



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

جامعة حسيبة بن بوعلي – الشلف –

Université Hassiba Ben Bouali de Chlef

كلية العلوم

Faculté des sciences

قسم البيولوجيا

Département de biologie

MEMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue de l'obtention du diplôme de Master académique

Spécialité : Microbiologie

Thème

Contribution à l'étude des propriétés anti-oxydatives et de l'efficacité anticorrosive sur l'acier API 5L X52 d'une prodigiosine d'une souche de *Serratia marcescens*

Soutenue le : 30 mai 2016

Présenté par :

BOUKHATEM Asma
AOUF Rabiaa

Devant le jury composé de :

Mr. SEBAIHIA	Maître de conférences A	Président
Mr. EL HAMEUR	Maître de conférences B	Promoteur
M ^{elle} . FARES	Maître de conférences A	Co-promotrice
Mr. BENDAHA	Maître Assistant A	Examineur
Mr. HUSSEIN AMAR	Maître Assistant A	Examineur

Année universitaire : 2015/2016

Remerciements

Le remerciement infini avant tous est à notre dieu le plus puissant qui nous a comblé des bienfaits de l'islam et de la science.

Nous exprimons nos profonds remerciements à Mademoiselle FARES, Co-promotrice de ce mémoire, pour son aide précieuse, ses encouragements, sa patience et son soutien favorable pour l'aboutissement de ce travail.

Nos vifs remerciements à Monsieur EL HAMEUR, encadreur de ce mémoire, pour le temps qu'il a consacré à nous apporter les outils méthodologiques indispensables à la conduite de ce travail et pour ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter notre réflexion.

Nos remerciements à Monsieur SEBAIHIA notre enseignant respecté qui nous a fait l'honneur d'accepter de présider le jury de soutenance de ce mémoire.

Nos remerciements les plus respectueux à Monsieur BENDAHA pour avoir pris le temps d'examiner ce mémoire.

Nos remerciements les plus respectueux à Monsieur HUSSEIN AMAR qui nous a fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail.

Sans oublier de remercier vivement tous les enseignants de biologie de Chlef qui ont contribué à la formation et l'encadrement dont nous avons bénéficié tout au long de nos études.

Notre reconnaissance va à tous ceux qui nous ont aidés de près ou de loin pour que cet œuvre soit achevé ; qu'ils trouvent ici l'expression de notre gratitude.

BOUKHATEM Asma et AOUF Rabiaa

Dédicaces

Grâce à dieu tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force pour réaliser ce mémoire, que nul ne peut se faire sans son désir.

On dédie ce modeste travail :

A nos très chers parents qui ont tout sacrifié pour nous,

Et nous espérons qu'ils seront toujours fiers de nous,

A toute personne de notre grande famille.

A nos amis et collègues de la promotion de microbiologie 2015/2016

A tous ceux qui ont aimé.

BOUKHATEM Asma et AOUF Rabiaa

Table des matières

Introduction

Chapitre I : Généralités sur la corrosion

I.1.	Introduction.....	03
I.2.	Définition de la corrosion.....	03
I.3.	Processus de la corrosion.....	03
I.3.1.	Corrosion chimique.....	03
I.3.2.	Corrosion électrochimique.....	03
I.3.3.	Corrosion biologique.....	04
I.4.	Facteurs de corrosion.....	04
I.5.	Formes de corrosion des alliages.....	05
I.5.1.	Corrosion généralisée.....	05
A.	Corrosion uniforme.....	05
B.	Corrosion galvanique.....	05
I.5.2.	Corrosion localisée.....	06
A.	Corrosion par piqûres.....	07
B.	Corrosion caverneuse.....	07
C.	Corrosion inter-granulaire.....	07
D.	Corrosion par érosion, abrasion, cavitation.....	07
E.	Corrosion microbienne.....	08
E.1.	Bactéries sulfatoréductrices.....	09
E.2.	Bactéries Mn oxydants (BMO).....	10
E.3.	Bactéries produisant de l'acide (BPA).....	11
I.6.	Conclusion.....	11

