous les spectres (Figure III.46(b, d)). Selon la littérature, la bande à 1599 cm^{-1} est appelée bande G et correspond au carbone sp^2 du GO. La bande à 1337 cm^{-1} est appelée bande D est correspond aux défauts du réseau graphitique du GO, notamment du fait de l'oxygène présent et lié au carbone [314–316]. Nous remarquons que ces bandes sont de moins en moins intenses au fur et à mesure que z diminue. Les bandes à z = 2904,1 cm^{-1} et 2967,8 cm^{-1} correspondent aux liaisons C-H du silicone [317] et sont observées sur les 4 spectres réalisés sur l'échantillon GO / S184 et sur tous les spectres réalisés sur l'échantillon GO / MED excepté les deux spectres à z = 3 µm et z = 0 µm. Nous remarquons des bandes à 616,9 ; 709,8 et 786,3 cm^{-1}

correspondant respectivement aux liaisons Si-O-Si, Si-CH_3, et Si-C du silicone sur les spectres réalisés à z = -1,3 µm ; z = - 5,6 µm et z = -10 µm sur l'échantillon GO / S184 et sur les spectres réalisés à z = -4 µm ; z = -5 µm ; z = -7 µm et z = -10 µm de l'échantillon GO / MED [318].

Ainsi des signaux caractéristiques du silicone et du GO sont identifiés sur tous les spectres des échantillons GO / silicone réalisés à z ≤ 0 µm. Pour les deux échantillons analysés, les profils en profondeur montrent clairement que les agglomérats de GO sont présents en surface et sont également incrustés dans le silicone. Cela est mis en évidence sur la Figure III.46(b, d) où le rapport entre les signatures GO et silicone s'inverse progressivement lorsque la profondeur augmente. Il semble donc que des dépôts de GO soient présents en surface du silicone et qu'ils s'enfoncent dans celui-ci, les nanoparticules semblent ancrées dans le polymère. Seuls les signaux caractéristiques du GO sont observés sur les spectres réalisés sur l'amas de GO sur MED à z = 0 µm et z = 3 µm, le silicone n'est pas détecté. Cela signifie que les nanoparticules de GO émergent de la surface, elles ne sont pas recouvertes de silicone. Ce n'est pas le cas pour l'échantillon GO / S184 où des bandes caractéristiques du GO et du silicone sont présentes sur les spectres réalisés à z = 0 et z = 3 µm. Cependant, il faut prendre en compte la taille du spot laser, qui est d'environ 1 µm, lors de l'analyse des spectres Raman. Nous avons choisi de nous placer sur un gros amas de nanoparticules de carbone pour s'assurer que le laser analyse ces nanoparticules, mais il est possible que le spot déborde sur le côté, ce qui expliquerait la présence de signaux correspondant au silicone sur le spectre. Il est également possible que les nanoparticules de carbone émergent du silicone et que le laser analyse ces nanoparticules mais qu'il détecte également le silicone légèrement en dessous. Le contraire est aussi possible avec des nanoparticules qui seraient détectées sous une fine couche de silicone. Ainsi il est délicat de conclure avec certitude si les nanoparticules émergent du silicone au pas, mais surtout si elles sont recouvertes ou pas par du silicone.

Afin d'étudier la distribution des dépôts et les différentes configurations possibles (différentes tailles d'amas, différentes formes, *etc*.), des cartographies de micro-spectroscopie Raman 3D (confocale) résolues spatialement ont été réalisées sur les échantillons GO / S184, (Figure III.47 (a-b)) et GO / MED (Figure III.47(e-f)). Les surfaces analysées ont été choisies avec des amas de nanoparticules de plusieurs tailles afin d'étudier différentes configurations, et l'amplitude z est choisie de façon à obtenir des informations essentielles sur l'enfoncement des nanoparticules dans le silicone. Les paramètres d'acquisition sont optimisés de façon à obtenir un compromis entre précision et durée d'analyse. Il faut un nombre de points d'analyse suffisant pour étudier les différents amas de nanoparticules de carbone en surface du silicone, et nous voulons étudier plusieurs plans de hauteur z différente. La première analyse a été réalisée sur l'échantillon GO / S184. Une zone de 17 x 5 points a été étudiée selon 4 plans de hauteur z = 3 ; -1,3 ; -5,6 et -10 cm^{-1} avec une durée de 30 s d'acquisition spectrale, 2 fenêtres et un laser 633 nm. Les paramètres déterminés pour cette première analyse ont permis d'obtenir une cartographie 3D informant sur la distribution des dépôts dans le silicone. Ces paramètres ont été modifiés lors de l'analyse suivante de l'échantillon GO / MED, la résolution a été augmentée, cependant la durée d'analyse a nettement augmenté également. La cartographie a été réalisée sur une zone de 19 x 16 points selon 8 plans, avec 30 s d'acquisition spectrale et 2 fenêtres.

La première analyse réalisée sur l'échantillon GO / S184 a durée 5 heures 36 minutes, l'analyse suivante a pu être optimisée avec de nouveaux paramètres et a duré 40 heures et 30 minutes.
Pour chaque spectre réalisé (analyses ponctuelles ou cartes), les signaux Raman caractéristiques du GO (bande G (sp2) du GO à 1530 cm^{-1}) et du silicone (massif de bandes CH de 2800 cm^{-1} à 3100 cm^{-1}) ont été intégrés et identifiés en rouge et vert respectivement afin de construire les cartes 3D de distribution des amas de GO sur silicone S184 et MED.

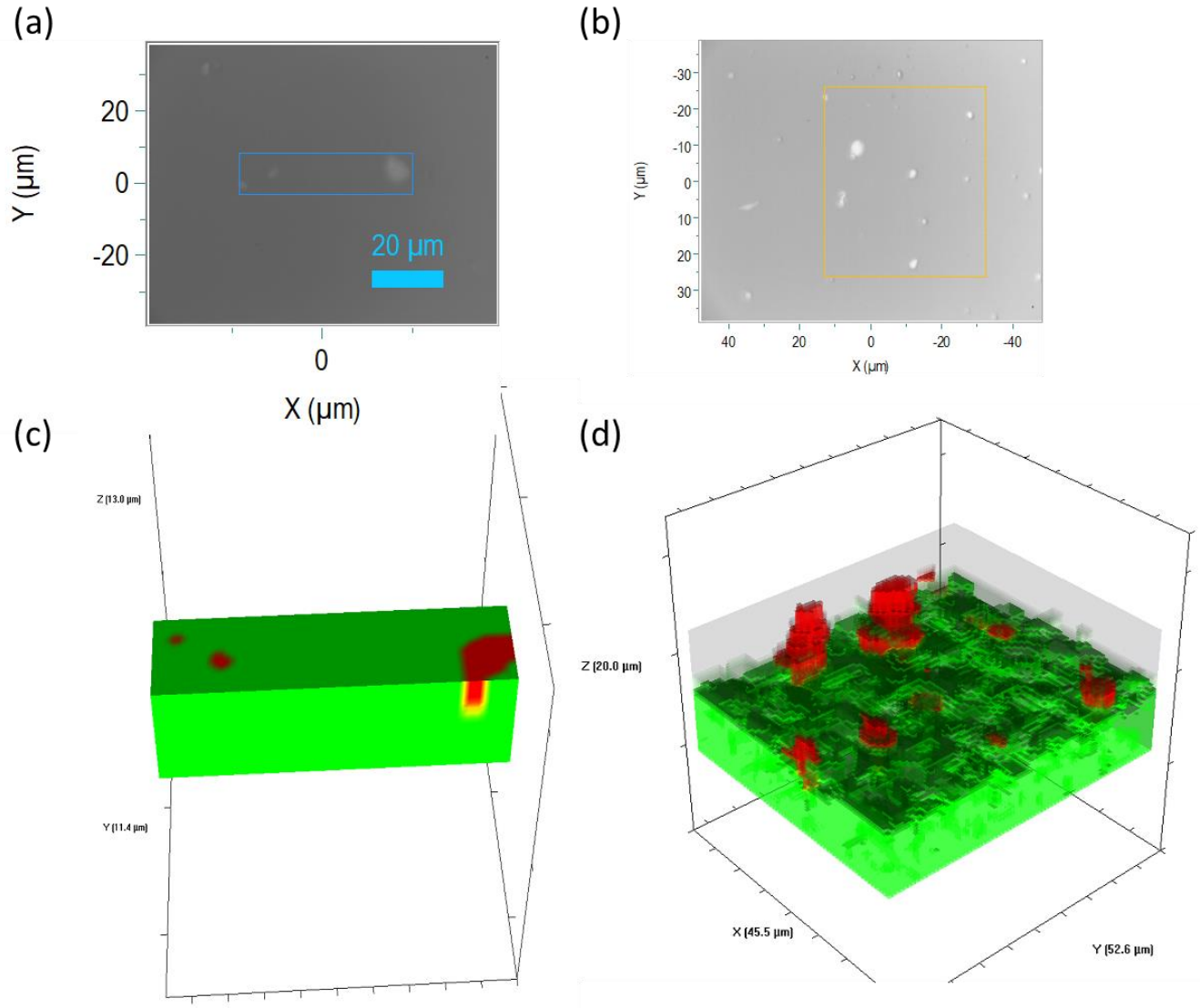


Figure III.47 : (a, c) GO / S184 et (b, d) GO / MED ; image optique 2D et emplacement cartographie Raman (a, b), et cartographie Raman 3D correspondante (c, d).

Les cartographies 3D représentent les amas de nanoparticules répartis de manière aléatoire en surface ainsi qu'à l'intérieur du polymère. Ces amas sont plus ou moins immergés dans le silicone et les deux cartographies représentent des amas émergeant de la surface silicone. Les paramètres ont été optimisés pour la réalisation de la deuxième cartographie GO / MED de façon à augmenter la résolution. Nous remarquons sur cette cartographie (Figure III.47(d)) que la surface silicone n'est pas tout à fait lisse. De très légères variations de hauteur peuvent être observées, l'ordre de grandeur de ces variations est de quelques nanomètres et correspond à celui observé lors des mesures AFM. La surface silicone présente donc très peu de variations en surface tandis que les amas apparaissent surélevés.

Des analyses similaires ont été réalisées sur des échantillons DWNTs Ox / S184 et DWNTs Ox / MED (Figure III.48).

III.10.2 Analyse de matériaux dépôt de DWNTs Ox sur silicone :

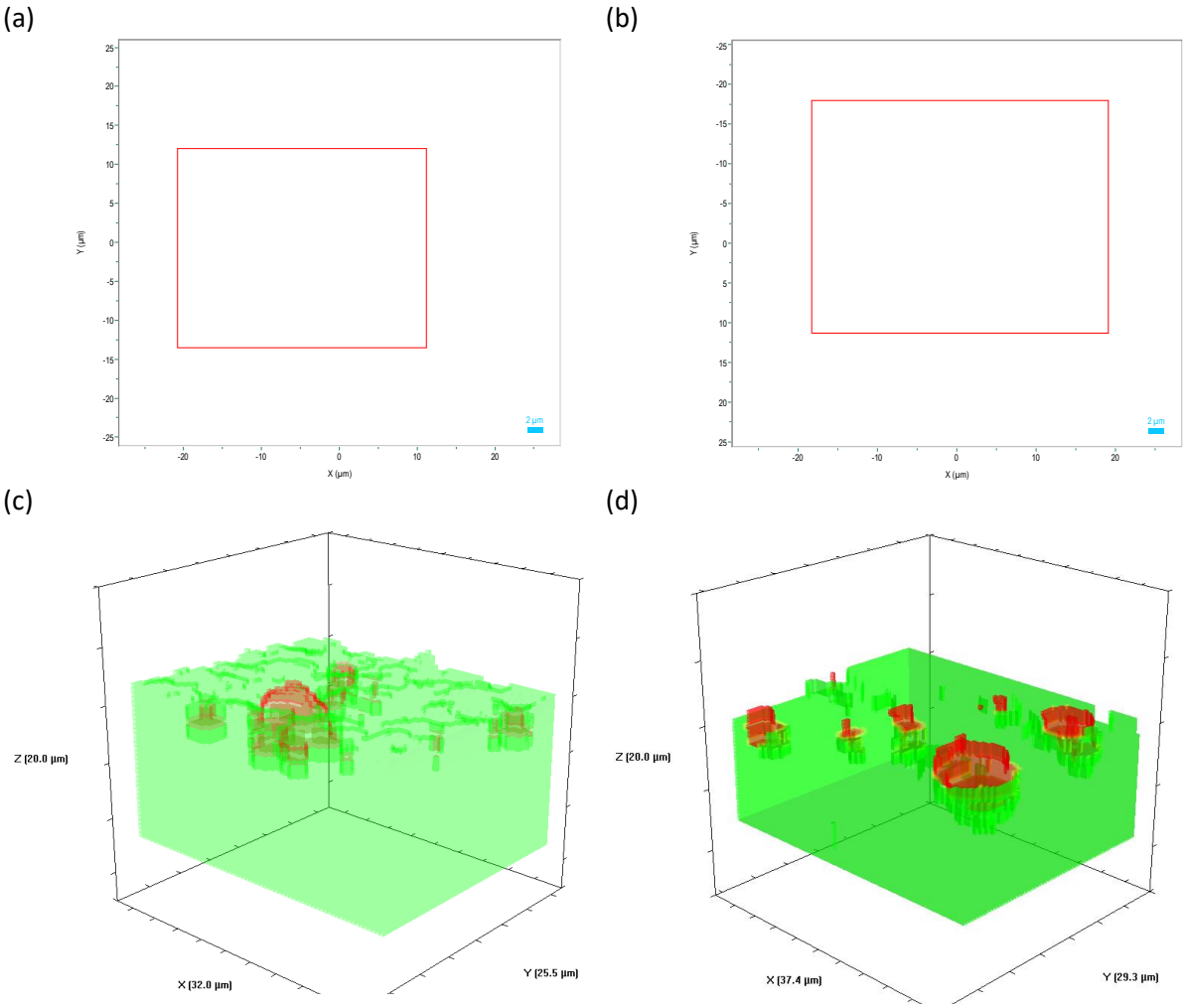


Figure III.48 : (a, c) DWNTs Ox / S184 et (b, d) DWNTs Ox / MED ; image optique 2D et emplacement cartographie Raman (a, b), et cartographie Raman 3D correspondante (c, d),

Des cartographies de micro-spectroscopie Raman 3D sont réalisées sur des échantillons DWNTs Ox / S184 et DWNTs Ox / MED (Figure III.48(c, d)). Des surfaces contenant plusieurs types d'amas, avec des tailles et de formes différentes, sont analysées afin d'étudier différentes configurations (Figure III.48(a, b)). Les analyses ont été réalisées sur plusieurs plans z, l'amplitude z a été choisie de façon à obtenir des informations essentielles sur l'enfoncement des amas de nanoparticules dans le silicone. Un laser plus énergétique à 532 nm a été utilisé pour réaliser les cartographies et la durée d'acquisition a été diminuée. Les analyses ont donc été réalisées avec un laser à 532 nm sur une zone de 16 x 19 points selon 11 plans, avec 5 s d'acquisition spectrale et 2 fenêtres (durée d'anlyse : 9 heures 48 minutes).

Pour chaque spectre réalisé, les signaux Raman caractéristiques des DWNTs Ox et du silicone (bande 2D des DWNTs Ox à 2650 cm^{-1} et bande νCH du silicone de 2960 cm^{-1}) ont été intégrés et identifiés en rouge et vert respectivement afin de construire les cartes 3D de distribution des amas de

DWNTs Ox sur silicone S184 et MED. Cette fois ci nous avons choisi de prendre des bandes de même sensibilité pour représenter les deux espèces et ne pas en exprimer une plutôt qu'une autre.

De la même façon que pour les échantillons GO / silicone (Figure III.47(c, d)), les cartographies 3D présentent la répartition des amas de DWNTs Ox en surface du silicone et leur enfoncement dans le polymère (Figure III.48(c, d)). Comme pour les échantillons GO / silicone, nous remarquons que la surface silicone n'est pas exactement plane, cela correspond aux mesures AFM qui présentent des variations de hauteurs de l'ordre du nanomètre. Les amas de nanoparticules observés sont de différentes tailles et tous s'enfoncent dans le polymère. Certains amas présents sur l'échantillon DWNTs Ox / S184 s'enfoncent dans le polymère selon une profondeur variable, et se situent en dessous de la surface du silicone. Certains amas semblent tout de même émerger de la surface silicone. Là encore les tailles des amas sont variables et la hauteur atteinte en dehors du silicone varie d'un amas à l'autre. Tous les amas présents sur l'échantillon DWNTs Ox / MED semblent être bloqués dans le silicone tout en émergeant de la surface. La taille, la répartition, l'enfoncement et la hauteur atteinte par les dépôts en surface du silicone varient. Les surfaces des échantillons GO et DWNTs Ox sur silicone présentent des reliefs dus aux dépôts de nanoparticules, les surfaces silicone sont relativement planes et, en regroupant avec les mesures AFM effectuées, nous déterminons que les variations en hauteur sont de l'ordre du nanomètre.

Les différentes méthodes de caractérisations utilisées nous ont permis d'obtenir des informations qui correspondent entre elles. Les observations MED et les cartographies Raman et AFM ont révélé la présence de dépôts de NMCs en surface des deux silicones utilisés. Les observations MEB ont montré des amas de NMCs avec les nanoparticules les constituant. Ces images représentent une surface silicone plane et relativement lisse, dans laquelle les NMCs sont à la fois enfoncés et émergés. Les cartographies de hauteur réalisées en AFM présentent également une surface plane et relativement lisse, avec des variations de hauteur de l'ordre du nanomètre seulement. Ces cartographies révèlent que les dépôts sont situés à une hauteur plus importante que la surface silicone et que quelques valeurs mesurées aux extrémités des dépôts, à l'interface NMCs / silicone, ont une hauteur inférieure à celle de la surface silicone, ce qui indique que les amas s'enfoncent dans le polymère. Les différentes mesures en adhésion et pente révèlent des configurations très différentes d'un amas à l'autre. Les valeurs de mesures peuvent être inférieures, supérieures ou égales à celles du silicone. La mise en relation des différentes mesures de hauteur, adhésion et pente suggère que toutes les différences observées sont dues à la variation d'enfoncement des nanoparticules dans le polymère. Les zones d'amas de nanoparticules présentant les mêmes valeurs en adhésion et pente que le silicone indiquent que ces amas sont sûrement recouverts d'une fine couche de silicone. D'autres cas où les valeurs d'adhésivité et de pente mesurées sont complètement différentes de celles du silicone suggèrent que ces nanoparticules ne sont pas recouvertes. Les analyses Raman effectuées sur les échantillons GO et DWNTs Ox sur silicone sont en accord avec les caractérisations précédentes où de nombreuses configurations différentes sont observées. Les amas de différentes tailles semblent tous être bloqués en surface du silicone en étant plus ou moins enfoncés dans le polymère. Les dépôts de NMCs semblent amener du relief sur la surface silicone qui elle est plane avec des variations en hauteur qui sont de l'ordre du nanomètre d'après les mesures AFM. La plupart des amas observés émergent de la surface du silicone selon une hauteur variable, cependant certains amas apparaissent recouverts par une couche de silicone. Il est toutefois nécessaire de prendre en compte la taille du spot laser qui se situe autour de 1 µm. Il est possible que ce spot analyse à la fois un amas de nanoparticules et du silicone à proximité (à côté, en dessous ou au-dessus des dépôts de NMCs). Il est donc difficile de

conclure définitivement quant à la présence ou l'absence d'une fine couche de silicone en surface des NMCs.

Ainsi toutes les techniques de caractérisations indiquent que de nombreux cas de figures existent sur la surface des échantillons. Les dépôts peuvent être de tailles différentes et s'enfoncer plus ou moins dans le polymère, et il semble que certains dépôts affleurent tandis que d'autres sont recouverts d'une fine couche de silicone.

La technique d'élaboration utilisée semble être applicable à plusieurs supports pour obtenir des matériaux équivalents avec des nanoparticules de carbone bloquées dans le silicone et qui semblent affleurer à la surface. Cependant il est impossible de conclure avec certitude quant à la présence ou l'absence de cette couche de silicone en surface des dépôts, il sera donc nécessaire de poursuivre l'analyse de ces matériaux.

Chapitre IV
Elaboration des dépôts de nanomatériaux carbonés sur masque

Dans le contexte actuel de crise sanitaire mondiale due à la propagation du COVID 19, le graphène a suscité de l'intérêt avec par exemple le développement de masques respiratoires à base de graphène, commercialisés par plusieurs sociétés. Parmi eux, IDEATI[1] propose un masque en coton enduit de graphène et d'autres nanomatériaux de carbone, qui est réutilisable et affiche des propriétés antibactériennes, bien que les propriétés antivirales du graphène n'aient pas été clairement démontrées jusqu'à présent. Bioserenity[2] propose un masque réutilisable formé de 4 couches dont une contenant du graphène et censée afficher des propriétés antivirales. Dezeen[3] a développé un système où le graphène contenu dans le masque est capable de conduire l'électricité afin de produire des charges et de repousser les particules piégées. Ainsi, le graphène est devenu très intéressant pour la recherche médicale et l'industrie comme moyen de limiter la prolifération du COVID 19 au sein de la population. Les utilisations ont été principalement trouvées dans le domaine médical [52,60,62,180], mais aussi pour des applications environnementales avec les nouveaux filtres pour la purification de l'eau [49,181,182] ou dans l'industrie alimentaire avec les emballages alimentaires [58,91,183] par exemple.

Nous nous sommes intéressés aux propriétés antivirales de tels masques et nous avons pu étudier un échantillon commercial d'un masque respiratoire, contenant du graphène à visée antivirale, destiné à la protection du grand public [293]. Ces masques sont composés de 5 couches superposées, nous utilisons la couche centrale contenant les nanoparticules de graphène pour effectuer les tests antiviraux.

Nous décidons aussi de tester si le dépôt de NMCs par notre méthode de pulvarisation à l'aérographe permet de conférer à des masques commerciaux non traités, des propriétés antivirales. Ainsi nous préparons des échantillons à base de masques respiratoires classiques de type chirurgical (FFP1) en polypropylène (PP) contenant des nanoparticules de carbone déposées en surface. Pour cela nous utilisons la même méthode de dépôt à l'aérographe utilisée lors de l'élaboration des matériaux NMCs / silicone. Comme dans le cas du masque commercial, nous incorporons les nanoparticules de carbone à la couche centrale du masque - qui en contient 5.

Avant cela nous voulons nous assurer que les masques respiratoires classiques de type chirurgical en polypropylène PP utilisés pour effectuer les sprays sont équivalents au masque graphène commercial. Ainsi nous vérifions la composition des couches centrales de ces masques grâce à la méthode de spectroscopie infra-rouge en mode ATR (attenuated total reflexion) (Figure IV.1).

[1]planarTECH Graphene Facemask, https://planartech.co.uk/.
[2]BioSerenity, https://www.bioserenity.com/.
[3]Dezeen, https://www.dezeen.com/tag/graphene/.

IV.1. ATR

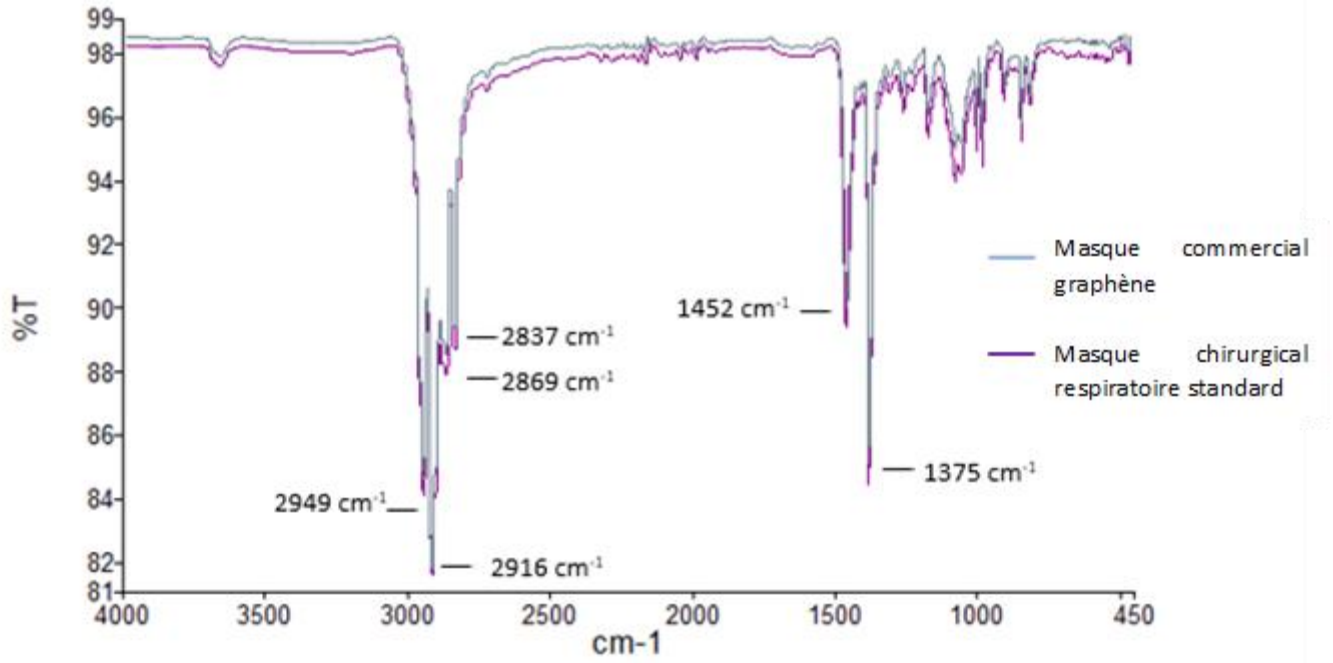


Figure IV.1 : Spectre ATR masques respiratoires classiques de type chirurgical en polypropylène PP.

Nous remarquons que les spectres IR du masque commercial au graphène et du masque chirurgical respiratoire standard se superposent (Figure IV.1). A l'aide de la bibliographie nous identifions les différents pics de vibrations observés [319–321]. Nous observons quatre pics situés aux alentours de 2950, 2917, 2866 et 2840 cm^{-1} qui sont attribués, respectivement, aux vibrations des groupements CH_3 et CH_2 en mode asymétrique, CH_3 et CH_2 en mode symétrique. Le pic à 1452 cm^{-1} attribué aux vibrations de déformation du groupement CH_3 en mode asymétrique, et le pic situé à 1375 cm^{-1} correspond aux vibrations en mode symétrique du groupement CH_3. Nous observons une série de pics entre 600 et 1200 cm^{-1} qui sont attribués aux vibrations des groupements méthyles CH_x avec x = 1, 2 et 3. Cette signature correspond à celle décrite pour le polypropylène, qui est donc le matériau composant les fibres de ces deux masques.
Ainsi les deux spectres se superposent et nous avons identifié des pics correspondant au signal du polypropylène. Ces masques sont donc équivalents et composés de polypropylène.

IV.2. Observations MEB : échantillons NMCs/masque

Nous utilisons donc les masques chirurgicaux respiratoires standards pour élaborer nos dépôts de NMCs sur masque. Nous observons ces masques chirurgicaux après avoir réalisé le dépôt de NMCs, afin de vérifier la présence des nanoparticules de carbone (Figure IV.2). Les observations sont réalisées sous vide partiel, sans métalliser les échantillons. Les charges présentes ont rendu ces observations difficiles à réaliser.

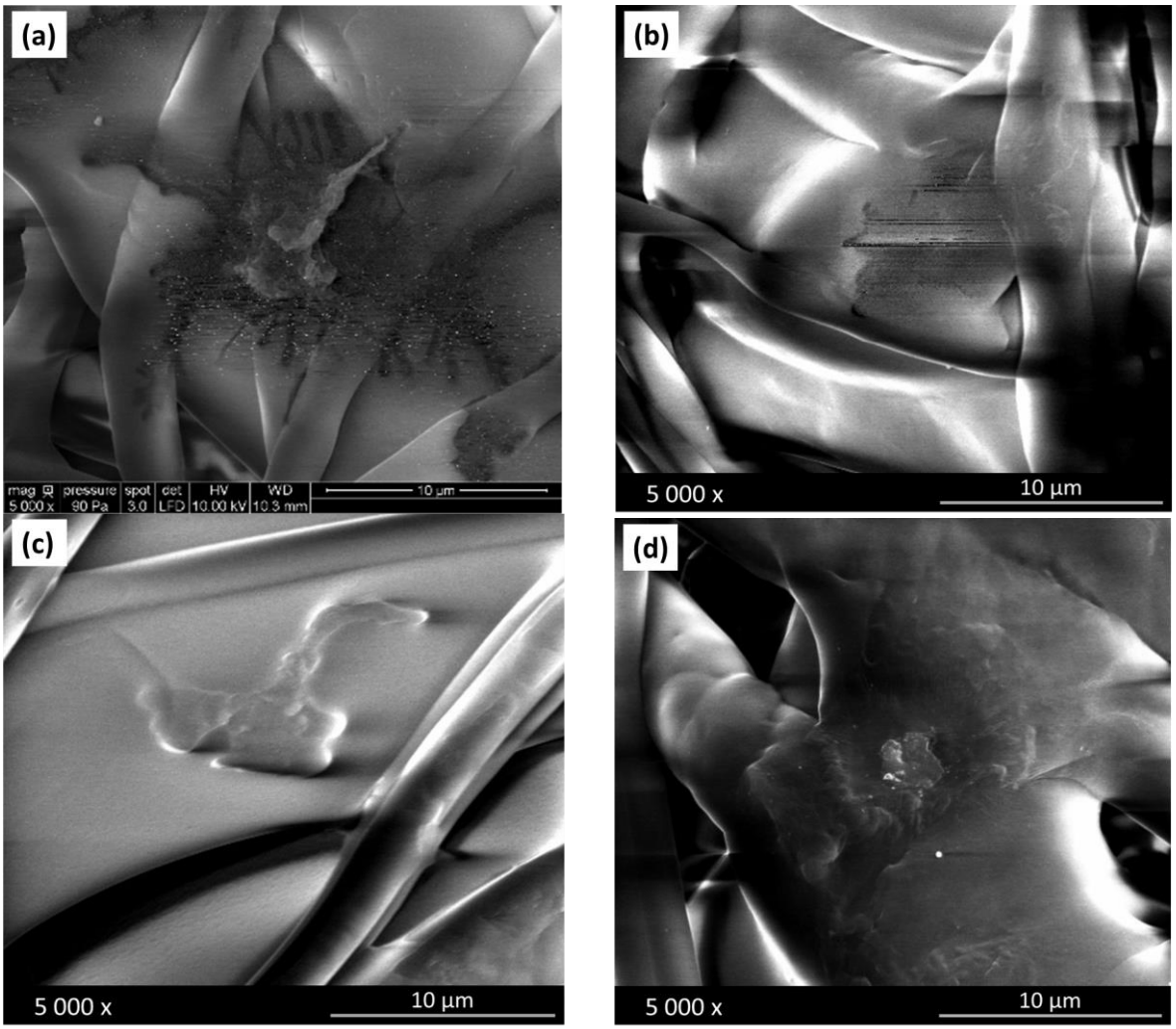


Figure IV.2 : Observations au MEB de dépôts NMCs sur masque chirurgical respiratoire classique : (a) DWNTS B /masque ; (b) DWNTS Ox /masque ; (c) FLG /masque ; (d) GO /masque.

Nous observons des nanoparticules de carbone sur les fibres des masques (Figure IV.*2*).

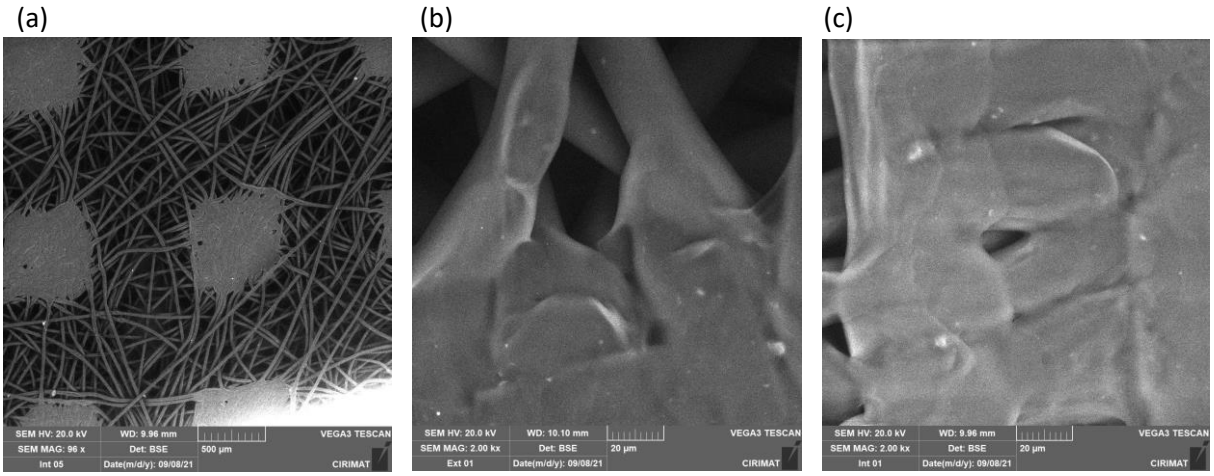


Figure IV.3 : Observations au MEB du masque commercial au graphène (couche contenant le graphène).

La Figure IV.3(a) montre l'organisation générale des fibres polymères de la couche centrale de graphène du masque commercial au graphène, ce dernier n'étant pas observable à cette échelle. Un exemple de nanoparticule de carbone du masque commercial au graphène sont observées au MET en Figure IV.3(b, c), après sonication prolongée dans de l'éthanol

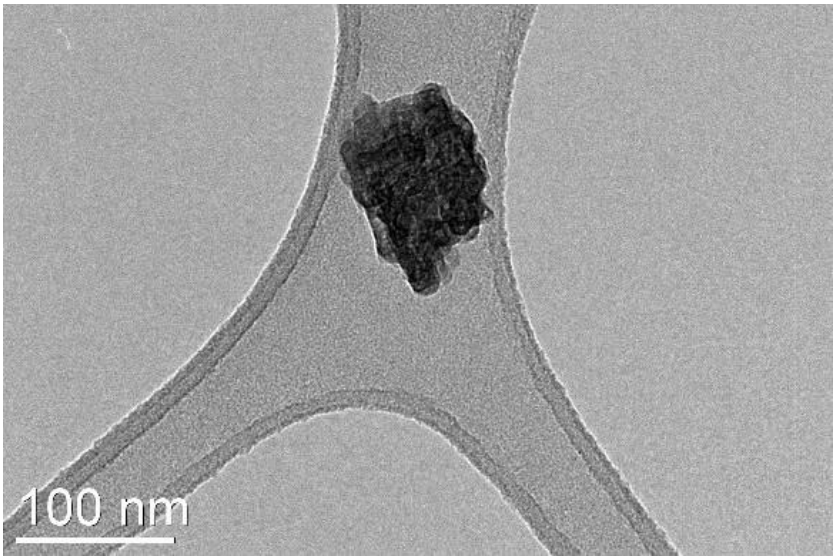


Figure IV.4 : Observation au TEM des nanoparticules de graphène extraites du masque commercial au graphène par sonication.

Chapitre V

Propriétés antimicrobiennes

Les propriétés antimicrobiennes des nanoparticules de carbone sont décrites dans la bibliographie et la plupart des études se concentrent sur leur activité antibactérienne en suspension. Les principaux mécanismes antibactériens mentionnés sont des phénomènes de stress oxydatif et des dommages physiques qui sont induits par les nanoparticules sur les bactéries. Il existe un intérêt croissant pour les composites antimicrobiens à base de ces nanoparticules [1]. Cependant, l'élaboration de tels matériaux peut soulever quelques questions telles que la durabilité de l'action antimicrobienne dans le temps. De plus, la question de la toxicité liée à des nanoparticules relarguées doit être prise en compte même si les études sur le sujet peuvent présenter des résultats contradictoires. Ainsi de nombreuses études se penchent sur l'incorporation de nanomatériaux carbonés dans un polymère pour transférer l'activité de ces nanoparticules au composite obtenu. Cependant la plupart des matériaux présentés dans la littérature contiennent les nanoparticules de carbone au sein de la matrice sans leur permettre d'émerger de la surface du polymère, or les principaux mécanismes antimicrobiens des NMCs décrits dans la littérature nécessitent un contact [12,30,124,322,323].

Notre but est maintenant de tester l'activité antibactérienne de ces matériaux. Pour cela nous utilisons le test CFU couramment mentionné dans la bibliographie. Nous testons l'activité des matériaux sur deux souches de bactéries différentes, une souche de type gram- *Pseudomonas aeruginosa* et une souche de type gram+ *Staphylococcus aureus* qui sont toutes les deux responsables d'infections nosocomiales et qui sont couramment mentionnées dans la bibliographie lors des tests sur l'activité de matériaux NMCs en suspension et de matériaux composites à base de NMCs [70,86,238,269].

Cependant de nombreuses études sont menées sur l'activité antibactérienne de NMCs en suspension et sur des composites à base de NMCs et de polymère, et les protocoles de tests utilisés diffèrent beaucoup d'une étude à l'autre, tels que : le milieu et la concentration de la suspension bactérienne utilisée, la méthode d'incubation des matériaux avec la suspension bactérienne, la mise en culture des bactéries après incubation et même l'analyse des résultats après décompte des colonies de bactéries [86,126,238,258,277,324,325]. L'incubation des bactéries avec les matériaux varie beaucoup selon la nature du matériau testé. En effet des matériaux peuvent être mis en contact de volumes importants de suspension bactérienne, la bibliographie mentionne un test sur matériau CNTs-CS-PLA immergé dans 15 mL de suspension bactérienne [126]. Au contraire, de faibles volumes de suspension bactérienne peuvent être déposés sur les matériaux testés comme par exemple le test de l'activité d'un matériau GO-PVP-CS où seulement 100 µL de suspension bactérienne sont mis en contact du matériau [238]. Comme les mécanismes exacts d'activité antibactérienne ne sont pas connus, il est difficile de savoir quels paramètres appliquer lors de nos tests. Plusieurs séries de tests ont été nécessaires pour parvenir à sélectionner des conditions permettant d'obtenir des résultats exploitables, c'est à un dire d'obtenir des puits non totalement recouverts de colonies de bactéries, mais en comportant suffisamment pour pouvoir comparer toutes les conditions testées.

Avant d'effectuer les tests sur les NMCs déposés sur silicone, nous avons vérifié leur activité antimicrobienne au contact direct des bactéries, en suspension. Les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont incubées pendant 24 heures avec les NMCs en suspension dans du milieu PBS puis l'activité est mesurée par tests CFU.

V.1. Tests antibactériens contre *Pseudomonas aeruginosa* :

La figure V.1 décrit les résultats du test de formation de colonies (CFU) sur la bactérie gram- *Pseudomonas aeruginosa*, en séparant les NMCs bruts (Figure V.1(a)) et oxydés (Figure V.1(b)).

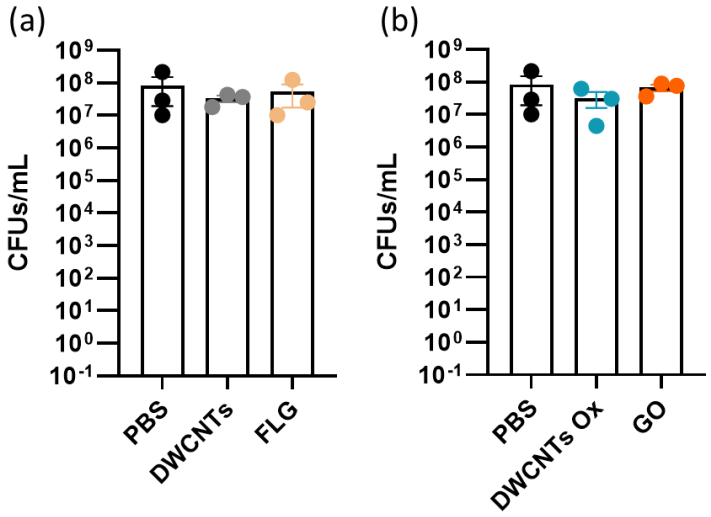


Figure V.1 : Effet antibactérien des suspensions de (a) NMCs bruts et (b) NMCs oxydés sur des bactéries *P. aeruginosa*. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU.

L'analyse statistique ANOVA appliquée sur les données révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes suspensions de NMCs dans le PBS et le contrôle PBS seul (*Figure V.1*). Ainsi aucun matériau NMC en suspension PBS n'exprime d'activité antibactérienne contre la souche *P. aeruginosa.*

Nous avons ensuite réalisé ce même test sur les différents dépôts de NMCs sur le silicone S184 (Figure V.2) et MED (Figure V.3), toujours en regroupant d'une part les NMCs bruts et d'autre par les formes oxydées.