Chapitre II : Inhibiteurs de corrosion

II.1.	Introduction.....	12
II.2.	Inhibiteur de corrosion.....	12
II.3.	Classement des inhibiteurs.....	12
II.3.1.	Classement selon la nature chimique des molécules de l'inhibiteur.....	12
A.	Inhibiteurs inorganiques (minéraux).....	12

B. Inhibiteurs organiques.....	13
II.3.2. Classement selon le mécanisme d'action.....	14
A. Mécanisme d'action électrochimique.....	14
A.1. Inhibiteurs anodiques.....	15
A.2. Inhibiteurs cathodiques.....	16
A.3. Inhibiteurs mixtes.....	17
B. Mécanisme d'action inter-facial.....	17
B.1. Adsorption des molécules inhibitrices à la surface métallique.....	17
B.2. Formation d'un film intégrant les produits de dissolution du substrat.....	18
II.4. Bio-inhibiteurs.....	18
II.4.1. Huiles et extraits de plantes.....	18
II.5. Bio-surfactant.....	19
II.5.1. Biosynthèse et rôle physiologique.....	19
II.6. Conclusion	20

Chapitre III : Prodigiosine

III.1. Introduction.....	21
III.2. Définition.....	21
III.3. Structure.....	21
III.4. Microorganismes producteurs.....	22
III.5. Biosynthèse.....	23
III.6. Conditions de l'expression de la prodigiosine.....	24
III.6.1. Facteurs physiologiques.....	24
A. Temps.....	24
B. Température.....	24
C. pH.....	24
III.7. Inhibiteurs de pigments	24
III.8. Applications de la prodigiosine.....	25
III.8.1. Anti bactérien.....	25
III.8.2. Anticancéreux.....	25
III.8.3. Colorant.....	26

III.8.4. Additif à des écrans solaires.....	26
III.9. Conclusion.....	27

Chapitre IV : Matériels et Méthodes

IV.1. Introduction.....	28
IV.2. Matériel biologique.....	28
IV.2.1. Microorganisme.....	28
IV.2.2. Activation de la souche.....	28
IV.3. Matériau utilisé.....	28
IV.4. Méthodes.....	29
IV.4.1. Identification et caractéristiques de la souche de <i>S. marcescens</i>	29
A. Vérification de la pureté de la souche de <i>S. marcescens</i>	29
B. Caractérisation biochimique de la souche de <i>S. marcescens</i>	29
B.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	29
- Test de catalase.....	29
- Test d'oxydase.....	29
B.2. Identification par galerie API 20 E.....	30
IV.4.2. Etude cinétique de croissance et de production des métabolites.....	30
IV.4.3. Extraction des métabolites.....	30
IV.4.4. Techniques analytiques.....	31
A. Mesure du pH.....	31
B. Détermination de la tension de surface.....	31
C. Analyse spectrale.....	31
IV.4.5. Activité antioxydante de la prodigiosine.....	31
A. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	31
B. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	32
C. Test de décoloration du β -carotène.....	33
IV.4.6. Préparation des échantillons de l'acier.....	34
IV.4.7. Traitement de surface pré-expérimental.....	35
IV.4.8. Préparation des solutions.....	36

A. Milieu corrosif.....	36
B. Solutions inhibitrices.....	36
IV.4.9. Tests électrochimiques préliminaires des extraits.....	36
IV.4.10. Caractérisation électrochimique.....	37
A. Suivi du potentiel d'abandon au cours du temps (Chrono- potentiométrie).....	37
B. Méthode de Tafel (Courbes de polarisation).....	38
B.1. Tracé des courbes de polarisations linéaires.....	39
IV.4.11. Paramètres expérimentaux électrochimiques.....	40
IV.5. Conclusion.....	41