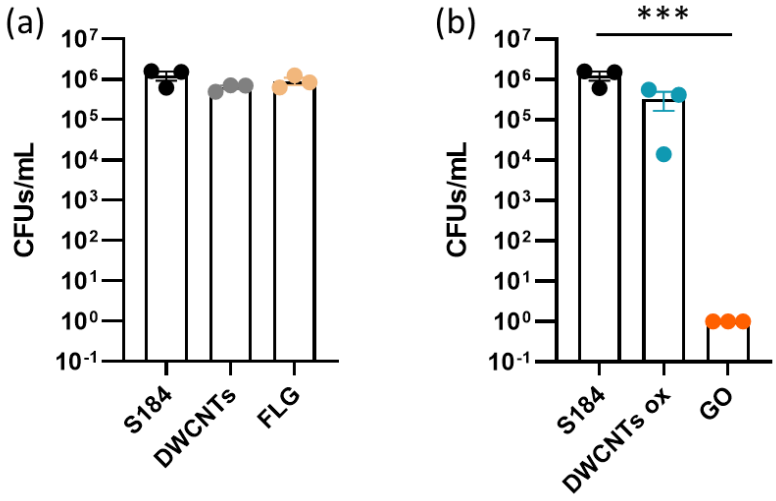


Figure V.2 : Effet antibactérien des matériaux sur des bactéries *P. aeruginosa* (a) dépôts de NMCs bruts (DWCNTs et FLG) sur S184 et (b) dépôts de NMCs oxydés (DWCNTs ox et GO) sur S184. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU. Les résultats sont significatifs si $p<0,05$, les indices *** indiquent que $p<0,0005$.

Parmi les différentes configurations testées, seuls les dépôts de GO expriment une activité antibactérienne significative contre les bactéries *P. aeruginosa,* sur le S184 (GO / S184) (Figure V.2 (b)) ainsi que sur le MED (Figure V.3(b)).

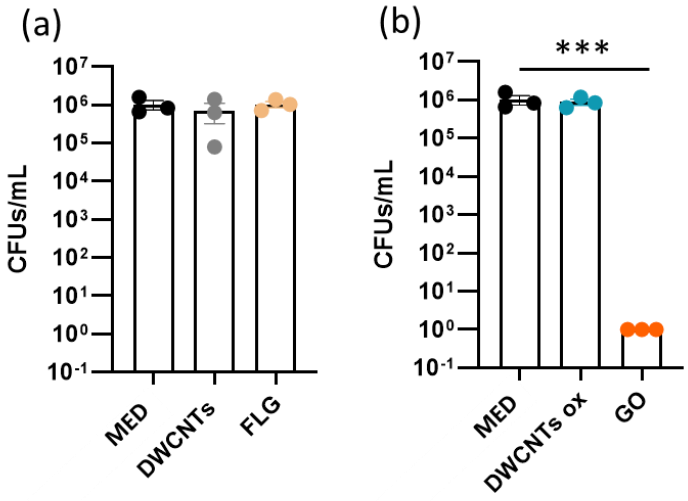


Figure V.3 : Effet antibactérien des matériaux (a) dépôts de NMCs bruts (DWCNTs, FLG) sur MED et (b) dépôts de NMCs oxydés (DWCNTs Ox, GO) sur MED contre des bactéries *P. aeruginosa*. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU. Les résultats sont significatifs si $p<0,05$, les indices *** indiquent que $p<0,0005$.

Ainsi aucun type de nanoparticules de carbone testé en suspension n'a exprimé d'activité antibactérienne contre les bactéries *P. aeruginosa* (Figure V.1), tandis que les dépôts de GO sur support silicone expriment une forte activité contre ces bactéries (Figure V.2 (b), Figure V.3 (b)). Cependant, même sur support silicone, les autres types de nanoparticules de carbone (DWCNTs, FLG, DWCNTs ox) n'ont montré aucune activité antibactérienne (Figure V.2 et Figure V.3).

V.2. Tests antibactériens sur *Staphylococcus aureus* :

De même que pour les tests réalisés avec les suspensions de NMCs en milieu PBS sur les bactéries *P. aeruginosa* (Figure V.1), l'analyse statistique ANOVA appliquée sur les données révèle qu'il n'y a pas de différence significative entre les différentes suspensions de NMCs dans le PBS et le contrôle PBS seul (Figure V.4). Ainsi les suspensions de NMCs en milieu PBS n'expriment pas d'activité antibactérienne contre la souche *S. aureus*.

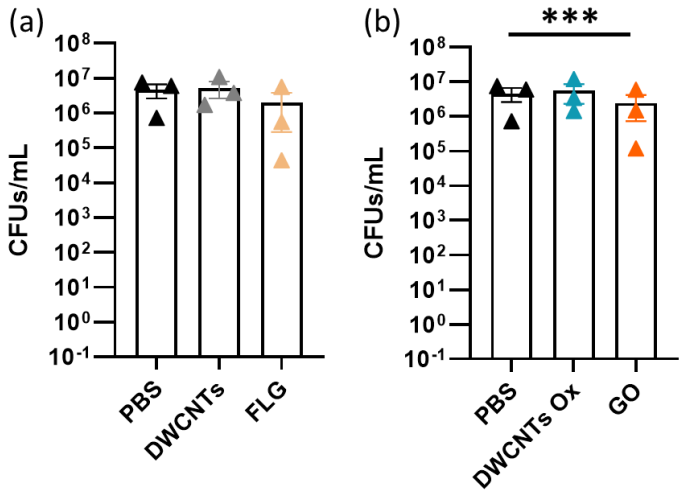


Figure V.4 : Effet antibactérien des suspensions de (a) NMCs bruts (DWCNTs et FLG) et (b) NMCs oxydés (DWCNTs ox et GO) sur des bactéries *S. aureus*. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU. Les résultats sont significatifs si p<0,05, les indices *** indiquent que p<0,0005.

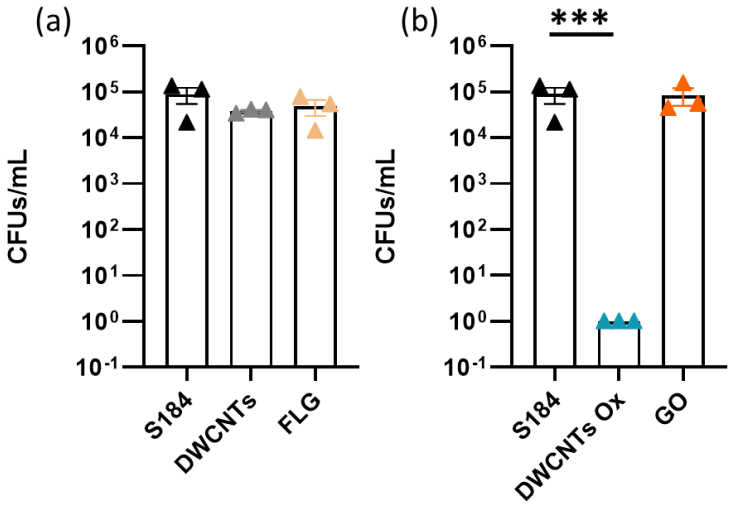


Figure V.5 : Effet antibactérien des matériaux (a) dépôts de NMCs bruts (DWCNTs et FLG) sur S184 et (b) dépôts de NMCs oxydés (DWCNTs ox et GO) sur S184 sur des bactéries *S. aureus*. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU. Les résultats sont significatifs si p<0,05, les indices *** indiquent que p<0,0005.

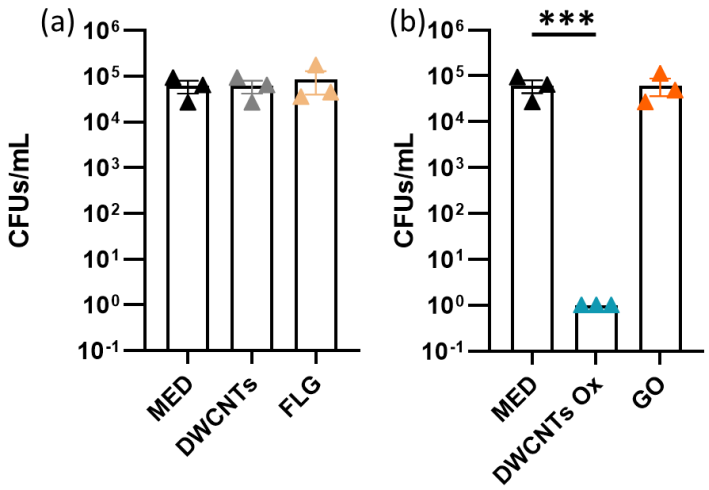


Figure V.6 : Effet antibactérien des matériaux (a) dépôts de NMCs bruts (DWCNTs et FLG) sur MED et (b) dépôts de NMCs oxydés (DWCNTs Ox et GO) sur MED contre des bactéries *S. aureus*. Les bactéries ont été incubées 24 heures avec les NMCs et l'activité antibactérienne a été mesurée par CFU. Les résultats sont significatifs si p<0,05, les indices *** indiquent que p<0,0005.

A la différence des tests effectués sur les bactéries *P. aeruginosa* (Figure V.2), parmi les différentes confugurations testées, seul le DWNTs Ox / S184 exprime une activité antibactérienne significative contre les bactéries *S. aureus* (Figure V.5).

L'analyse statistique ANOVA réalisée sur les données révèle que comme pour les tests effectués avec les dépôts sur silicone S184 (Figure V.5), seulement le dépôt DWNTs Ox / MED montre une activité antibactérienne significative sur les bactéries *S. aureus* (*Figure V.6*). Les autres matériaux ne présentent aucune action antibactérienne.

Ainsi aucune nanoparticule de carbone en suspension dans le milieu PBS n'a exprimé d'activité antibactérienne contre les souches de bactéries *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Figure V.1 Figure V.4). Ces résultats sont contradictoires avec ceux présentés dans la bibliographie. Cela pourrait s'expliquer par les différentes concentrations de NMCs testées et par les conditions expérimentales également différentes. Il n'existe pas de protocole de test standard et de nombreux paramètres peuvent varier entre les différentes études (durée, composition du milieu, etc.) [324,326,327]. Cette large variabilité des résultats est la raison principale pour laquelle nous avons décidé d'étudier simultanément deux morphologies monodimensionnelles (1D) et bidimensionnelles (2D), et d'étudier des formes brutes et oxydées pour inclure également cet aspect très important. En effet, l'oxydation des NMCs augmente de manière significative la stabilité des suspensions en milieu aqueux, ce qui conduit à un impact accru du fait d'une meilleure interaction avec les cellules. Dans ces travaux, nous avons ajouté de la CMC aux NMCs bruts (DWCNT et FLG) pour pallier au problème de stabilité (après avoir vérifié que le dispersant lui-même n'avait pas d'impact). Le même type de DWNTs a été testé avec un protocole similaire dans une autre étude et les résultats ont montré que les DWNTs en suspension dans le milieu PBS exprimaient une activité antibactérienne sur les souches *S. aureus* et *P. aeruginosa*. La seule différence a concerné la dispersion des DWNTs où aucune CMC n'a été ajoutée [328]. Il a été observé que les DWNTs en suspension dans le PBS sans CMC produisaient des espèces oxygénées réactives chez les bactéries et qu'un mécanisme d'enroulement des nanotubes autour des bactéries était probable, cependant ces effets n'ont pas pu être attribués clairement à une caractéristique physico-chimique spécifique des DWNTs.

Parmi les matériaux dépôt de NMCs en surface de silicone, seuls les dépôts de GO et DWNTs Ox sur les différents silicones ont montré une différence d'activité significative par rapport aux références silicones seules lors des tests CFU. L'analyse statistique ANOVA réalisée sur les différentes données indique une forte activité antibactérienne de la part des matériaux GO et DWNTs Ox sur silicone contre les souches *P. aeruginosa* et *S. aureus* respectivement Cela signifie que ces surfaces sont différentes des références silicones, ainsi les nanoparticules émergent sûrement de la surface silicone et elles semblent responsables de l'activité antibactérienne des matériaux. Les caractérisations effectuées sur les différents matériaux testés et les comportements similaires exprimés entre eux par les dépôts GO / S184 et GO / MED ainsi que les dépôts DWNTs Ox / S184 et DWNTs Ox / MED, suggèrent donc que les matériaux avec un même dépôt de nanoparticules de carbone sur deux silicones différents sont équivalents. Ainsi le même protocole de dépôt par aérographe utilisé pour déposer des NMCs en surface de deux silicones différents a permis d'obtenir des surfaces équivalentes avec des nanoparticules de carbone à la fois bloquées dans le silicone et émergeant de sa surface.

Les tests CFU réalisés renseignent sur une possible activité antibactérienne de la part des matériaux traités mais ne permettent pas d'identifier les mécanismes ayant lieu. Cependant nous remarquons dans le cas des dépôts que les nanoparticules de GO n'ont d'impact que sur les bactéries *P. aeruginosa* au contraire des nanoparticules de DWNTs Ox qui n'ont d'activité que sur les bactéries *S. aureus*. Cela peut provenir de la différence de morphologie des nanoparticules. Les bactéries *P. aeruginosa* sont de type gram- tandis que les bactéries *S. aureus* sont de type gram +, ces deux types de bactéries diffèrent par la nature de leur parois cellulaire. Les bactéries gram – ont une fine couche de peptidoglycanes comprise entre 6 et 15 nm et ont une membrane lipidique externe, au contraire des bactéries gram +. Ces bactéries possèdent une couche de peptidoglyanes plus épaisse allant de 20 à 80 nm et sont plus rigides. Ainsi les bactéries gram + sont peut-être plus sensibles à l'action des nanotubes de carbones qui peuvent être considérés comme des « nano-aiguilles » plutôt qu'aux nanoparticules de graphène qui peuvent être décrit comme des « nano-couteaux ». L'action antibactérienne des matériaux testés peut provenir des différences de morphologie entre les nanoparticules, et donc des différences d'impact physique. Cela a été mentionné dans la bibliographie où certaines études ont suggéré que la sélectivité de l'action antimicrobienne des NTCs est directement liée à leur forme (effet fibre), leur longueur ainsi qu'aux groupes fonctionnels présents sur leur surface, et que les propriétés mécaniques et structurales de la paroi cellulaire des microbes jouent également un rôle prépondérant [267,322,326]. Il a également été mentionné que les bactéries de forme coque seraient plus vulnérables à l'activité des NTCs que les bactéries en forme bacille. L'action mécanique semble donc principalement à l'origine de l'activité antibactérienne, cependant nous remarquons que seulement les matériaux silicone avec dépôts de nanoparticules de carbone oxydés ont un effet antibactérien, les nanoparticules de carbone bruts DWNTs B et FLG ne présentent pas de différences significatives par rapport aux références silicones. Cela indique que les fonctions oxygénées sur les nanoparticules jouent un rôle essentiel dans l'activité antibactérienne observée. Il est assez probable que l'action antibactérienne résulte à la fois d'impacts physiques et réaction avec des espèces oxygénées.

Nous remarquons que l'activité des nanoparticules DWNTs Ox et GO ne s'exprime que lorsqu'elles sont bloquées en surface de silicone et pas lorsqu'elles sont en suspension. La différence principale dans la réalisation des tests sur NMCs en suspension et NMCs bloqués en surface de silicone est que dans le premier cas les nanoparticules sont libres de se déplacer dans le milieu utilisé. De plus le volume de suspension bactérienne incubée avec les matériaux est beaucoup plus faible dans le cas des dépôts de NMCs sur silicone (75 µL contre 250 µL en suspension). Ainsi les bactéries en suspension dans un petit volume semblent plus enclines à entrer en contact des nanoparticules immobilisées que lorsque les nanoparticules ne sont pas fixées et que le volume disponible pour se mouvoir est

beaucoup plus important (volume suspension NMCs + volume suspension bactérienne = 500 µL). Il est également possible que la dispersion des nanoparticules joue un rôle clef dans l'action antimicrobienne [326]. Il est très probable que les nanoparticules de carbone en suspension en milieu PBS forment rapidement des agglomérats lors de l'incubation avec les bactéries, tandis que les NMCs en surface des matériaux resteraient dispersés et impacteraient plus facilement les microorganismes. En effet, les NMCs sont dispersés en suspension aqueuse avant d'être pulvérisés sur les supports silicones, cette dispersion semble conservée lors du blocage dans le polymère, des petits amas ont été observé en surface des matériaux et les nanoparticules les constituant ont pu être distinguées.
Ainsi les tests effectués sur matériaux dépôts de NMCs sur silicone semblent favoriser les interactions/contacts entre les nanoparticules de carbone et les bactéries par rapport aux tests réalisés en suspension, cela peut expliquer les différences de résultats observés.

Les résultats obtenus peuvent être en contradiction avec la bibliographie, où certains matériaux composites avec du GO dans du polymère inhibent l'activité de bactéries *S. aureus* par exemple [237,238,258]. Cependant, l'ignorance des mécanismes antibactériens entrant en jeu rend les comparaisons d'activité antibactérienne entre matériaux très compliquées. Il est nécessaire de déterminer la nature du mécanisme antibactérien pour pouvoir optimiser l'élaboration de ces matériaux. Une possibilité est d'étudier l'impact mécanique des matériaux sur les microorganismes en utilisant l'AFM. Cet outil peut être utilisé pour l'analyse des caractéristiques des enveloppes des micro-organismes vivants [299,329,330]. Une autre possibilité est d'utiliser des marqueurs fluorescents pour détecter la présence de composants particuliers qui renseignent sur le mécanisme en œuvre. Par exemple Il est possible d'utiliser un réactif permettant de détecter la peroxydation des lipides dans les cellules vivantes. Le réactif utilisé marque les membranes des cellules vivantes et lors de l'oxydation des hydropéroxydes lipidiques, l'émission fluorescente de ce réactif varie en passant d'environ 590 nm à environ 510 nm. La fluorescence des cellules passe alors du rouge au vert. Le rapport des intensités des émissions fluorescentes à 590 et 510 nm apporte une indication de la peroxydation lipidique [30]. Ainsi, plusieurs méthodes permettant d'obtenir des informations sur les mécanismes antimicrobiens des matériaux sont citées dans la bibliographie, et il semble nécessaire de continuer les investigations pour comprendre et améliorer l'activité des dépôts.

V.3. Tests antiviraux :

Les propriétés antivirales des NMCs sont peu mentionnées dans la bibliographie. Dans ce chapitre, nous avons testé, en collaboration avec le Dr Céline Cougoule de l'IPBS (UMR5089, Touloluse) l'activité des dépôts sur silicones des 4 NMCs précédemment décrits (DWNTS, DWNTs Ox, FLG et GO) vis-à-vis du SARS-CoV-2 responsable du COVID 19. Dans le contexte actuel de crise sanitaire mondiale due à la propagation du COVID 19, le graphène a suscité de l'intérêt avec par exemple le développement de masques respiratoires à base de graphène, commercialisés par plusieurs sociétés. Parmi eux, IDEATI[1] propose un masque en coton enduit de graphène et d'autres nanomatériaux de carbone, qui est réutilisable et affiche des propriétés antibactériennes. Bioserenity[2] propose un masque réutilisable formé de 4 couches dont une contenant du graphène et censée afficher des propriétés antivirales. Dezeen[3] a développé un système où le graphène contenu dans le masque est capable de conduire l'électricité afin de produire des charges et de repousser les particules piégées. Ainsi, le graphène est devenu très intéressant pour la recherche médicale et l'industrie comme moyen de limiter la prolifération du virus responsable du COVID 19 au sein de la population. Les utilisations ont été

[1]planarTECH Graphene Facemask, https://planartech.co.uk/.
[2]BioSerenity, https://www.bioserenity.com/.
[3]Dezeen, https://www.dezeen.com/tag/graphene/.

principalement trouvées dans le domaine médical [52,60,62,180], mais aussi pour des applications environnementales avec les nouveaux filtres pour la purification de l'eau [49,181,182] ou dans l'industrie alimentaire avec les emballages alimentaires [58,91,183] par exemple.
Nous nous sommes donc aussi intéressés aux propriétés antivirales de tels masques et nous avons pu travailler sur un échantillon commercial de masque respiratoire contenant du graphène à visée antivirale, destiné à la protection du grand public [293]. Par la même occasion, nous souhaitons étudier si le dépôt de NMCs (DWNTS, DWNTs Ox, FLG et GO) par aérographe sur des masques respiratoires chirurgicaux de type FFP1 permet de leur conférer une activité antivirale.

Les masques respiratoires classiques de type chirurgical (FFP1) que nous utilisons sont constitués de 3 couches superposées. Comme dans le cas du masque commercial au graphène, nous choisissons d'incorporer les nanoparticules de carbone sur la couche centrale. De même que pour l'élaboration des dépôts sur silicone, nous avons préparé les échantillons "masque" directement dans des plaques de culture 24 puits pour pouvoir effectuer les tests sans les transférer. Nous découpons dans les masques des disques de la taille d'un puits et nous les immobilisons au fond des puits de la plaque avec du scotch carbone pour leur éviter de flotter dans le milieu liquide utilisé lors des tests.

Nous avons conservé les mêmes quantités de nanoparticules qu'auparavant, c'est-à-dire que nous avons pulvérisé 2 mL d'une suspension à 1 mg/mL sur une plaque de culture. A la différence du protocole utilisé pour les échantillons silicone, nous n'avons pas nettoyé les dépôts sur masque.

Nous évaluons l'activité antivirale des matériaux sur une souche SARS-CoV-2 avec le test "Tissue Culture Infective Dose 50 (TCID50)", c'est à dire la dilution de la solution de virus provoquant des effets cytopathiques sur 50% des cellules en culture.

Brièvement il s'agit d'incuber le virus avec les matériaux testés, puis de diluer en série la solution virale et d'incuber ces dilutions (3 jours) avec des cellules VERO-E6 en culture. Après incubation, les cellules des différentes conditions sont observées au microscope pour détecter la présence d'un effet cytopathique, mis en évidence par le détachement du tapis cellulaire pour les cellules infectées.

Les CMNs pouvant potentiellement se révéler cytotoxiques pour les cellules mises en œuvre, la cytotoxicité a été évaluée dans le cas d'un scénario "pire cas" correspondant au décrochage de la totalité des CMNs contenus dans un puits et leur transfert dans le liquide, puis finalement leur mise en contact direct avec les cellules. Dans ce cas, la toxicité exercée par les CMNs pourrait se confondre avec l'activité virale en termes d'impact sur les cellules et conduire à un résultat "faux positif". Cela concerne surtout les échantillons masque, ce scénario étant hautement improbable pour les échantillons silicone puisqu'ils ont préalablement été nettoyés aux ultrasons avant de réaliser les tests. Chaque puits reçoit la quantité maximale d'environ 75 µg (dépôt de 2 mg sur des plaques de culture 12 puits de 108,89 cm^2 avec des puits de surface 3,65 cm^2). Nous testons des suspensions de NMCs de différentes concentrations allant jusqu'à 150 µg/mL pour tester un scénario excès de particules par rapport à la quantité maximale pouvant se détacher. Les cellules Vero E6 ont été incubées avec différentes doses de NMCs (de 0,3 à 150 à µg/ml) pendant 3 jours et la toxicité a été évaluée par un test de libération de LDH (Figure V.*7*).

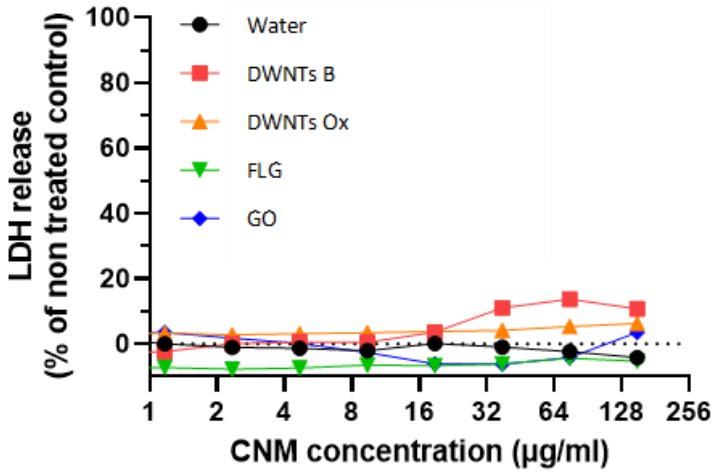


Figure V.7 : Evaluation de la cytotoxicité des NMCs sur des cellules Vero E6 par mesure de lactate déshydrogénase (LDH) libéré dans le milieu de culture.

Comme le montre la Figure V.7 aucun des NMCs n'a montré de toxicité envers les cellules Vero E6.

Avant d'effectuer les tests d'activité virucide des matériaux, la cinétique d'infectivité du SARS-CoV-2 au cours du temps est évaluée. Trois doses différentes de SARS-CoV-2 (10^3 à 10^7 PFU) ont été incubées pendant 6 à 48 heures à 37°C. La charge virale a été mesurée par TCID50 (Figure V.8).

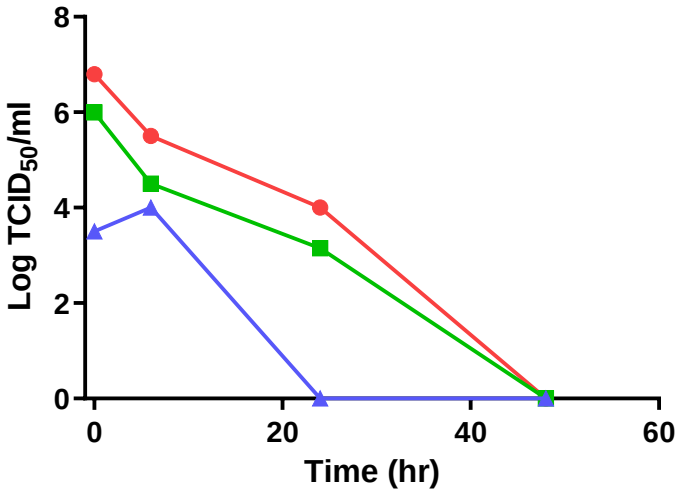


Figure V.8 : Evaluation de la cinétique d'infectivité du SARS-CoV-2 en milieu de culture cellulaire (rouge 10^3 PFU ; vert 10^6 PFU ; bleu 10^7 PFU).

Nous observons comme attendu une diminution de la charge virale en fonction du temps (Figure V.8).

Pour réaliser nos essais, nous choisissons de tester l'activité virucide des dépôts de NMCs sur silicone S184 et MED ainsi que des dépôts de NMCs sur masque avec une dose intermédiaire de 10^6 CFU à 24 heures (Figure V.9). Un puits laissé vide est utilisé comme référence interne. En effet, en absence de cellules dans lesquelles se répliquer, la fragilité intrinsèque du virus conduit à une diminution spontanée de son activité infectieuse dans le temps, qui doit être pris en compte pour

chaque essai. Un autre puits contenant le matériau référence non traité (S184, MED ou masque chirurgical) est aussi utilisé afin de renseigner l'activité intrinsèque du matériau testé. La charge virale résiduelle devrait être d'autant plus faible que l'activité antivirale du matériau testé est forte.

Nous n'observons pas différence d'activité entre les matériaux silicone avec dépôts NMCs et les contrôles silicone (Figure V.9 Figure V.10). Aucun dépôt de NMCs sur silicone n'a donc démontré d'activité virucide très significative contre le SARS-CoV-2.

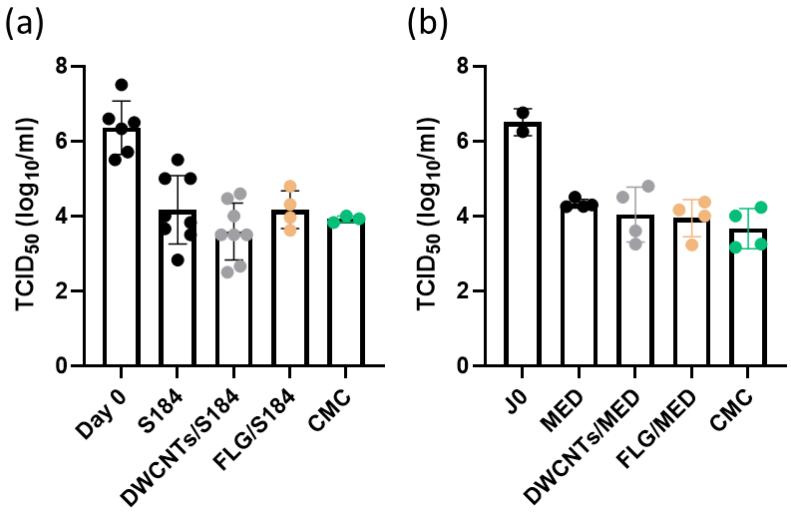


Figure V.9 : Effet antiviral contre le SARS-CoV-2 des matériaux avec dépôts de NMCs bruts sur silicone (a) activité des NMCs bruts sur S184, (b) activité des NMCs bruts sur MED. La charge antivirale est évaluée par TCID50 après 24 heures d'incubation avec les particules virales.

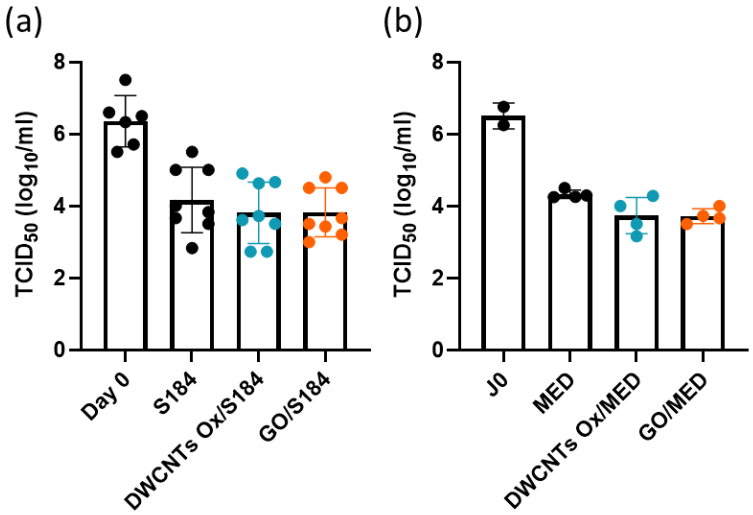


Figure V.10 : Effet antiviral contre le SARS-CoV-2 des matériaux avec dépôts de NMCs oxydés sur silicone (a) activité des NMCs oxydés sur S184, (b) activité des NMCs oxydés sur MED. La charge antivirale est évaluée par TCID50 après 24 heures d'incubation avec les particules virales.

De la même manière, nous avons testé l'activité virucide des dépôts de NMCs sur masque avec une dose intermédiaire de 10^6 CFU à 24 heures (Figure V.11). Un puits vide est utilisé comme référence interne et un autre puits contenant un disque de masque non traité est aussi utilisé afin de renseigner sur l'activité intrinsèque du matériau testé. De plus, un puits contenant seulement du scotch carbone

est testé afin de s'assurer que le scotch utilisé pour fixer les disques de masque n'influence pas les résultats.

D'après les tests aucun dépôt de NMCs sur masque, que ce soit le masque sur lequel nous avons effectué des dépôts de NMCs, ou le masque au graphène commercial, n'expriment d'activité virucide significative contre le SARS-CoV-2 (Figure V.11).

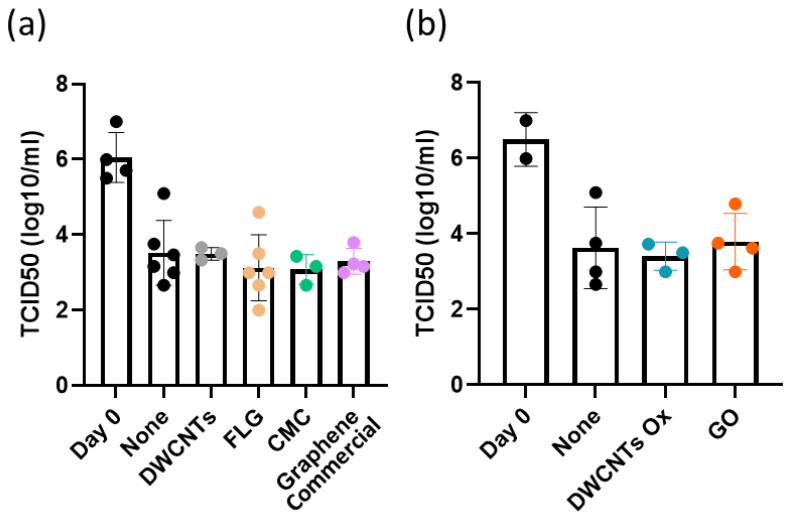


Figure V.11 : Effet antiviral contre le SARS-CoV-2 des matériaux avec dépôts de NMCs sur masque chirurgical classique (FFP1) (a) activité des NMCs bruts sur masque, le résultat du test du masque de graphène commercial est inclus (Graphene Commercial), (b) activité des NMCs oxydés sur masque. La charge antivirale est évaluée par TCID50 après 24 heures d'incubation des matériaux avec les particules virales.

Dans le contexte d'incertitude sur la toxicité potentielle des matériaux de la famille du graphène (notamment par inhalation), et en l'absence de démonstration d'un efficacité très significative, l'intérêt de l'ajout de graphène ou de l'un de ses dérivés dans des masques respiratoires à destination du public semble donc très limité et l'application du principe de précaution (tel qu'il s'est appliqué avec le retrait du marché de ces masques dans plusieurs pays) être la meilleure option.

Conclusions et perspectives

Ces travaux de thèse ont porté sur l'élaboration de surfaces antimicrobiennes à base de nanomatériaux carbonés (NMCs). Les propriétés antimicrobiennes de ces nanoparticules sont décrites dans la bibliographie et la plupart des études se concentrent sur leur activité antibactérienne en suspension. Il existe un intérêt croissant pour les composites antimicrobiens à base de ce type de nanoparticules. Notre objectif a été d'utiliser des nanoparticules de carbone dans le but de les bloquer en surface d'un matériau polymère de façon à obtenir des surfaces antimicrobiennes. Pour ce faire, plusieurs critères devaient être respectés notamment d'éviter une perte d'efficacité dans le temps ainsi que d'éviter d'éventuels problèmes de toxicité liés au relargage de nanoparticules. De plus les principaux mécanismes antimicrobiens des nanoparticules de carbone décrits dans la littérature nécessitent des contacts entre les nanoparticules et les microorganismes. Un autre critère était donc de permettre de tels contacts entre des microorganismes et les NMCs.

La première étape a concerné l'élaboration d'une surface répondant à ces critères. Nous avons adopté la méthode de dépôt par pulvérisation à l'aide d'un aérographe (spray coating) pour déposer les nanoparticules de carbone (DWNTs bruts et oxydés, FLG et GO) en surface d'un support silicone, ce matériau ayant été choisi pour ses applications dans des domaines très variés, dont les dispositifs implantables. Nous avons optimisé les dépôts avec pour objectif de bloquer une partie des nanoparticules à la surface du polymère afin de respecter notre cahier des charges. Un protocole a été mis au point et, après nettoyage aux ultrasons, les surfaces silicone avec dépôt de NMCs ont été caractérisées par différentes méthodes.

La microscopie électronique à balayage a permis d'observer des amas de nanoparticules de carbone présents en surface du silicone. Les différentes observations à faibles grandissements montrent des nanoparticules réparties de façon homogène en surface du silicone. Les observations à plus forts grandissements permettent d'observer des amas de nanoparticules qui semblent à la fois bloqués et émergents du silicone. Des faisceaux de nanotubes de carbone ou des feuillets de graphène (suivant le matériau étudié) sortant de ces amas ont pu être observés. Cependant cette technique de caractérisation ne permet pas de déterminer si les nanoparticules émergentes sont couvertes ou non d'une fine couche de silicone.

Les analyses AFM réalisées sur les échantillons ont, elles aussi, révélé la présence d'amas de nanoparticules de différentes tailles en surface des silicones. Les mesures de hauteurs ont indiqué que tous les amas de nanoparticules analysés étaient surélevés par rapport à la surface silicone. Cependant quelques mesures aux extrémités de certains amas ont présenté des hauteurs inférieures à celle du silicone et suggèrent que les nanoparticules s'enfoncent également dans le polymère. Les mesures d'adhésion et de rigidité réalisées peuvent beaucoup varier sur un même amas. En mettant ces mesures en relation avec la hauteur, il semble que toutes les différences observées soientt dues à la variation d'enfoncement des nanoparticules dans le polymère. Les zones d'amas de nanoparticules présentant les mêmes valeurs de mesures que le silicone sont sûrement recouvertes d'une fine couche de silicone. Dans certains cas les valeurs d'adhésivité et de pente mesurées peuvent être très différentes de celles du silicone, cela suggère que ces nanoparticules émergent du polymère. Sur chaque surface analysée, au moins quelques points de mesures réalisées sur les amas présentent des valeurs complètement différentes du silicone et semblent révéler qu'au moins une partie de ces amas émerge du silicone.

Les observations MEB et analyses AFM et Raman suggèrent donc que certains amas émergent du silicone tout en étant bloqués dans celui-ci, et que les autres dépôts sont immergés dans le support polymère avec parfois de petites zones émergentes. Encore une fois il n'est pas possible de conclure

avec certitude sur la présence ou l'absence d'une couche de silicone recouvrant les nanoparticules. Nous remarquons que les valeurs obtenues pour des mesures réalisées sur une surface silicone peuvent varier d'un échantillon à l'autre. Il semble donc que la présence de nanoparticules de carbone influe sur les propriétés adhésives et élastiques du silicone.

Les analyses Raman effectuées sur les dépôts de GO sur silicone SYLGARD184 et sur MED4917 sont en accord avec les caractérisations obtenues par les autres méthodes. Des nanoparticules de GO sont présentent en surface du silicone et les cartographies 2D et 3D réalisées représentent des amas de GO s'enfonçant dans le polymère tout en émergeant en surface. Cependant il est nécessaire de considérer la taille de spot du laser qui est de l'ordre du micromètre lors de l'exploitation des résultats. Il est possible que le spot laser détecte le signal du GO même si celui-ci est recouvert par une fine couche de silicone. L'inverse est également possible, le spot peut déborder lors de l'analyse d'un amas de GO et ajouter le signal du silicone qui se situe à côté ou sous les nanoparticules.

Des mesures d'angle de contact ont également été réalisées et montrent que les dépôts de nanoparticules de carbone en surface du silicone ne modifient pas sa nature hydrophobe.
Ainsi les différentes caractérisations effectuées indiquent que les nanoparticules de carbone déposées en surface de silicone remplissent les différents critères que nous nous sommes fixés. Les différentes observations MEB et analyses AFM et Raman indiquent que les nanoparticules de carbone sont bloquées dans le silicone tout en émergeant de sa surface. De plus l'application du même protocole de dépôt par pulvérisation à l'aérographe sur deux silicones différents a permis d'élaborer des matériaux équivalents. Cela valide cette preuve de concept d'élaboration de surface à base de NMCs respectant le principe "safer by design" (sécurité de manipulation, sécurité pour l'utilisateur avec l'ancrage des NMCs). Cependant il est nécessaire de poursuivre les caractérisations de ces surfaces, les différentes méthodes utilisées ne permettent malheureusement pas d'affirmer avec certitude si les nanomatériaux carbonés émergeants sont recouverts d'une fine couche de silicone ou non.

A la suite de ces travaux d'élaboration, les propriétés antibactériennes des différentes surfaces préparées à base de dépôts de NMCs ont pu être testées sur les souches *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Les tests de contrôle réalisés sur les suspensions de nanoparticules n'ont pas révélé de quelconque activité de la part des NMC. Cela est en contradiction avec la bibliographie. Une explication peut provenir de détails manquants sur les caractéristiques des nanoparticules de carbone utilisées. De nombreux paramètres peuvent différer entre des nanoparticules du même type, des informations sur la synthèse des NMCs peuvent être nécessaires pour comprendre les différences par exemple. De plus il n'y a pas de protocole de test "standardisé", dans la bibliographie et il existe de nombreuses versions différentes d'un même test. D'autres paramètres tels que la durée d'incubation ou les dilutions effectuées peuvent manquer, ce qui rend difficile la sélection des bonnes conditions pour l'expérience réalisée. Malgré le manque d'activité en suspension, les tests ont tout de même été réalisés sur les dépôts de NMCs sur silicone. Là aussi il n'existe pas de protocole standard, la méthode varie selon les études de la bibliographie et il a été nécessaire de mettre au point les différentes conditions utilisées lors des tests. Ces tests ont révélé une activité antibactérienne significative contre les bactéries *P. aeruginosa* de la part des dépôts de GO sur les deux silicones, et une activité antibactérienne significative contre les bactéries *S. aureus* de la part des dépôts de DWNTs Ox sur les deux silicones. Quel que soit le silicone utilisé, les matériaux ont montré une même activité et sont équivalents. Comme seules les nanoparticules de carbone oxydées ont un impact sur les bactéries, nous avons pu conclure que l'action antibactérienne est liée à la présence de fonctions oxygénées. De plus, le fait que les matériaux GO/ silicone et DWNTs Ox /silicone n'aient pas la même activité selon le type de bactérie suggèrent que la morphologie des nanoparticules impacte aussi l'action antibactérienne.
Cependant il est difficile de conclure sur le mécanisme précis mis en oeuvre. La plupart des études présentes dans la bibliographie identifiant la présence ou l'absence d'une action antibactérienne de la

part des matériaux testés ne mentionnent pas de mécanismes, l'origine de l'action est souvent rapportée aux mécanismes observés pour des nanoparticules en suspension. Il est particulièrement important de développer ces études pour pouvoir comprendre l'action des matériaux et améliorer leur élaboration. Plusieurs tests peuvent être envisagés pour la suite de ces travaux comme des tests d'impact physique des NMCs sur les bactéries grâce à une méthode AFM, ou des tests utilisant des marqueurs fluorescents pour détecter la présence de composants particulier qui renseignent sur le mécanisme ayant lieu.