Chapitre V : Résultats et Discussions

V.1. Introduction.....	42
V.2. Identification et caractéristiques de la souche de <i>S. marcescens</i>	42
V.2.1. Vérification de la pureté de la souche de <i>S. marcescens</i>	42
V.2.2. Caractérisation biochimique de la souche de <i>S. marcescens</i>	43
A. Mise en évidence des enzymes respiratoires.....	43
A.1. Test de catalase.....	43
A.2. Test d'oxydase.....	43
B. Identification par galerie API 20 E.....	44
V.3. Etude cinétique de croissance et de production des métabolites.....	46
V.4. Activité antioxydante de la prodigiosine.....	48
V.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH.....	49
V.4.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power).....	49
V.4.3. Test de décoloration du β -carotène.....	50
V.5. Tests électrochimiques préliminaires des extraits.....	51
V.6. Optimisation de la concentration de la prodigiosine.....	53
V.6.1. Comportement électrochimique en l'absence d'inhibiteur.....	53
V.6.2. Comportement électrochimique en présence d'inhibiteur.....	56
A. Suivi du potentiel libre.....	56
B. Courbes de polarisation.....	59

V.7. Conclusion.....	63
----------------------	----

Conclusion

Bibliographie

Annexe

Liste des figures

Fig. I.1 : Corrosion généralisée : a) Schématisation de la corrosion généralisée (uniforme), b) Image représentative d'une corrosion généralisée très avancée.....	06
Fig. I.2 : Corrosion localisée : a) Par piqûres, b) Caverneuse, c) Inter-granulaire, d) Par érosion.....	08
Fig. I.3 : Influence des BRS sur l'acier : a) Microscopie à force atomique, image d'un biofilm de BRS sur AISI 316 SS, b) Modèle montrant l'ancrage de surface des cellules BRS.....	10
Fig. II.1 : Illustration du mécanisme d'actionnement de l'inhibiteur organique : agissant par adsorption de l'inhibiteur sur la surface métallique.....	14
Fig. II.2 : Illustration de l'effet des inhibiteurs anodiques inorganiques et leurs mécanisme d'action.....	15
Fig. II.3 : Illustration montre le mécanisme d'actionnement des inhibiteurs cathodiques..	16
Fig. III.1 : Structure de la prodigiosine : a) Structure de la prodigiosine dont le A, B et C représentent les cycles pyrroles, b) Structure 3 dimensionnelle de la prodigiosine.....	22
Fig. III.2 : Structures de prodiginines produites par les actinomycètes (a-f) et la structure de la prodigiosine (g).....	23
Fig. IV.1 : Sens de prélèvement des échantillons.....	35
Fig. IV.2 : Traitement de la surface de l'échantillon : a) Image représentative de l'échantillon préparé, b) Schéma de l'échantillon préparé vue de face et de côté.....	35
Fig. IV.3 : Evolution du potentiel d'abandon en fonction du temps : a) Passivation du métal, b) Attaque continue, c) Attaque suivie de passivation, d) Evolution d'une couche protectrice qui peut se détruire par la suite (d').....	38
Fig. IV.4 : Détermination des paramètres électrochimiques à partir des droites de Tafel.....	39
Fig. IV.5 : Montage potentiostatique pour mesures électrochimiques.....	41
Fig. V.1 : Pureté de la culture de la souche <i>S. marcescens</i> : a) Observation macroscopique des colonies, b) Observation microscopique (X100), c) et d) caractère envahissant (swarming).....	43
Fig. V.2 : Mise en évidence des enzymes respiratoires : a) Test de catalase, b) Test	44