Finalement, nous nous sommes intéressés aux propriétés antivirales des NMCs sur lesquelles il existe jusqu'à présent peu d'informations. Dans le contexte de la crise sanitaire mondiale due à la propagation du COVID 19, le graphène a suscité de l'intérêt avec par exemple le développement de masques respiratoires à base de graphène, commercialisés par plusieurs sociétés. Ainsi nous avons voulu évaluer l'activité antivirale de masques respiratoires avec dépôts de NMCs et d'un masque commercialisé à base de graphène que nous avons pu nous procurer, en plus d'évaluer l'activité antivirale des dépôts de NMCs sur silicone. Nous avons pu tester l'activité des différents matériaux contre une souche SARS-CoV-2. Ces différents tests n'ont cependant révélé aucune activité antivirale significative de la part des différents dépôts sur silicone ou masque.

Pour conclure les dépôts élaborés par pulvérisation à l'aide d'un aérographe remplissent les différents critères fixés, c'est-à-dire d'obtenir une surface dans laquelle les NMCs sont bloqués pour assurer une durabilité de leur action et respecter le concept de "safer by design" où l'on s'affranchit des problèmes éventuels de toxicité, en plus de permettre aux nanoparticules d'affleurer pour pouvoir entrer en contact avec les microorganismes environnants. De plus ce procédé permet d'obtenir des dépôts équivalents sur différents matériaux supports.

Les différents dépôts n'ont pas exprimé d'activité antivirale et les surfaces traitées par des NMCs non-oxydés n'ont pas d'impact sur les différentes bactéries utilisées lors des tests réalisés tandis que les matériaux DWNTs Ox sur silicone et GO sur silicone ont démontré des effets antibactériens significatifs sur les souches *S. aureus* et *P. aeruginosa* respectivement. Ces activités semblent à la fois dues aux fonctions oxygénées présentes sur les nanoparticules et à la fois à leur morphologie.

En perspective, différentes caractérisations supplémentaires doivent être réalisées pour s'assurer qu'une fine couche de silicone ne recouvre pas les NMCs déposées et d'autres tests antibactériens doivent être réalisés dans le but de comprendre les mécanismes entrant en jeu et pouvoir améliorer la conception des matériaux pour améliorer leur activité.

Références :

[1] Ahmed, F, Santos, CM, Vergara, RAMV, et al. Antimicrobial Applications of Electroactive PVK-SWNT Nanocomposites, Environ. Sci. Technol., 46 (2012) 1804–10.

[2] O'Toole, G, Kaplan, HB, Kolter, R. Biofilm Formation as Microbial Development, Annu. Rev. Microbiol., 54 (2000) 49–79.

[3] Roca, I, Akova, M, Baquero, F, et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention, New Microbes and New Infections, 6 (2015) 22–9.

[4] Brooks, BD, Brooks, AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance, Advanced Drug Delivery Reviews, 78 (2014) 14–27.

[5] Weinstein, R. Nosocomial Infection Update, Emerg. Infect. Dis., 4 (1998) 416–20.

[6] Zhang, A, Liu, Q, Lei, Y, et al. Synthesis and antimicrobial activities of acrylamide polymers containing quaternary ammonium salts on bacteria and phytopathogenic fungi, Reactive and Functional Polymers, 88 (2015) 39–46.

[7] Zhou, F, Qin, X, Li, Y, et al. Fluorosilicone multi-block copolymers tethering quaternary ammonium salt groups for antimicrobial purpose, Applied Surface Science, 347 (2015) 231–41.

[8] Liu, Y, Leng, C, Chisholm, B, et al. Surface Structures of PDMS Incorporated with Quaternary Ammonium Salts Designed for Antibiofouling and Fouling Release Applications, Langmuir, 29 (2013) 2897–905.

[9] Li, W-R, Xie, X-B, Shi, Q-S, et al. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on Escherichia coli, Appl Microbiol Biotechnol, 85 (2010) 1115–22.

[10] Fernando, S, Gunasekara, T, Holton, J. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action, Sri Lankan J Infec Dis, 8 (2018) 2–11.

[11] Vaidya, MY, McBain, AJ, Butler, JA, et al. Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against Enterococcus faecium, Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii in Planktonic and Biofilm Phenotypes, Sci Rep, 7 (2017) 5911 : 1-9.

[12] Xin, Q, Shah, H, Nawaz, A, et al. Antibacterial Carbon-Based Nanomaterials, Adv. Mater., 31 (2018) 1804838 : 1-14.

[13] Al-Jumaili, A, Alancherry, S, Bazaka, K, et al. Review on the Antimicrobial Properties of Carbon Nanostructures, Materials, 10 (2017) 1066 : 1-26.

[14] Varghese, S, Kuriakose, S, Jose, S. Antimicrobial Activity of Carbon Nanoparticles Isolated from Natural Sources against Pathogenic Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria, Journal of Nanoscience, 2013 (2013) 1–5.

[15] Dizaj, SM, Mennati, A, Jafari, S, et al. Antimicrobial Activity of Carbon-Based Nanoparticles, (n.d.) 5.

[16] Kang, S, Mauter, MS, Elimelech, M. Microbial Cytotoxicity of Carbon-Based Nanomaterials: Implications for River Water and Wastewater Effluent, Environ. Sci. Technol., 43 (2009) 2648–53.

[17] Fadeel, B, Bussy, C, Merino, S, et al. Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment, ACS Nano, 12 (2018) 10582–620.

[18] Yildirimer, L, Thanh, NTK, Loizidou, M, et al. Toxicology and clinical potential of nanoparticles, Nano Today, 6 (2011) 585–607.

[19] Bianco, A. Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal, Angew. Chem. Int. Ed., 52 (2013) 4986–97.

[20] Hegab, HM, ElMekawy, A, Zou, L, et al. The controversial antibacterial activity of graphene-based materials, Carbon, 105 (2016) 362–76.

[21] Zou, X, Zhang, L, Wang, Z, et al. Mechanisms of the Antimicrobial Activities of Graphene Materials, J. Am. Chem. Soc., 138 (2016) 2064–77.

[22] Francolini, I, Donelli, G, Crisante, F, et al. Antimicrobial Polymers for Anti-biofilm Medical Devices: State-of-Art and Perspectives. In: G Donelli(ed.). Biofilm-based Healthcare-associated Infections, vol. 831, Cham, 2015, p. 93–117.
[23] Liu, Y, Park, M, Shin, HK, et al. Facile preparation and characterization of poly(vinyl alcohol)/chitosan/graphene oxide biocomposite nanofibers, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 20 (2014) 4415–20.
[24] Yang, S, Lei, P, Shan, Y, et al. Preparation and characterization of antibacterial electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide composite nanofibrous membrane, Applied Surface Science, 435 (2018) 832–40.
[25] Schiffman, JD, Elimelech, M. Antibacterial Activity of Electrospun Polymer Mats with Incorporated Narrow Diameter Single-Walled Carbon Nanotubes, ACS Appl. Mater. Interfaces, 3 (2011) 462–8.
[26] Chen, Q, Mangadlao, JD, Wallat, J, et al. 3D Printing Biocompatible Polyurethane/Poly(lactic acid)/Graphene Oxide Nanocomposites: Anisotropic Properties, ACS Applied Materials & Interfaces, 9 (2017) 4015–23.
[27] Sayyar, S, Cornock, R, Murray, E, et al. Extrusion printed graphene/ polycaprolactone/ composites for tissue engineering, Mater. Sci. Forum, 773 (2013) 496–502.
[28] Sayyar, S, Murray, E, Thompson, BC, et al. Processable conducting graphene/chitosan hydrogels for tissue engineering, J. Mater. Chem. B, 3 (2015) 481–90.
[29] Liu, Y, Wen, J, Gao, Y, et al. Antibacterial graphene oxide coatings on polymer substrate, Applied Surface Science, 436 (2018) 624–30.
[30] Li, R, Mansukhani, ND, Guiney, LM, et al. Identification and Optimization of Carbon Radicals on Hydrated Graphene Oxide for Ubiquitous Antibacterial Coatings, ACS Nano, 10 (2016) 10966–80.
[31] Lu, X, Feng, X, Werber, JR, et al. Enhanced antibacterial activity through the controlled alignment of graphene oxide nanosheets, Proc Natl Acad Sci USA, 114 (2017) E9793–801.
[32] Papi, M, Palmieri, V, Bugli, F, et al. Biomimetic antimicrobial cloak by graphene-oxide agar hydrogel, Sci Rep, 6 (2016) 1–7.
[33] Sardar, VB, Rajhans, DNR, Pathak, A, et al. Developments in silicone material for biomedical applications- A review, (n.d.) 18.
[34] Beech, IB. Corrosion of technical materials in the presence of biofilms—current understanding and state-of-the art methods of study, International Biodeterioration & Biodegradation, 53 (2004) 177–83.
[35] Francolini, I, Donelli, G. Prevention and control of biofilm-based medical-device-related infections, FEMS Immunol Med Microbiol, 59 (2010) 227–38.
[36] Veerachamy, S, Yarlagadda, T, Manivasagam, G, et al. Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: A review, Proc Inst Mech Eng H, 228 (2014) 1083–99.
[37] Huang, K-S, Yang, C-H, Huang, S-L, et al. Recent Advances in Antimicrobial Polymers: A Mini-Review, IJMS, 17 (2016) 1578.
[38] Siedenbiedel, F, Tiller, JC. Antimicrobial Polymers in Solution and on Surfaces: Overview and Functional Principles, Polymers, 4 (2012) 46–71.
[39] Liu, L, Li, W, Liu, Q. Recent development of antifouling polymers: structure, evaluation, and biomedical applications in nano/micro-structures, WIREs Nanomed Nanobiotechnol, 6 (2014) 599–614.
[40] Liu, G, Wu, G, Jin, C, et al. Preparation and antimicrobial activity of terpene-based polyurethane coatings with carbamate group-containing quaternary ammonium salts, Progress in Organic Coatings, 80 (2015) 150–5.
[41] Wang, L, Hu, C, Shao, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future, IJN, 12 (2017) 1227–49.
[42] Díez-Pascual, A. Recent Progress in Antimicrobial Nanomaterials, Nanomaterials, 10 (2020) 2315.

[43] Yaragalla, S, Bhavitha, KB, Athanassiou, A. A Review on Graphene Based Materials and Their Antimicrobial Properties, (2021) 18.
[44] Staneva, AD, Dimitrov, DK, Gospodinova, DN, et al. Antibiofouling Activity of Graphene Materials and Graphene-Based Antimicrobial Coatings, Microorganisms, 9 (2021) 1839.
[45] Mohammed, H, Kumar, A, Bekyarova, E, et al. Antimicrobial Mechanisms and Effectiveness of Graphene and Graphene-Functionalized Biomaterials. A Scope Review, Front. Bioeng. Biotechnol., 8 (2020) 465.
[46] Saleemi, MA, Kong, YL, Yong, PVC, et al. An Overview of Antimicrobial Properties of Carbon Nanotubes-Based Nanocomposites, Adv Pharm Bull, 12 (2022) 449–65.
[47] Safdar, M, Kim, W, Park, S, et al. Engineering plants with carbon nanotubes: a sustainable agriculture approach, J Nanobiotechnol, 20 (2022) 275.
[48] De Maio, F, Palmieri, V, Babini, G, et al. Graphene nanoplatelet and graphene oxide functionalization of face mask materials inhibits infectivity of trapped SARS-CoV-2, IScience, 24 (2021) 102788.
[49] Sengupta, J, Hussain, CM. Carbon nanomaterials to combat virus: A perspective in view of COVID-19, Carbon Trends, 2 (2021) 100019.
[50] Ayub, M, Othman, MHD, Khan, IU, et al. Graphene-based nanomaterials as antimicrobial surface coatings: A parallel approach to restrain the expansion of COVID-19, Surfaces and Interfaces, 27 (2021) 101460.
[51] Matai, I, Sachdev, A, Dubey, P, et al. Antibacterial activity and mechanism of Ag–ZnO nanocomposite on S. aureus and GFP-expressing antibiotic resistant E. coli, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 115 (2014) 359–67.
[52] Pant, B, Pokharel, P, Tiwari, AP, et al. Characterization and antibacterial properties of aminophenol grafted and Ag NPs decorated graphene nanocomposites, Ceramics International, 41 (2015) 5656–62.
[53] He, T, Liu, H, Zhou, Y, et al. Antibacterial effect and proteomic analysis of graphene-based silver nanoparticles on a pathogenic bacterium Pseudomonas aeruginosa, Biometals, 27 (2014) 673–82.
[54] Zanni, E, Bruni, E, Chandraiahgari, CR, et al. Evaluation of the antibacterial power and biocompatibility of zinc oxide nanorods decorated graphene nanoplatelets: new perspectives for antibiodeteriorative approaches, J Nanobiotechnol, 15 (2017) 1–12.
[55] Wang, Y-W, Cao, A, Jiang, Y, et al. Superior Antibacterial Activity of Zinc Oxide/Graphene Oxide Composites Originating from High Zinc Concentration Localized around Bacteria, ACS Appl. Mater. Interfaces, 6 (2014) 2791–8.
[56] Nel, A, Xia, T, Mädler, L, et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel, Science, New Series, 311 (2006) 622–7.
[57] Plachá, D, Muñoz-Bonilla, A, Škrlová, K, et al. Antibacterial Character of Cationic Polymers Attached to Carbon-Based Nanomaterials, Nanomaterials, 10 (2020) 1218.
[58] Francolini, I, Donelli, G, Crisante, F, et al. Antimicrobial Polymers for Anti-biofilm Medical Devices: State-of-Art and Perspectives. In: G Donelli(ed.). Biofilm-based Healthcare-associated Infections, vol. 831, Cham, 2015, p. 93–117.
[59] Giraud, L, Tourrette, A, Flahaut, E. Carbon nanomaterials-based polymer-matrix nanocomposites for antimicrobial applications: a review, Carbon, 182 (2021) 463–83.
[60] Sender, R, Fuchs, S, Milo, R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body, PLoS Biol, 14 (2016) 1–14.
[61] Hawksworth, DL. Microorganisms. Global Biodiversity, Dordrecht, 1992, p. 47–54.
[62] Silhavy, TJ, Kahne, D, Walker, S. The Bacterial Cell Envelope, Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2 (2010) a000414 : 1-16.
[63] Balouiri, M, Sadiki, M, Ibnsouda, SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity_ A review, Journal of Pharmaceutical Analysis, 6 (2016) 71–9.
[64] Song, K, Wu, Q, Qi, Y, et al. Electrospun nanofibers with antimicrobial properties. Electrospun Nanofibers, 2017, p. 551–69.

[65] Khandelwal, G, Kumar, R, Kumar, V. Antimicrobial Activities of Graphene–Polymer Nanocomposites. Nanostructured Polymer Composites for Biomedical Applications, 2019, p. 429–45.
[66] Yang, Zhang, Zhang. Electrospun Chitosan/Poly (Vinyl Alcohol)/Graphene Oxide Nanofibrous Membrane with Ciprofloxacin Antibiotic Drug for Potential WoundDressing Application, IJMS, 20 (2019) 4395 : 1-16.
[67] Elleuch, L, Shaaban, M, Smaoui, S, et al. Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces sp. TN262, Appl Biochem Biotechnol, 162 (2010) 579–93.
[68] Valgas, C, Souza, SM de, Smânia, EFA, et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products, Braz. J. Microbiol., 38 (2007) 369–80.
[69] Jorgensen, JH, Ferraro, MJ. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices, CLIN INFECT DIS, 49 (2009) 1749–55.
[70] Thampi, S, Nandkumar, AM, Muthuvijayan, V, et al. Differential Adhesive and Bioactive Properties of the Polymeric Surface Coated with Graphene Oxide Thin Film, ACS Appl. Mater. Interfaces, 9 (2017) 4498–508.
[71] Bewley, KR. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays, Nature Protocols, 16 (2021) 35.
[72] Santos, CM, Tria, MCR, Vergara, RAMV, et al. Antimicrobial graphene polymer (PVK-GO) nanocomposite films, Chem. Commun., 47 (2011) 8892–4.
[73] Ye, S, Shao, K, Li, Z, et al. Antiviral Activity of Graphene Oxide: How Sharp Edged Structure and Charge Matter, ACS Appl. Mater. Interfaces, 7 (2015) 21571–9.
[74] Watzinger, F, Ebner, K, Lion, T. Detection and monitoring of virus infections by real-time PCR, Molecular Aspects of Medicine, (2006) 45.
[75] Santos, CM, Mangadlao, J, Ahmed, F, et al. Graphene nanocomposite for biomedical applications: fabrication, antimicrobial and cytotoxic investigations, Nanotechnology, 23 (2012) 395101 : 1-10.
[76] Musico, YLF, Santos, CM, Dalida, MLP, et al. Surface Modification of Membrane Filters Using Graphene and Graphene Oxide-Based Nanomaterials for Bacterial Inactivation and Removal, ACS Sustainable Chem. Eng., 2 (2014) 1559–65.
[77] Hu, W, Peng, C, Luo, W, et al. Graphene-Based Antibacterial Paper, ACS Nano, 4 (2010) 4317–23.
[78] Brady-Estévez, AS, Kang, S, Elimelech, M. A Single-Walled-Carbon-Nanotube Filter for Removal of Viral and Bacterial Pathogens, Small, 4 (2008) 481–4.
[79] Aslan, S, Loebick, CZ, Kang, S, et al. Antimicrobial biomaterials based on carbon nanotubes dispersed in poly(lactic-co-glycolic acid), Nanoscale, 2 (2010) 1789–94.
[80] Hegab, HM, ElMekawy, A, Barclay, TG, et al. Fine-Tuning the Surface of Forward Osmosis Membranes via Grafting Graphene Oxide: Performance Patterns and Biofouling Propensity, ACS Appl. Mater. Interfaces, 7 (2015) 18004–16.
[81] Mejías Carpio, IE, Santos, CM, Wei, X, et al. Toxicity of a polymer–graphene oxide composite against bacterial planktonic cells, biofilms, and mammalian cells, Nanoscale, 4 (2012) 4746–56.
[82] Li, M, Xi, N, Wang, Y, et al. Advances in atomic force microscopy for single-cell analysis, Nano Res., 12 (2019) 703–18.
[83] Camesano, TA, Natan, MJ, Logan, BE. Observation of Changes in Bacterial Cell Morphology Using Tapping Mode Atomic Force Microscopy, Langmuir, 16 (2000) 4563–72.
[84] Grande, CD, Mangadlao, J, Fan, J, et al. Chitosan Cross-Linked Graphene Oxide Nanocomposite Films with Antimicrobial Activity for Application in Food Industry, Macromol. Symp., 374 (2017) 1600114 : 1-8.
[85] Yin, S, Goldovsky, Y, Herzberg, M, et al. Functional Free-Standing Graphene Honeycomb Films, Adv. Funct. Mater., 23 (2013) 2972–8.