d'oxydase.....	
Fig. V.3 : Caractérisation biochimique de la souche de <i>S. marcescens</i> par galerie API 20 E.....	45
Fig. V.4 : Evolution du pH et de la tension de surface en fonction du temps durant la croissance de <i>S. marcescens</i> à 30°C et agitation à 160 rpm sur milieu LB.....	47
Fig. V.5 : Evolution de la DO 600 et de la production de la prodigiosine en fonction du temps durant la croissance de <i>S. marcescens</i> à 30°C et agitation à 160 rpm sur milieu LB.....	47
Fig. V.6 : Evolution de la concentration en prodigiosine durant la croissance de <i>S. marcescens</i> (spectre d'absorbance moléculaire).....	48
Fig. V.7 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition du surnageant en milieu NaCl à température ambiante (24°C).....	52
Fig. V.8 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition de l'extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à température ambiante (24°C).....	52
Fig. V.9 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 à différentes températures en milieu NaCl.....	54
Fig. V.10 : Courbes Intensité-potentiel de l'acier X52 à différentes températures en milieu NaCl.	55
Fig. V.11 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 sans et avec addition de l'extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à température ambiante (24°C).....	57
Fig. V.12 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 sans et avec addition de l'extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à 50°C.....	58
Fig. V.13 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 sans et avec addition de l'extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à 80°C.	58
Fig. V.14 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition de l'inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à température ambiante (24°C).....	60
Fig. V.15 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition de l'inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à 50°C.	60
Fig. V.16 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition de l'inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à 80°C.	61

Liste des tableaux

Tab. I.1 : Principaux facteurs de corrosion.....	04
Tab. I.2 : Hétérogénéités conduisant à la corrosion localisée.....	06
Tab. I.3 : Conditions des différentes bactéries étudiées en corrosion microbienne.....	09
Tab. I.4 : Caractéristiques de certaines bactéries réductrices de sulfate.....	10
Tab. IV.1 : Composition chimique de l'acier API 5L X52 (% masse).....	28
Tab. IV.2 : Milieu corrosif utilisé sans et avec l'addition de l'inhibiteur avec l'effet de concentrations et de températures.....	36
Tab. V.1 : Caractérisation biochimique de la souche de <i>S. marcescens</i> par galerie API 20 E.....	45
Tab. V.2 : Paramètres électrochimiques et efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier X52 dans (NaCl) avec addition des extraits testés.	53
Tab. V.3 : Valeurs extraites des courbes du potentiel libre.....	54
Tab. V.4 : Valeurs extraites des courbes du Tafel.....	56
Tab. V.5 : Valeurs extraites des courbes du potentiel libre pour l'extrait de la prodigiosine.....	59
Tab. V.6 : Paramètres électrochimiques et efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier X52 dans le milieu NaCl avec et sans addition de différentes concentrations de l'extrait de la prodigiosine.....	62

Liste des abréviations

PNB : Produit National Brut

% : pourcentage

CEFRACOR : Centre Français de l'Anticorrosion

NACE : National Association of Corrosion Engineers

API : American Petroleum Institute

NaCl : Chlorure de Sodium

ISO : International Organization for Standardization

CO₂ : Dioxyde de Carbone

H₂S : Sulfure d'Hydrogène

T. °C : Température en degré Celsius

Fe⁺⁺⁺, Fe³⁺ : Fer ferrique

Fe⁺⁺, Fe²⁺ : Fer ferreux

BRS : Bactéries Réductrices de Sulfate

H₂ : dihydrogène

e⁻ : électron

H⁺ : ion Hydrogène

AISI : American Iron and Steel Institute

SS : Stainless Steel

BMO : Bactéries Mn Oxydants

Mn : Manganèse

Mn²⁺ : Manganèse divalent

MnOOH : Oxyhydroxyde de Manganèse

MnO₂ : Dioxyde de Manganèse

BPA : Bactéries Produisant de l'Acide

XO₄ⁿ⁻ : oxo-anions

Ca²⁺ : Calcium divalent

Zn²⁺ : Zinc divalent

N : Azote

S : Soufre

P : Phosphore

O : Oxygène

Meⁿ⁺ : ion métallique

OH⁻ : ion Hydroxyde

Mg(OH)₂ : Hydroxyde de Magnésium

Zn(OH)₂ : Hydroxyde de Zinc

Ni(OH)₂ : Hydroxyde de Nickel (II)