[86] Surudžić, R, Janković, A, Mitrić, M, et al. The effect of graphene loading on mechanical, thermal and biological properties of poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 34 (2016) 250–7.
[87] Gupta, I, Azizighannad, S, Farinas, ET, et al. Antiviral properties of select carbon nanostructures and their functionalized analogs, Materials Today Communications, 29 (2021) 102743.
[88] Rhazouani, A, Aziz, K, Gamrani, H, et al. Can the application of graphene oxide contribute to the fight against COVID-19? Antiviral activity, diagnosis and prevention, Current Research in Pharmacology and Drug Discovery, 2 (2021) 100062.
[89] Serrano-Aroca, Á, Takayama, K, Tuñón-Molina, A, et al. Carbon-Based Nanomaterials: Promising Antiviral Agents to Combat COVID-19 in the Microbial-Resistant Era, ACS Nano, 15 (2021) 8069–86.
[90] Mohamed, NA, Abd El-Ghany, NA. Novel aminohydrazide cross-linked chitosan filled with multi-walled carbon nanotubes as antimicrobial agents, International Journal of Biological Macromolecules, 115 (2018) 651–62.
[91] Krishnan, S, Weinman, CJ, Ober, CK. Advances in polymers for anti-biofouling surfaces, J. Mater. Chem., 18 (2008) 3405–13.
[92] Xue, Y, Xiao, H, Zhang, Y. Antimicrobial Polymeric Materials with Quaternary Ammonium and Phosphonium Salts, IJMS, 16 (2015) 3626–55.
[93] Kawabata, N, Nishiguchi, M. Antibacterial activity of soluble pyridinium-type polymers., Applied and Environmental Microbiology, 54 (1988) 2532–5.
[94] Kanazawa, A, Ikeda, T, Endo, T. Polymeric phosphonium salts as a novel class of cationic biocides. IV. Synthesis and antibacterial activity of polymers with phosphonium salts in the main chain, J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 31 (1993) 3031–8.
[95] Kanazawa, A, Ikeda, T, Endo, T. Novel polycationic biocides: Synthesis and antibacterial activity of polymeric phosphonium salts, J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 31 (1993) 335–43.
[96] Kanazawa, A, Ikeda, T, Endo, T. Antibacterial activity of polymeric sulfonium salts, J. Polym. Sci. A Polym. Chem., 31 (1993) 2873–6.
[97] Locock, KES, Michl, TD, Valentin, JDP, et al. Guanylated Polymethacrylates: A Class of Potent Antimicrobial Polymers with Low Hemolytic Activity, Biomacromolecules, 14 (2013) 4021–31.
[98] Yu, K, Mei, Y, Hadjesfandiari, N, et al. Engineering biomaterials surfaces to modulate the host response, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 124 (2014) 69–79.
[99] Bianculli, RH, Mase, JD, Schulz, MD. Antiviral Polymers: Past Approaches and Future Possibilities, Macromolecules, 53 (2020) 9158–86.
[100] Jarach, N, Dodiuk, H, Kenig, S. Polymers in the Medical Antiviral Front-Line, Polymers, 12 (2020) 1727.
[101] Timofeeva, L, Kleshcheva, N. Antimicrobial polymers: mechanism of action, factors of activity, and applications, Appl Microbiol Biotechnol, 89 (2011) 475–92.
[102] Bortolamiol, T, Lukanov, P, Galibert, A-M, et al. Double-walled carbon nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening, Carbon, 78 (2014) 79–90.
[103] Georgakilas, V, Otyepka, M, Bourlinos, AB, et al. Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications, Chem. Rev., 112 (2012) 6156–214.
[104] Shenderova, OA, Gruen, DM. Ultrananocrystalline diamond: synthesis, properties and applications. 2012.
[105] Zeiger, M, Jäckel, N, Aslan, M, et al. Understanding structure and porosity of nanodiamond-derived carbon onions, Carbon, 84 (2015) 584–98.
[106] Portet, C, Yushin, G, Gogotsi, Y. Electrochemical performance of carbon onions, nanodiamonds, carbon black and multiwalled nanotubes in electrical double layer capacitors, Carbon, 45 (2007) 2511–8.
[107] McDonough, JK, Frolov, AI, Presser, V, et al. Influence of the structure of carbon onions on their electrochemical performance in supercapacitor electrodes, Carbon, 50 (2012) 3298–309.

[108] Yushin, GN, Osswald, S, Padalko, VI, et al. Effect of sintering on structure of nanodiamond, Diamond and Related Materials, 14 (2005) 1721–9.
[109] Mochalin, VN, Shenderova, O, Ho, D, et al. The properties and applications of nanodiamonds, Nature Nanotech, 7 (2012) 11–23.
[110] Wick, P, Louw-Gaume, AE, Kucki, M, et al. Classification Framework for Graphene-Based Materials, Angew. Chem. Int. Ed., 53 (2014) 7714–8.
[111] Shi, L, Chen, J, Teng, L, et al. The Antibacterial Applications of Graphene and Its Derivatives, Small, 12 (2016) 4165–84.
[112] Park, S, Mohanty, N, Suk, JW, et al. Biocompatible, Robust Free-Standing Paper Composed of a TWEEN/Graphene Composite, Adv. Mater., 22 (2010) 1736–40.
[113] Papageorgiou, DG, Kinloch, IA, Young, RJ. Mechanical properties of graphene and graphene-based nanocomposites, Progress in Materials Science, 90 (2017) 75–127.
[114] Shearer, CJ, Slattery, AD, Stapleton, AJ, et al. Accurate thickness measurement of graphene, Nanotechnology, 27 (2016) 125704 1:10.
[115] Kang, S, Pinault, M, Pfefferle, LD, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Exhibit Strong Antimicrobial Activity, Langmuir, 23 (2007) 8670–3.
[116] Dresselhaus, MS, Dresselhaus, G, Eklund, PC. Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes. 1996.
[117] Akhavan, O, Ghaderi, E. Toxicity of Graphene and Graphene Oxide Nanowalls Against Bacteria, ACS Nano, 4 (2010) 5731–6.
[118] Rahamathulla, M, Bhosale, RR, Osmani, RAM, et al. Carbon Nanotubes: Current Perspectives on Diverse Applications in Targeted Drug Delivery and Therapies, Materials, 14 (2021) 6707.
[119] Riley, PR, Narayan, RJ. Recent advances in carbon nanomaterials for biomedical applications: A review, Current Opinion in Biomedical Engineering, 17 (2021) 100262.
[120] Shvedova, A, Castranova, V, Kisin, E, et al. Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 66 (2003) 1909–26.
[121] Lam, C, James, JT, McCluskey, R, et al. A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks, Critical Reviews in Toxicology, 36 (2006) 189–217.
[122] Cheng, J, Flahaut, E, Cheng, SH. Effect of Carbon Nanotubes on Developing Zebrafish (danio Rerio) Embryos, Environ Toxicol Chem, 26 (2007) 708–16.
[123] Mocan, T, Matea, CT, Pop, T, et al. Carbon nanotubes as anti-bacterial agents, Cell. Mol. Life Sci., 74 (2017) 3467–79.
[124] Azizi-Lalabadi, M. Carbon nanomaterials against pathogens; the antimicrobial activity of carbon nanotubes, graphene/graphene oxide, fullerenes, and their nanocomposites, Adv. Colloid Interface Sci, 284 (2020) 102250 : 1-15.
[125] Innocenzi, P, Stagi, L. Carbon-based antiviral nanomaterials: graphene, C-dots, and fullerenes. A perspective, Chem. Sci., 11 (2020) 6606–22.
[126] Liu, Y, Wang, S, Lan, W, et al. Fabrication of polylactic acid/carbon nanotubes/chitosan composite fibers by electrospinning for strawberry preservation, International Journal of Biological Macromolecules, 121 (2019) 1329–36.
[127] García-Hevia, L, Valiente, R, Fernández-Luna, JL, et al. Inhibition of Cancer Cell Migration by Multiwalled Carbon Nanotubes, Adv. Healthcare Mater., 4 (2015) 1640–4.
[128] Sametband, M, Kalt, I, Gedanken, A, et al. Herpes Simplex Virus Type-1 Attachment Inhibition by Functionalized Graphene Oxide, ACS Appl. Mater. Interfaces, 6 (2014) 1228–35.
[129] Wang, IC, Tai, LA, Lee, DD, et al. C_{60} and Water-Soluble Fullerene Derivatives as Antioxidants Against Radical-Initiated Lipid Peroxidation, J. Med. Chem., 42 (1999) 4614–20.
[130] Lucente-Schultz, RM, Moore, VC, Leonard, AD, et al. Antioxidant Single-Walled Carbon Nanotubes, J. Am. Chem. Soc., 131 (2009) 3934–41.
[131] Crouzier, D, Follot, S, Gentilhomme, E, et al. Carbon nanotubes induce inflammation but decrease the production of reactive oxygen species in lung, Toxicology, 272 (2010) 39–45.

[132] Zheng, H, Ma, R, Gao, M, et al. Antibacterial applications of graphene oxides: structure-activity relationships, molecular initiating events and biosafety, Science Bulletin, 63 (2018) 133–42.
[133] Han, W, Wu, Z, Li, Y, et al. Graphene family nanomaterials (GFNs)—promising materials for antimicrobial coating and film: A review, Chemical Engineering Journal, 358 (2019) 1022–37.
[134] Mashino, T, Nishikawa, D, Takahashi, K, et al. Antibacterial and antiproliferative activity of cationic fullerene derivatives, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 13 (2003) 4395–7.
[135] Parise, A, Thakor, H, Zhang, X. Activity inhibition on municipal activated sludge by single-walled carbon nanotubes, J Nanopart Res, 16 (2014) 2159 : 1-9.
[136] Li, Y, Liu, Y, Fu, Y, et al. The triggering of apoptosis in macrophages by pristine graphene through the MAPK and TGF-beta signaling pathways, Biomaterials, 33 (2012) 402–11.
[137] Begum, P, Fugetsu, B. Induction of cell death by graphene in Arabidopsis thaliana (Columbia ecotype) T87 cell suspensions, Journal of Hazardous Materials, 260 (2013) 1032–41.
[138] Chen, Y, Gao, Y, Chen, Y, et al. Nanomaterials-based photothermal therapy and its potentials in antibacterial treatment, Journal of Controlled Release, 328 (2020) 251–62.
[139] Mamouni, J, Tang, Y, Wu, M, et al. Single-Walled Carbon Nanotubes Coupled with Near-Infrared Laser for Inactivation of Bacterial Cells, J Nanosci Nanotechnol, 11 (2011) 4708–16.
[140] Shahnawaz Khan, M, Abdelhamid, HN, Wu, H-F. Near infrared (NIR) laser mediated surface activation of graphene oxide nanoflakes for efficient antibacterial, antifungal and wound healing treatment, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 127 (2015) 281–91.
[141] Akhavan, O, Ghaderi, E, Esfandiar, A. Wrapping Bacteria by Graphene Nanosheets for Isolation from Environment, Reactivation by Sonication, and Inactivation by Near-Infrared Irradiation, J. Phys. Chem. B, 115 (2011) 6279–88.
[142] Sundaram, P, Abrahamse, H. Phototherapy Combined with Carbon Nanomaterials (1D and 2D) and Their Applications in Cancer Therapy, Materials, 13 (2020) 4830.
[143] Ibelli, T, Templeton, S, Levi-Polyachenko, N. Progress on utilizing hyperthermia for mitigating bacterial infections, International Journal of Hyperthermia, 34 (2018) 144–56.
[144] Al-Hakami, SM, Khalil, AB, Laoui, T, et al. Fast Disinfection of *Escherichia coli* Bacteria Using Carbon Nanotubes Interaction with Microwave Radiation, Bioinorganic Chemistry and Applications, 2013 (2013) 458943 : 1-9.
[145] Beik, J, Abed, Z, Shakeri-Zadeh, A, et al. Evaluation of the sonosensitizing properties of nano-graphene oxide in comparison with iron oxide and gold nanoparticles, Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures, 81 (2016) 308–14.
[146] Beik, J, Abed, Z, Ghadimi-Daresajini, A, et al. Measurements of nanoparticle-enhanced heating from 1MHz ultrasound in solution and in mice bearing CT26 colon tumors, Journal of Thermal Biology, 62 (2016) 84–9.
[147] Chatterjee, DK, Diagaradjane, P, Krishnan, S. Nanoparticle-mediated hyperthermia in cancer therapy, Therapeutic Delivery, 2 (2011) 1001–14.
[148] Lee, S, Nam, J-S, Han, J, et al. Carbon Nanotube Mask Filters and Their Hydrophobic Barrier and Hyperthermic Antiviral Effects on SARS-CoV-2, ACS Appl. Nano Mater., 4 (2021) 8135–44.
[149] Yang, P. COVID-19: a new challenge for human beings, (n.d.) 3.
[150] Zhou, P. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin, (n.d.) 20.
[151] Raphey, VR, Henna, TK, Nivitha, KP, et al. Advanced biomedical applications of carbon nanotube, Materials Science and Engineering: C, 100 (2019) 616–30.
[152] Kang, S, Herzberg, M, Rodrigues, DF, et al. Antibacterial Effects of Carbon Nanotubes: Size Does Matter!, Langmuir, 24 (2008) 6409–13.
[153] Malek, I, Schaber, CF, Heinlein, T, et al. Vertically aligned multi walled carbon nanotubes prevent biofilm formation of medically relevant bacteria, J. Mater. Chem. B, 4 (2016) 5228–35.
[154] Nowack, B, Ranville, JF, Diamond, S, et al. Potential scenarios for nanomaterial release and subsequent alteration in the environment: Nanoparticle release, Environmental Toxicology and Chemistry, 31 (2012) 50–9.

[155] Dubey, P, Matai, I, Kumar, SU, et al. Perturbation of cellular mechanistic system by silver nanoparticle toxicity: Cytotoxic, genotoxic and epigenetic potentials, Advances in Colloid and Interface Science, 221 (2015) 4–21.
[156] Dinh, NX, Quy, NV, Huy, TQ, et al. Decoration of Silver Nanoparticles on Multiwalled Carbon Nanotubes: Antibacterial Mechanism and Ultrastructural Analysis, Journal of Nanomaterials, 2015 (2015) 814379 : 1-11.
[157] Yousefi, M, Dadashpour, M, Hejazi, M, et al. Anti-bacterial activity of graphene oxide as a new weapon nanomaterial to combat multidrug-resistance bacteria, Materials Science and Engineering: C, 74 (2017) 568–81.
[158] Nie, C, Yang, Y, Cheng, C, et al. Bioinspired and biocompatible carbon nanotube-Ag nanohybrid coatings for robust antibacterial applications, Acta Biomaterialia, 51 (2017) 479–94.
[159] Kovvuru, P, Mancilla, PE, Shirode, AB, et al. Oral ingestion of silver nanoparticles induces genomic instability and DNA damage in multiple tissues, Nanotoxicology, 9 (2015) 162–71.
[160] Elechiguerra, JL, Burt, JL, Morones, JR, et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1, J Nanobiotechnol, 3 (2005) 6.
[161] Du, T, Lu, J, Liu, L, et al. Antiviral Activity of Graphene Oxide–Silver Nanocomposites by Preventing Viral Entry and Activation of the Antiviral Innate Immune Response, ACS Appl. Bio Mater., 1 (2018) 1286–93.
[162] Zhou, Y, Huang, J, Shi, W, et al. Ecofriendly and environment-friendly synthesis of size-controlled silver nanoparticles/graphene composites for antimicrobial and SERS actions, Applied Surface Science, 457 (2018) 1000–8.
[163] Lukowiak, A, Kedziora, A, Strek, W. Antimicrobial graphene family materials: Progress, advances, hopes and fears, Advances in Colloid and Interface Science, 236 (2016) 101–12.
[164] Gollavelli, G, Chang, C-C, Ling, Y-C. Facile Synthesis of Smart Magnetic Graphene for Safe Drinking Water: Heavy Metal Removal and Disinfection Control, ACS Sustainable Chem. Eng., 1 (2013) 462–72.
[165] Panda, S, Rout, TK, Prusty, AD, et al. Electron Transfer Directed Antibacterial Properties of Graphene Oxide on Metals, Adv. Mater., 30 (2018) 1702149 : 1-10.
[166] Li, J, Wang, G, Zhu, H, et al. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer, Sci Rep, 4 (2015) 4359 : 1-8.
[167] Geng, H, Dai, J, Li, J, et al. Antibacterial ability and hemocompatibility of graphene functionalized germanium, Sci Rep, 6 (2016) 37474.
[168] Cheong, Y-K, Arce, MP, Benito, A, et al. Synergistic Antifungal Study of PEGylated Graphene Oxides and Copper Nanoparticles against Candida albicans, Nanomaterials, 10 (2020) 819 : 1-19.
[169] Deng, C-H, Gong, J-L, Zeng, G-M, et al. Graphene sponge decorated with copper nanoparticles as a novel bactericidal filter for inactivation of Escherichia coli, Chemosphere, 184 (2017) 347–57.
[170] Li, Y, Yang, D, Cui, J. Graphene oxide loaded with copper oxide nanoparticles as an antibacterial agent against Pseudomonas syringae pv. tomato, RSC Adv., 7 (2017) 38853–60.
[171] Chook, S, Chia, C, Zakaria, S, et al. Antibacterial performance of Ag nanoparticles and AgGO nanocomposites prepared via rapid microwave-assisted synthesis method, Nanoscale Res Lett, 7 (2012) 541 : 1-7.
[172] Liu, L, Liu, J, Wang, Y, et al. Facile synthesis of monodispersed silver nanoparticles on graphene oxide sheets with enhanced antibacterial activity, New J. Chem., 35 (2011) 1418–23.
[173] Ma, J, Zhang, J, Xiong, Z, et al. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-modified graphene oxide, J. Mater. Chem., 21 (2011) 3350–2.
[174] Das, MR, Sarma, RK, Saikia, R, et al. Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 83 (2011) 16–22.
[175] Nguyen, VH, Kim, B-K, Jo, Y-L, et al. Preparation and antibacterial activity of silver nanoparticles-decorated graphene composites, The Journal of Supercritical Fluids, 72 (2012) 28–35.

[176] Prodana, M, Ionita, D, Ungureanu, C, et al. Enhancing antibacterial effect of multiwalled carbon nanotubes using silver nanoparticles, Dig J Nanomat Biostruct, 6 (2011) 549–56.
[177] Al Aani, S, Gomez, V, Wright, CJ, et al. Fabrication of antibacterial mixed matrix nanocomposite membranes using hybrid nanostructure of silver coated multi-walled carbon nanotubes, Chemical Engineering Journal, 326 (2017) 721–36.
[178] Kumar, A, Dalal, J, Dahiya, S, et al. In situ decoration of silver nanoparticles on single-walled carbon nanotubes by microwave irradiation for enhanced and durable anti-bacterial finishing on cotton fabric, Ceramics International, 45 (2019) 1011–9.
[179] Niu, A, Han, Y, Wu, J, et al. Synthesis of One-Dimensional Carbon Nanomaterials Wrapped by Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Behavior, J. Phys. Chem. C, 114 (2010) 12728–35.
[180] Oves, M, Rauf, MohdA, Ansari, MO, et al. Graphene Decorated Zinc Oxide and Curcumin to Disinfect the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus, Nanomaterials, 10 (2020) 1004 : 1-17.
[181] Zhong, L, Yun, K-S. Graphene oxide-modified ZnO particles: synthesis, characterization, and antibacterial properties, Int J Nanomedicine, 10 (2015) 79–92.
[182] Sui, M, Zhang, L, Sheng, L, et al. Synthesis of ZnO coated multi-walled carbon nanotubes and their antibacterial activities, Science of The Total Environment, 452 (2013) 148–54.
[183] Kavitha, T, Gopalan, AI, Lee, K-P, et al. Glucose sensing, photocatalytic and antibacterial properties of graphene–ZnO nanoparticle hybrids, Carbon, 50 (2012) 2994–3000.
[184] Chen, H, He, YY, Lin, MH, et al. Characterizations of zinc oxide nanorods incorporating a graphene layer as antibacterial nanocomposites on silicon substrates, Ceramics International, 42 (2016) 3424–8.
[185] Palza, H, Saldias, N, Arriagada, P, et al. Antibacterial Carbon Nanotubes by Impregnation with Copper Nanostructures, JOM, 69 (2017) 1319–24.
[186] Wu, B-S, Abdelhamid, HN, Wu, H-F. Synthesis and antibacterial activities of graphene decorated with stannous dioxide, RSC Advances, 4 (2014) 3708–17.
[187] Mohan, AN, Manoj, B. Surface modified graphene/SnO_2 nanocomposite from carbon black as an efficient disinfectant against Pseudomonas aeruginosa, Materials Chemistry and Physics, 232 (2019) 137–44.
[188] Alsharaeh, E, Mussa, Y, Ahmed, F, et al. Novel route for the preparation of cobalt oxide nanoparticles/reduced graphene oxide nanocomposites and their antibacterial activities, Ceramics International, 42 (2016) 3407–10.
[189] Liu, Y, Fan, W, Xu, Z, et al. Transgenerational effects of reduced graphene oxide modified by Au, Ag, Pd, Fe_3O_4, Co_3O_4 and SnO_2 on two generations of Daphnia magna, Carbon, 122 (2017) 669–79.
[190] Ahmed, B, Ojha, AK, Singh, A, et al. Well-controlled in-situ growth of 2D WO_3 rectangular sheets on reduced graphene oxide with strong photocatalytic and antibacterial properties, Journal of Hazardous Materials, 347 (2018) 266–78.
[191] Fakhri, A, Naji, M. Degradation photocatalysis of tetrodotoxin as a poison by gold doped PdO nanoparticles supported on reduced graphene oxide nanocomposites and evaluation of its antibacterial activity, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 167 (2017) 58–63.
[192] Li, J, Wang, G, Zhu, H, et al. Antibacterial activity of large-area monolayer graphene film manipulated by charge transfer, Sci Rep, 4 (2015) 4359 : 1-8.
[193] Sui, M, Zhang, L, Sheng, L, et al. Synthesis of ZnO coated multi-walled carbon nanotubes and their antibacterial activities, Science of The Total Environment, 452 (2013) 148–54.
[194] Yi, H, Huang, D, Qin, L, et al. Selective prepared carbon nanomaterials for advanced photocatalytic application in environmental pollutant treatment and hydrogen production, Applied Catalysis B: Environmental, 239 (2018) 408–24.
[195] Akhavan, O, Ghaderi, E. Photocatalytic Reduction of Graphene Oxide Nanosheets on TiO_2 Thin Film for Photoinactivation of Bacteria in Solar Light Irradiation, J. Phys. Chem. C, 113 (2009) 20214–20.

[196] Cao, B, Cao, S, Dong, P, et al. High antibacterial activity of ultrafine TiO_2/graphene sheets nanocomposites under visible light irradiation, Materials Letters, 93 (2013) 349–52.
[197] Chang, Y-N, Ou, X-M, Zeng, G-M, et al. Synthesis of magnetic graphene oxide–TiO_2 and their antibacterial properties under solar irradiation, Applied Surface Science, 343 (2015) 1–10.
[198] Wanag, A, Rokicka, P, Kusiak-Nejman, E, et al. Antibacterial properties of TiO_2 modified with reduced graphene oxide, Ecotoxicology and Environmental Safety, 147 (2018) 788–93.
[199] Karimi, L, Yazdanshenas, ME, Khajavi, R, et al. Using graphene/TiO_2 nanocomposite as a new route for preparation of electroconductive, self-cleaning, antibacterial and antifungal cotton fabric without toxicity, Cellulose, 21 (2014) 3813–27.
[200] Léonard, GL-M, Remy, S, Heinrichs, B. Doping TiO_2 films with carbon nanotubes to simultaneously optimise antistatic, photocatalytic and superhydrophilic properties, J Sol-Gel Sci Technol, 79 (2016) 413–25.
[201] Reddy, KR, Gomes, VG, Hassan, M. Carbon functionalized TiO_2 nanofibers for high efficiency photocatalysis, Mater. Res. Express, 1 (2014) 015012 : 1-15.
[202] He, J, Kumar, A, Khan, M, et al. Critical review of photocatalytic disinfection of bacteria: from noble metals- and carbon nanomaterials-TiO2 composites to challenges of water characteristics and strategic solutions, Science of The Total Environment, 758 (2021) 143953.
[203] Akhavan, O, Azimirad, R, Safa, S. Functionalized carbon nanotubes in ZnO thin films for photoinactivation of bacteria, Materials Chemistry and Physics, 130 (2011) 598–602.
[204] Nourmohammadi, A, Rahighi, R, Akhavan, O, et al. Graphene oxide sheets involved in vertically aligned zinc oxide nanowires for visible light photoinactivation of bacteria, Journal of Alloys and Compounds, 612 (2014) 380–5.
[205] Wu, D, An, T, Li, G, et al. Mechanistic study of the visible-light-driven photocatalytic inactivation of bacteria by graphene oxide–zinc oxide composite, Applied Surface Science, 358 (2015) 137–45.
[206] Gao, P, Liu, J, Sun, DD, et al. Graphene oxide–CdS composite with high photocatalytic degradation and disinfection activities under visible light irradiation, Journal of Hazardous Materials, 250 (2013) 412–20.
[207] Deng, C-H, Gong, J-L, Zeng, G-M, et al. Graphene–CdS nanocomposite inactivation performance toward Escherichia coli in the presence of humic acid under visible light irradiation, Chemical Engineering Journal, 284 (2016) 41–53.
[208] Fakhri, A, Kahi, DS. Synthesis and characterization of MnS_2/reduced graphene oxide nanohybrids for with photocatalytic and antibacterial activity, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 166 (2017) 259–63.
[209] Akhavan, O, Choobtashani, M, Ghaderi, E. Protein Degradation and RNA Efflux of Viruses Photocatalyzed by Graphene–Tungsten Oxide Composite Under Visible Light Irradiation, J. Phys. Chem. C, 116 (2012) 9653–9.
[210] Hou, C, Quan, H, Duan, Y, et al. Facile synthesis of water-dispersible Cu_2O nanocrystal–reduced graphene oxide hybrid as a promising cancer therapeutic agent, Nanoscale, 5 (2013) 1227–32.
[211] Liu, L, Liu, J, Sun, DD. Graphene oxide enwrapped Ag_3PO_4 composite: towards a highly efficient and stable visible-light-induced photocatalyst for water purification, Catal. Sci. Technol., 2 (2012) 2525–32.
[212] Sun, L, Du, T, Hu, C, et al. Antibacterial Activity of Graphene Oxide/g-C_3N_4 Composite through Photocatalytic Disinfection under Visible Light, ACS Sustainable Chem. Eng., 5 (2017) 8693–701.
[213] Huang, T, Zhang, L, Chen, H, et al. A cross-linking graphene oxide–polyethyleneimine hybrid film containing ciprofloxacin: one-step preparation, controlled drug release and antibacterial performance, J. Mater. Chem. B, 3 (2015) 1605–11.
[214] Abdelhamid, HN, Khan, MS, Wu, H-F. Graphene oxide as a nanocarrier for gramicidin (GOGD) for high antibacterial performance, RSC Adv., 4 (2014) 50035–46.
[215] Zardini, HZ, Amiri, A, Shanbedi, M, et al. Enhanced antibacterial activity of amino acids-functionalized multi walled carbon nanotubes by a simple method, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 92 (2012) 196–202.

[216] Mishra, RK, Segal, E, Lipovsky, A, et al. New Life for an Old Antibiotic, ACS Appl. Mater. Interfaces, 7 (2015) 7324–33.
[217] Amiri, A, Zardini, HZ, Shanbedi, M, et al. Efficient method for functionalization of carbon nanotubes by lysine and improved antimicrobial activity and water-dispersion, Materials Letters, 72 (2012) 153–6.
[218] Assali, M, Zaid, AN, Abdallah, F, et al. Single-walled carbon nanotubes-ciprofloxacin nanoantibiotic: strategy to improve ciprofloxacin antibacterial activity, IJN, 12 (2017) 6647–59.
[219] Yuan, B, Zhu, T, Zhang, Z, et al. Self-assembly of multilayered functional films based on graphene oxide sheets for controlled release, J. Mater. Chem., 21 (2011) 3471–6.
[220] Iannazzo, D, Pistone, A, Galvagno, S, et al. Synthesis and anti-HIV activity of carboxylated and drug-conjugated multi-walled carbon nanotubes, Carbon, 82 (2015) 548–61.
[221] Ashfaq, M, Verma, N, Khan, S. Copper/zinc bimetal nanoparticles-dispersed carbon nanofibers: A novel potential antibiotic material, Materials Science and Engineering: C, 59 (2016) 938–47.
[222] Ahmad, A, qureshi, AS, Li, L, et al. Antibacterial activity of graphene supported FeAg bimetallic nanocomposites, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 143 (2016) 490–8.
[223] Gao, N, Chen, Y, Jiang, J. Ag@Fe_2O_3-GO Nanocomposites Prepared by a Phase Transfer Method with Long-Term Antibacterial Property, ACS Appl. Mater. Interfaces, 5 (2013) 11307–14.
[224] Perdikaki, A, Galeou, A, Pilatos, G, et al. Ag and Cu Monometallic and Ag/Cu Bimetallic Nanoparticle–Graphene Composites with Enhanced Antibacterial Performance, ACS Appl. Mater. Interfaces, 8 (2016) 27498–510.
[225] Liu, L, Bai, H, Liu, J, et al. Multifunctional graphene oxide-TiO_2-Ag nanocomposites for high performance water disinfection and decontamination under solar irradiation, Journal of Hazardous Materials, 261 (2013) 214–23.
[226] Xu, W, Xie, W, Huang, X, et al. The graphene oxide and chitosan biopolymer loads TiO_2 for antibacterial and preservative research, Food Chemistry, 221 (2017) 267–77.
[227] Yang, X, Qin, J, Jiang, Y, et al. Bifunctional TiO_2/Ag_3PO_4/graphene composites with superior visible light photocatalytic performance and synergistic inactivation of bacteria, RSC Adv., 4 (2014) 18627–36.
[228] Payan, A, Akbar Isari, A, Gholizade, N. Catalytic decomposition of sulfamethazine antibiotic and pharmaceutical wastewater using Cu-TiO_2@functionalized SWCNT ternary porous nanocomposite: Influential factors, mechanism, and pathway studies, Chemical Engineering Journal, 361 (2019) 1121–41.
[229] Marta, B, Potara, M, Iliut, M, et al. Designing chitosan–silver nanoparticles–graphene oxide nanohybrids with enhanced antibacterial activity against Staphylococcus aureus, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 487 (2015) 113–20.
[230] Surudžić, R, Janković, A, Bibić, N, et al. Physico–chemical and mechanical properties and antibacterial activity of silver/poly(vinyl alcohol)/graphene nanocomposites obtained by electrochemical method, Composites Part B: Engineering, 85 (2016) 102–12.
[231] Singh, S, Gundampati, RK, Mitra, K, et al. Enhanced catalytic and antibacterial activities of silver nanoparticles immobilized on poly(N-vinyl pyrrolidone)-grafted graphene oxide, RSC Adv., 5 (2015) 81994–2004.
[232] Manikandan, PN, Imran, H, Dharuman, V. Direct glucose sensing and biocompatible properties of a zinc oxide – multiwalled carbon nanotube–poly(vinyl chloride) ternary composite, Anal. Methods, 8 (2016) 2691–7.
[233] Díez-Pascual, AM. State of the Art in the Antibacterial and Antiviral Applications of Carbon-Based Polymeric Nanocomposites, IJMS, 22 (2021) 10511.
[234] Fatima, N, Qazi, UY, Mansha, A, et al. Recent developments for antimicrobial applications of graphene-based polymeric composites: A review, Journal of Industrial and Engineering Chemistry, (2021) 19.
[235] Srivastava, AK, Dwivedi, N, Dhand, C, et al. Potential of graphene-based materials to combat COVID-19: properties, perspectives, and prospects, Materials Today Chemistry, 18 (2020) 100385.

[236] Ahmed, F, Santos, CM, Mangadlao, J, et al. Antimicrobial PVK:SWNT nanocomposite coated membrane for water purification: Performance and toxicity testing, Water Research, 47 (2013) 3966–75.
[237] Wang, Y, Zhang, P, Liu, CF, et al. A facile and green method to fabricate graphene-based multifunctional hydrogels for miniature-scale water purification, RSC Adv., 3 (2013) 9240–6.
[238] Mahmoudi, N, Ostadhossein, F, Simchi, A. Physicochemical and antibacterial properties of chitosan-polyvinylpyrrolidone films containing self-organized graphene oxide nanolayers, J. Appl. Polym. Sci., 133 (2016) 43194 : 1-8.
[239] Omerović, N, Djisalov, M, Živojević, K, et al. Antimicrobial nanoparticles and biodegradable polymer composites for active food packaging applications, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 20 (2021) 2428–54.
[240] Dreyer, DR, Todd, AD, Bielawski, CW. Harnessing the chemistry of graphene oxide, Chemical Society Reviews, 43 (2014) 5288–301.
[241] Tasis, D, Tagmatarchis, N, Bianco, A, et al. Chemistry of Carbon Nanotubes, Chem. Rev., 106 (2006) 1105–36.
[242] Sanmartín-Santos, I, Gandía-Llop, S, Salesa, B, et al. Enhancement of Antimicrobial Activity of Alginate Films with a Low Amount of Carbon Nanofibers (0.1% w/w), Applied Sciences, 11 (2021) 2311.
[243] Randazzo, W, Fabra, MJ, Falcó, I, et al. Polymers and Biopolymers with Antiviral Activity: Potential Applications for Improving Food Safety: Polymers and biopolymers with antiviral activity…, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17 (2018) 754–68.
[244] Baba, M, Snoeck, R, Pauwels, R, et al. Sulfated polysaccharides are potent and selective inhibitors of various enveloped viruses, including herpes simplex virus, cytomegalovirus, vesicular stomatitis virus, and human immunodeficiency virus, Antimicrob Agents Chemother, 32 (1988) 1742–5.
[245] Kassem, A, Ayoub, GM, Malaeb, L. Antibacterial activity of chitosan nano-composites and carbon nanotubes: A review, Science of The Total Environment, 668 (2019) 566–76.
[246] He, L, Dumée, LF, Feng, C, et al. Promoted water transport across graphene oxide–poly(amide) thin film composite membranes and their antibacterial activity, Desalination, 365 (2015) 126–35.
[247] Cha, C, Shin, SR, Annabi, N, et al. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering, ACS Nano, 7 (2013) 2891–7.
[248] Agarwal, S, Wendorff, JH, Greiner, A. Use of electrospinning technique for biomedical applications, Polymer, 49 (2008) 5603–21.
[249] Lu, B, Li, T, Zhao, H, et al. Graphene-based composite materials beneficial to wound healing, Nanoscale, 4 (2012) 2978–82.
[250] Schiffman, JD, Elimelech, M. Antibacterial Activity of Electrospun Polymer Mats with Incorporated Narrow Diameter Single-Walled Carbon Nanotubes, ACS Appl. Mater. Interfaces, 3 (2011) 462–8.
[251] Lee, E-S, Kim, Y-O, Ha, Y-M, et al. Antimicrobial properties of lignin-decorated thin multi-walled carbon nanotubes in poly(vinyl alcohol) nanocomposites, European Polymer Journal, 105 (2018) 79–84.
[252] Chia, HN, Wu, BM. Recent advances in 3D printing of biomaterials, J. Biol. Eng, 9 (2015) 4 : 1-14.
[253] Sayyar, S. Fabrication of 3D structures from graphene-based biocomposites, J. Mater. Chem. B, 5 (2017) 3462–82.
[254] Hoque, ME, Chuan, YL, Pashby, I. Extrusion based rapid prototyping technique: An advanced platform for tissue engineering scaffold fabrication, Biopolymers, 97 (2012) 83–93.
[255] Cui, H, Yu, Y, Li, X, et al. Direct 3D printing of a tough hydrogel incorporated with carbon nanotubes for bone regeneration, J. Mater. Chem. B, 7 (2019) 7207–17.
[256] Melo, SF, Neves, SC, Pereira, AT, et al. Incorporation of graphene oxide into poly(ε-caprolactone) 3D printed fibrous scaffolds improves their antimicrobial properties, Mater. Sci. Eng. C, 109 (2020) 110537 : 1-21.

[257] Yang, X-N, Xue, D-D, Li, J-Y, et al. Improvement of antimicrobial activity of graphene oxide/bacterial cellulose nanocomposites through the electrostatic modification, Carbohydrate Polymers, 136 (2016) 1152–60.
[258] Krishnamoorthy, K, Jeyasubramanian, K, Premanathan, M, et al. Graphene oxide nanopaint, Carbon, 72 (2014) 328–37.
[259] Chua, CK, Sofer, Z, Khezri, B, et al. Ball-milled sulfur-doped graphene materials contain metallic impurities originating from ball-milling apparatus: their influence on the catalytic properties, Phys. Chem. Chem. Phys., 18 (2016) 17875–80.
[260] Khanna, S, Utsav, Marathey, P, et al. Fabrication of long-ranged close-packed monolayer of silica nanospheres by spin coating, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 553 (2018) 520–7.
[261] Puetz, J, Aegerter, MA. Dip Coating Technique. Sol-Gel Technologies for Glass Producers and Users, vol. 2, Boston, MA, 2004, p. 37–48.
[262] Joo, YT, Jung, KH, Kim, MJ, et al. Preparation of antibacterial PDMAEMA-functionalized multiwalled carbon nanotube via atom transfer radical polymerization, J. Appl. Polym. Sci., 127 (2013) 1508–18.
[263] Wang, M-H, Li, Q, Li, X, et al. Effect of oxygen-containing functional groups in epoxy/reduced graphene oxide composite coatings on corrosion protection and antimicrobial properties, Applied Surface Science, 448 (2018) 351–61.
[264] Khalid, A. Multiwalled carbon nanotubes functionalized bacterial cellulose as an efficient healing material for diabetic wounds, International Journal of Biological Macromolecules, (2022) 12.
[265] Daulbayev, C, Sultanov, F, Korobeinyk, AV, et al. Effect of graphene oxide/hydroxyapatite nanocomposite on osteogenic differentiation and antimicrobial activity, Surfaces and Interfaces, 28 (2022) 101683.
[266] Smith, SC, Rodrigues, DF. Carbon-based nanomaterials for removal of chemical and biological contaminants from water: A review of mechanisms and applications, Carbon, 91 (2015) 122–43.
[267] Gomes, M, Gomes, LC, Teixeira-Santos, R, et al. Carbon nanotube-based surfaces: Effect on the inhibition of single- and dual-species biofilms of Escherichia coli and Enterococcus faecalis, Results in Surfaces and Interfaces, 9 (2022) 100090.
[268] Balakrishnan, A. Polydimethylsiloxane–graphene oxide nanocomposite coatings with improved anti-corrosion and anti-biofouling properties, Environ Sci Pollut Res, (2021) 19.
[269] Karahan, HE, Wiraja, C, Xu, C, et al. Graphene Materials in Antimicrobial Nanomedicine: Current Status and Future Perspectives, Adv. Healthcare Mater., 7 (2018) 1701406 : 1-18.
[270] Zhang, Z-B, Wu, J-J, Su, Y, et al. Layer-by-layer assembly of graphene oxide on polypropylene macroporous membranes via click chemistry to improve antibacterial and antifouling performance, Applied Surface Science, 332 (2015) 300–7.
[271] Aslan, S, Deneufchatel, M, Hashmi, S, et al. Carbon nanotube-based antimicrobial biomaterials formed via layer-by-layer assembly with polypeptides, Journal of Colloid and Interface Science, 388 (2012) 268–73.
[272] Balzarotti, R, Cinzia, C, Francis, LF. Spin coating deposition on complex geometry substrates_ Influence of operative parameters, Surface and Coatings Technology, 330 (2017) 1–9.
[273] Zhang, S, Li, Y, Pan, N. Graphene based supercapacitor fabricated by vacuum filtration deposition, Journal of Power Sources, 206 (2012) 476–82.
[274] Verma, K, Oder, J, Wille, R. Simulating Industrial Electrophoretic Deposition on Distributed Memory Architectures, 27th Euromicro International Conference on Parallel, Distributed and Network-Based Processing (PDP), (2019) 414–21.
[275] Jaworek, A. Micro- and nanoparticle production by electrospraying, Powder Technology, 176 (2007) 18–35.
[276] Zhang, Q, Huang, J-Q, Zhao, M-Q, et al. Carbon Nanotube Mass Production: Principles and Processes, ChemSusChem, 4 (2011) 864–89.

[277] Wang, M-H, Li, Q, Li, X, et al. Effect of oxygen-containing functional groups in epoxy/reduced graphene oxide composite coatings on corrosion protection and antimicrobial properties, Applied Surface Science, 448 (2018) 351–61.
[278] Mottier, A, Mouchet, F, Pinelli, É, et al. Environmental impact of engineered carbon nanoparticles: from releases to effects on the aquatic biota, Current Opinion in Biotechnology, 46 (2017) 1–6.
[279] Jiao, Y, Qian, F, Li, Y, et al. Deciphering the Electron Transport Pathway for Graphene Oxide Reduction by Shewanella oneidensis MR-1, Journal of Bacteriology, 193 (2011) 3662–5.
[280] Yong, Y-C, Yu, Y-Y, Zhang, X, et al. Highly Active Bidirectional Electron Transfer by a Self-Assembled Electroactive Reduced-Graphene-Oxide-Hybridized Biofilm, Angew. Chem. Int. Ed., 53 (2014) 4480–3.
[281] Wang, G, Qian, F, Saltikov, CW, et al. Microbial reduction of graphene oxide by Shewanella, Nano Res., 4 (2011) 563–70.
[282] Salas, EC, Sun, Z, Lüttge, A, et al. Reduction of Graphene Oxide *via* Bacterial Respiration, ACS Nano, 4 (2010) 4852–6.
[283] Hummers Jr, WS, Offeman, RE. Preparation of Graphitic Oxide, J. Am. Chem. Soc, 80 (1958) 1339.
[284] Flahaut, E, Bacsa, R, Peigney, A, et al. Gram-scale CCVD synthesis of double-walled carbon nanotubes, Chem. Commun., (2003) 1442–3.
[285] Bourdiol, F, Mouchet, F, Perrault, A, et al. Biocompatible polymer-assisted dispersion of multi walled carbon nanotubes in water, application to the investigation of their ecotoxicity using Xenopus laevis amphibian larvae, Carbon, 54 (2013) 175–91.
[286] Wolf, MP, Salieb-Beugelaar, GB, Hunziker, P. PDMS with designer functionalities—Properties, modifications strategies, and applications, Progress in Polymer Science, 83 (2018) 97–134.
[287] https://octopart.com/datasheet/sylgard+184%2C+1.1kg-dow+corning-85537171, (n.d.).
[288] Johnston, ID, McCluskey, DK, Tan, CKL, et al. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for microfluidics and microengineering, J. Micromech. Microeng., 24 (2014) 1–8.
[289] Murphy, EC, Dumont, JH, Park, CH, et al. Tailoring properties and processing of Sylgard 184: Curing time, adhesion, and water affinity, J Appl Polym Sci, 137 (2020) 48530.
[290] https://www.ugap.fr/achat-public/plaque-culture-12-puits-tpp-av-couvercle-sterile-unitaire-x-42_2910508.html, (n.d.).
[291] https://www.avantorsciences.com /assetsvc/asset/en_US/id/29202908/contents/en_us_tds_nusimed-4917.pdf, (n.d.).
[292] https://www.avantorsciences.com/nusil/en/product/MED-4917/low-consistency-silicone-elastomer, (n.d.).
[293] Shandong Shengquan New Materials Co. Ltée. SMDP20605, (n.d.).
[294] https://www.securimed.fr/media/cms/files/sefr/SEFR_TDS_1266_std.lang.all.pdf, (n.d.).
[295] Guillet, J-F. Nanotubes de carbone pour la délivrance transdermique électro-stimulée de substances biologiquement actives, Université Paul Sabatier - Toulouse III, (2017) 1–230.
[296] Deng, X, Xiong, F, Li, X, et al. Application of atomic force microscopy in cancer research, J Nanobiotechnol, 16 (2018) 102 : 1-15.
[297] Ibrahima, D. Etude du rôle des pili de Lactococcus lactis dans la structuration d'un biofilm: approche biophysique multi-échelle, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, (2021) 1–221.
[298] Hutter, JL, Bechhoefer, J. Calibration of atomicforce microscope tips, Rev. Sci. Instrum., 64 (1993) 1868–73.
[299] Chopinet, L, Formosa, C, Rols, MP, et al. Imaging living cells surface and quantifying its properties at high resolution using AFM in QI^{TM} mode, Micron, 48 (2013) 26–33.
[300] Friedman, HH, Whitney, JE, Szczesniak, AS. The Texturometer?A New Instrument for Objective Texture Measurement, J Food Science, 28 (1963) 390–6.
[301] Conzatti, G. Biomatériaux pour application chirurgicale: élaboration et fonctionnalisation pour une bioadhésion thermorégulée, Université Paul Sabatier Toulouse III, (2017) 1–279.

[302] Product_Specification-Plaque de culture cellulaire, 12 puits, Fisher scientific 12W F-BTM TC PLT IW 50/CS, (n.d.).
[303] Péricat, D, Leon-Icaza, SA, Sanchez Rico, M, et al. Antiviral and Anti-Inflammatory Activities of Fluoxetine in a SARS-CoV-2 Infection Mouse Model, IJMS, 23 (2022) 13623.
[304] Neu, TR, Van der Mei, HC, Busscher, HJ, et al. Biodeterioration of medical-grade silicone rubber used for voice prostheses: a SEM study, Biomaterials, 14 (1993) 459–64.
[305] Lawrence, EL, Turner, IG. Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK, Medical Engineering & Physics, 27 (2005) 443–53.
[306] Li, M, Neoh, KG, Xu, LQ, et al. Surface Modification of Silicone for Biomedical Applications Requiring Long-Term Antibacterial, Antifouling, and Hemocompatible Properties, Langmuir, 28 (2012) 16408–22.
[307] Weibel, A, Mesguich, D, Chevallier, G, et al. Fast and easy preparation of few-layered-graphene/magnesia powders for strong, hard and electrically conducting composites, Carbon, 136 (2018) 270–9.
[308] Flahaut, E, Agnoli, F, Sloan, J, et al. CCVD Synthesis and Characterization of Cobalt-Encapsulated Nanoparticles, Chem. Mater., 14 (2002) 2553–8.
[309] Bortolamiol, T, Lukanov, P, Galibert, A-M, et al. Double-walled carbon nanotubes: Quantitative purification assessment, balance between purification and degradation and solution filling as an evidence of opening, Carbon, 78 (2014) 79–90.
[310] Khan, F ullah, Mahmood, S, Ahmad, Z, et al. Graphene oxide synthesis by facile method and its characterization, Open J. Chem., 2 (2019) 11–5.
[311] Murphy, EC, Dumont, JH, Park, CH, et al. Tailoring properties and processing of Sylgard 184: Curing time, adhesion, and water affinity, Journal of Applied Polymer Science, (2020) 10.
[312] Hourlier-Fargette, A, Antkowiak, A, Chateauminois, A, et al. Role of uncrosslinked chains in droplets dynamics on silicone elastomers, Soft Matter, 13 (2017) 3484–91.
[313] Eddington, DT, Puccinelli, JP, Beebe, DJ. Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane, Sensors and Actuators B: Chemical, 114 (2006) 170–2.
[314] Krishnamoorthy, K, Veerapandian, M, Yun, K, et al. The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation, Carbon, 53 (2013) 38–49.
[315] Nanda, SS, Yi, DK, Kim, K. Study of antibacterial mechanism of graphene oxide using Raman spectroscopy, Sci Rep, 6 (2016) 28443 : 1-12.
[316] Sengupta, I, Bhattacharya, P, Talukdar, M, et al. Bactericidal effect of graphene oxide and reduced graphene oxide: Influence of shape of bacteria, Colloid and Interface Science Communications, 28 (2019) 60–8.
[317] Jayes, L, Hard, AP, Séné, C, et al. Vibrational Spectroscopic Analysis of Silicones: A Fourier Transform-Raman and Inelastic Neutron Scattering Investigation, Anal. Chem., 75 (2003) 742–6.
[318] Cai, D, Neyer, A, Kuckuk, R, et al. Raman, mid-infrared, near-infrared and ultraviolet–visible spectroscopy of PDMS silicone rubber for characterization of polymer optical waveguide materials, Journal of Molecular Structure, 976 (2010) 274–81.
[319] Krylova, V, Dukštienė, N. Synthesis and Characterization of Ag_2S Layers Formed on Polypropylene, Journal of Chemistry, 2013 (2013) 1–11.
[320] Mirabedini, SM, Rahimi, H, Hamedifar, S, et al. Microwave irradiation of polypropylene surface: a study on wettability and adhesion, International Journal of Adhesion & Adhesives, 24 (2004) 163–70.
[321] Sellin, N, Campos, JSDC. Surface composition analysis of PP films treated by corona discharge, Mat. Res., 6 (2003) 163–6.
[322] Chen, H, Wang, B, Gao, D, et al. Broad-Spectrum Antibacterial Activity of Carbon Nanotubes to Human Gut Bacteria, Small, 9 (2013) 2735–46.
[323] Liu, S, Zeng, TH, Hofmann, M, et al. Antibacterial Activity of Graphite, Graphite Oxide, Graphene Oxide, and Reduced Graphene Oxide: Membrane and Oxidative Stress, ACS Nano, 5 (2011) 6971–80.

[324] Arias, LR, Yang, L. Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions, Langmuir, 25 (2009) 3003–12.
[325] Bykkam, S, Rao, K, Shilpa Chakra, C, et al. Synthesis and characterization of graphene oxide and its antimicrobial activity against Klebseilla and Staphylococus, International Journal of Advanced Biotechnology and Research, 4 (2013) 1005–9.
[326] Liu, S, Wei, L, Hao, L, et al. Sharper and Faster "Nano Darts" Kill More Bacteria: A Study of Antibacterial Activity of Individually Dispersed Pristine Single-Walled Carbon Nanotube, ACS Nano, 3 (2009) 3891–902.
[327] Perreault, F, de Faria, AF, Nejati, S, et al. Antimicrobial Properties of Graphene Oxide Nanosheets: Why Size Matters, ACS Nano, 9 (2015) 7226–36.
[328] Olivi, M, Zanni, E, De Bellis, G, et al. Inhibition of microbial growth by carbon nanotube networks, Nanoscale, 5 (2013) 9023.
[329] Dague, E, Alsteens, D, Latgé, J-P, et al. Chemical Force Microscopy of Single Live Cells, Nano Lett., 7 (2007) 3026–30.
[330] Francois, JM, Formosa, C, Schiavone, M, et al. Use of atomic force microscopy (AFM) to explore cell wall properties and response to stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae, Curr Genet, 59 (2013) 187–96.

Annexes

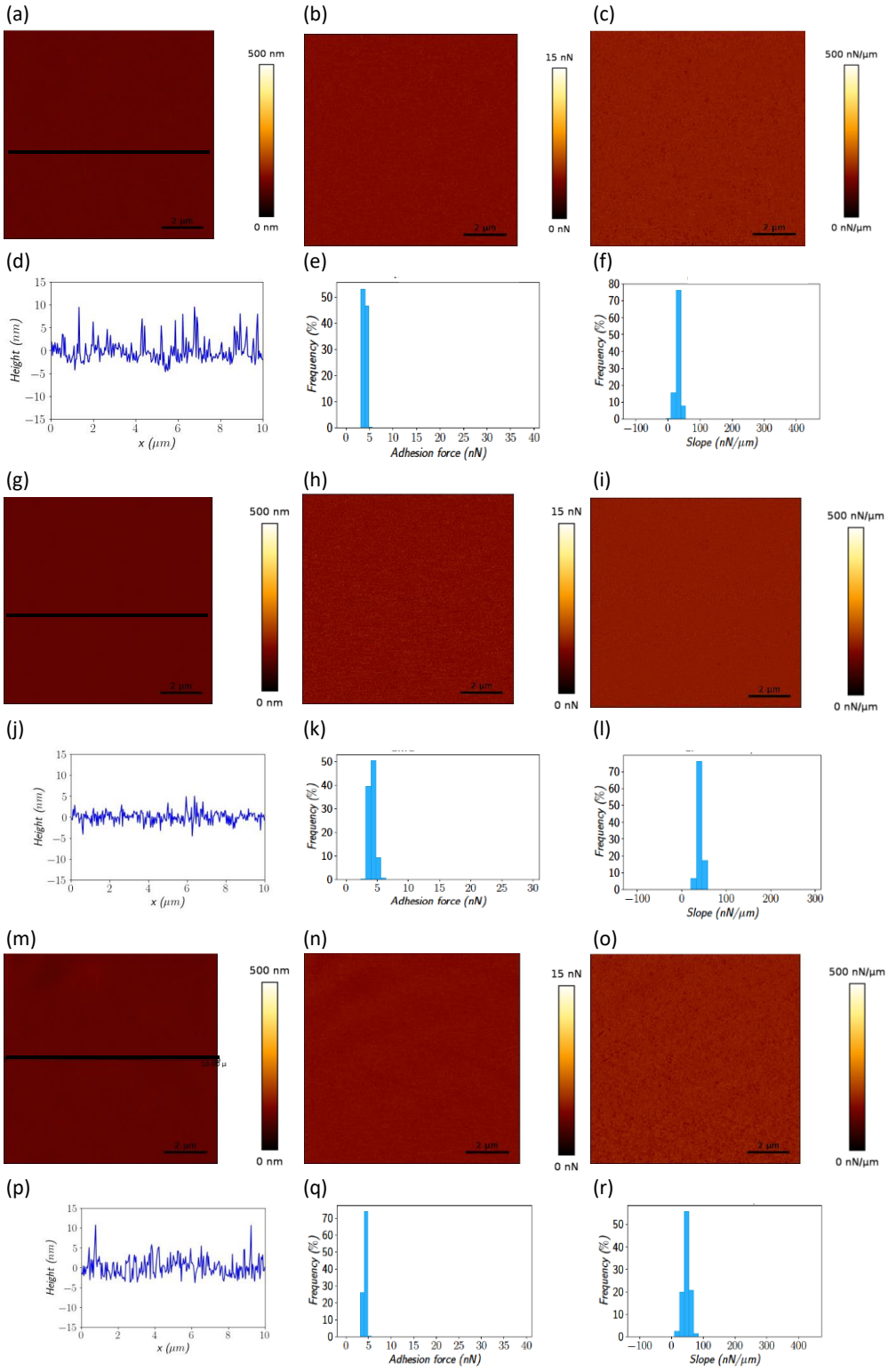


Figure A.1: Cartographies AFM multiparamétriques (topographie, adhésivité et rigidité) des échantillons (a-f) référence silicone ; (e-l) CMC / S184 ; (m-r) CMC / MED ; (a, g, m) cartographie en hauteur ; (b, h, n) cartographie en adhésivité ; (c, l, r) cartographie en pente ; (d, j, p) cross section en hauteur ; (e, k, q) histogramme de répartition des valeurs d'adhésion ; (f, l, r) histogramme de répartition des valeurs de pentes des échantillons.

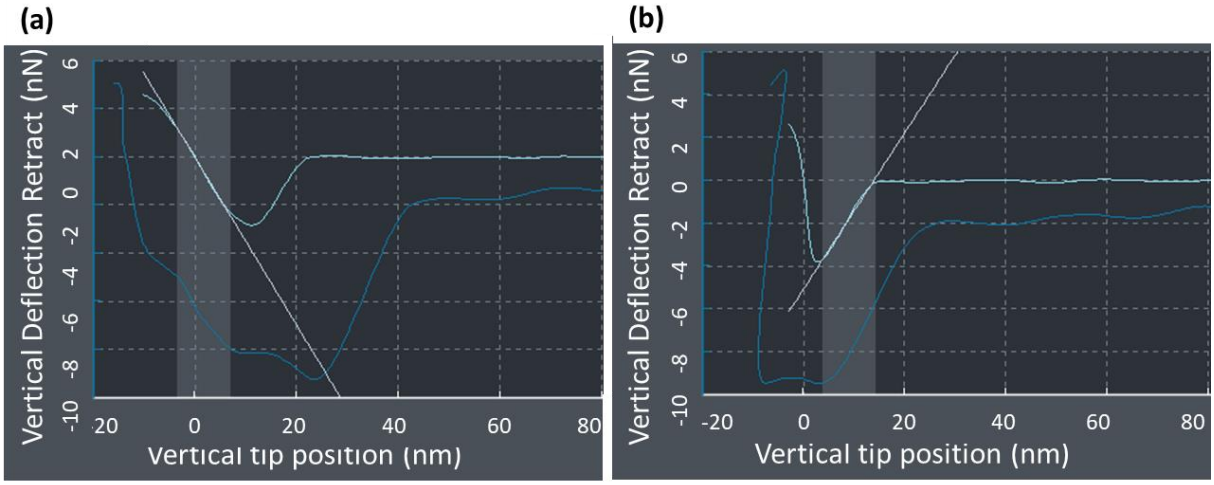


Figure A.2 : Mesure de pente AFM, avec un fit correspondant à une bande gris clair, sur un point silicone (a) et un point nanoparticule de carbone (b)

Abstract

This work focuses on the development of antimicrobial surfaces based on carbon nanomaterials (CNMs). For this work, raw and oxidized double-walled carbon nanotubes (respectively DWNTs B and DWNTs Ox), Few Layer Graphene (FLG) as well as oxidized graphene (GO) have been selected because they are the most mentioned carbon nanoparticles in the literature for their antimicrobial activity. The first part of this work details the elaboration of antimicrobial surfaces by deposition of CNMs on silicone. The samples were elaborated by spray coating method, i.e. the CNMs' suspensions were sprayed with an airbrush on the silicone support. We optimized the deposition parameters aiming at blocking the NMCs at the surface of the silicone (in order to ensure a durable activity over time and to avoid possible toxicity issues related to released CNMs), while allowing the CNMs to be anchored at the surface of the silicone to allow contacts with the surrounding microorganisms. The proof of concept obtained first on a silicone widely used in microelectronics and microfluidics (Sylgard 184) was then extended to a biomedical grade silicone (Nusil, MED-4917).

SEM, AFM and Raman characterizations performed on the deposits on these two silicones clearly show the efficient anchoring of the CNMs at the surface of the material, with a clearly emergent part. However, the limits of the characterization techniques used do not allow to exclude the absence of a thin layer of silicone covering the CNMs on the surface. In the context of the COVID-19 pandemic and in particular of the questions which arose in relation to respiratory masks containing "graphene", we also wished to evaluate the activity of the CNMs in this framework after deposition by the same approach on a commercial FFP1 surgical mask.

The second part of this work details the tests of antimicrobial activity of surfaces prepared by CNMs deposition. Antibacterial activity assay (CFU) was performed on the different CNMs in suspension as well as on the CNMs' deposits on the two silicones investigated, using as models the bacterial strains *P. aeruginosa* (Gram -) and *S. aureus* (Gram +). No CNM in suspension exhibited antibacterial activity while the deposits of GO or DWNTs Ox on both silicones expressed significant activity against *P. aeruginosa* and *S. aureus* strains, respectively. The antiviral activity of the different materials (silicones, respiratory mask) treated by deposition of CNMs, as well as a commercial "graphene" mask, was tested against a SARS-CoV-2 strain using the TCID50 assay. No significant antiviral activity linked to the presence of CNMs could be evidenced.

The work carried out during this thesis has allowed us to propose an elaboration protocol respecting the "safer by design" principle, allowing the anchoring of carbon nanoparticles at the surface of two different silicones, while allowing them to emerge from the polymer, and being able to be applied on several supports. Airbrush deposition also allowed to significantly limit the amount of required CNMs. However, the presence or absence of a thin silicone layer covering the nanoparticles could not be verified. The different results of the antimicrobial assays suggest that the surface oxygen-containing functions, the morphology of the nanoparticles as well as their anchoring on the surface of the substrate all play a key role in the observed antibacterial activity while the antiviral activity does not seem to be significant, at least in the tested conditions.

Résumé

Ces travaux portent sur l'élaboration de surfaces antimicrobiennes à base de nanomatériaux carbonés (NMC). Pour ces travaux des nanotubes de carbone double parois bruts et oxydés (respectivement DWNTs B et DWNTs Ox), du graphène à quelques feuillets (Few Layer Graphene, FLG) ainsi que du graphène oxydé (GO) ont été sélectionnés car ce sont les nanoparticules de carbone les plus mentionnées dans la bibliographie pour leur activité antimicrobienne. La première partie de ces travaux détaille l'élaboration de surfaces antimicrobiennes par dépôt de NMC sur du silicone. Les échantillons ont été élaborés par méthode de *spray coating*, c'est-à-dire que les suspensions de NMC ont été pulvérisées à l'aide d'un aérographe sur le support silicone. Nous avons optimisé les paramètres de dépôt avec pour objectif de bloquer les NMC en surface du silicone (afin d'assurer une activité durable dans le temps et s'affranchir de problèmes éventuels de toxicité liés à des NMC relargués), tout en permettant aux NMC d'affleurer en surface du silicone pour permettre des contacts avec les microorganismes environnants. La preuve de concept obtenue tout d'abord sur silicone très utilisé en microélectronique et en microfluidique (Sylgard 184) a ensuite été étendue à un silicone de grade biomédical (Nusil, MED-4917).

Les caractérisations MEB, AFM et Raman réalisées sur les dépôts sur ces deux silicones mettent bien en évidence l'ancrage efficace des NMC en surface du matériau, avec une partie clairement émergente. Cependant les limites des techniques de caractérisations utilisées ne permettent pas d'exclure l'absence d'une fine couche de silicone recouvrant les NMC en surface. Dans le contexte de la crise sanitaire lié à la COVID-19 et en particulier des questions qui se sont posées par rapport à des masques respiratoires contenant du "graphène", nous avons aussi souhaité évaluer l'activité des NMC dans ce cadre après dépôt par la même approche sur un masque chirurgical commercial de type FFP1.

La deuxième partie de ces travaux concerne les tests d'activité antimicrobienne des surfaces traités par dépôt de NMC. Des tests d'activité antibactérienne (CFU) ont été réalisés sur les différents NMC en suspension ainsi que sur les dépôts de NMC sur les deux silicones étudiés, en utilisant comme modèles les souches bactériennes *P. aeruginosa* (Gram -) et *S. aureus* (Gram +). Aucun NMC en suspension n'a présenté d'activité antibactérienne tandis que les dépôts de GO sur silicone et de DWNTs Ox sur silicone ont exprimé une activité significative contre les souches *P. aeruginosa* et *S. aureus*, respectivement. L'activité antivirale des différents matériaux (silicones, masque respiratoire) traités par dépôt de NMC, ainsi qu'un masque au "graphène" commercial, a été testée contre une souche SARS-CoV-2 selon la méthode TCID50. Aucune activité antivirale significative liée à la présence des NMC n'a pu être mise en évidence dans nos conditions expérimentales.

Les travaux effectués au cours de cette thèse ont permis de proposer un protocole d'élaboration respectant le principe "safer by design", permettant de bloquer des nanoparticules de carbone en surface de silicone tout en leur permettant d'émerger du polymère, et pouvant être appliqué sur plusieurs supports. Le dépôt par aérographe permet aussi de limiter très significativement la quantité nécessaire de NMC. Cependant la présence ou absence d'une fine couche de silicone recouvrant les nanoparticules n'a pas pu être vérifiée. Les différents résultats des tests antimicrobiens suggèrent que les fonctions oxygénées, la morphologie des nanoparticules ainsi que leur ancrage en surface des matériaux jouent un rôle clef dans l'activité antibactérienne mise en évidence.