ADN : Acide Désoxyribonucléique

SPF : Sun Protection Factor

LB : Luria Bertani

H₂O₂ : Peroxyde d'Hydrogène

OX : Oxydase

Rpm : Revolutions Per Minute

HCl : Acide Chlorhydrique

DPPH : 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl

I% : pourcentage d'inhibition

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice de 50 %

EC₅₀ : Efficient concentration 50

FRAP : Ferric Reducing Antioxidant Power

K₃Fe(CN)₆ : Ferricyanure de Potassium

FeCl₃ : Chlorure de Fer (III)

UV-VIS : Ultraviolet-Visible

β : Béta

BHT : Hydroxytoluène Butylé

OCP : Open Circuit Potentiel

E : potentiel

I_{corr} : Vitesse Instantanée de Corrosion

E_{corr} : Potentiel de Corrosion

ECS : Electrode au Calomel Saturée

ET : Electrode de Travail

CE : Contre Electrode

ER : Electrode de Référence

KCl : Chlorure de Potassium

Hg₂/Hg : Calomel

VP : Voges Proskauer

N₂ : Di-Azote

NO₂ : Dioxyde d'Azote

DPPH-H : 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine

E% : Efficacité

TS : Tension de Surface

Si : Silicium

Cr : Chrome

Ni : Nickel

Mo : Molybdène

S : Soufre

Cu : Cuivre

Ti : Thallium

Nb : Niobium

Al : Aluminium

Liste des annexes

Annexe I : Appareillage

Annexe II : Produits chimiques

Annexe III : Milieux de culture

Annexe IV : Compositions des milieux de culture

Annexe V : Préparation du tampon phosphate

Annexe VI : Evolution des cultures de la souche de *Serratia marcescens* en fonction de la durée d'incubation

Annexe VII : Chaine électrochimique

Annexe VIII : Courbes d'étalonnages

Introduction

La corrosion est la détérioration d'un matériau par une attaque ou une réaction chimique avec son environnement. Elle est généralement liée aux problèmes d'exploitation et de maintenance des équipements. C'est un phénomène souvent difficile à éviter. La plupart des conceptions des systèmes industriels incluent l'effet de la corrosion sur la durée de vie des équipements. La corrosion affecte la plupart des secteurs industriels et ces nuisances sont chiffrées à des milliards de dollars chaque année (Kenniche, 2014).

Elle n'est pas seulement à l'origine du gaspillage de matières premières, mais peut aussi entraîner des pertes économiques et humaines majeures et des tragédies écologiques irrémédiables. Ceci présente un enjeu économique considérable estimé entre 1 et 4 % du produit national brut (PNB) des pays industrialisés. Ainsi par exemple, le Centre Français de l'Anticorrosion, CEFRACOR évalue en France, chaque année à 28 milliards d'euros les pertes économiques générés par la corrosion. Aux Etats-Unis, un rapport publié par la NACE (National Association of Corrosion Engineers) en 2002, évalue les coûts directs de la corrosion c'est-à-dire les coûts engendrés par les dégâts directs tels que le remplacement de tuyaux et les services de maintenance des installations,... etc à 276 milliards de dollars américains par an, soit 3,1% du PNB du pays (Mehanna, 2009).

Flemming *et al.* en 1996 estiment que 20% des problèmes de corrosion sont liés à la présence de microorganismes. En Grande-Bretagne, l'évaluation a atteint même 50% des dégâts engendrés par la corrosion. La biocorrosion ; induite par les microorganismes, est responsable de 75% de la corrosion dans l'industrie pétrolière et de 50% des dégâts causés dans les pipelines et les conduits souterrains. Ces problèmes présentent également un lourd fardeau dans les pays en développement notamment en Algérie et surtout dans le secteur pétrolier et marin.

En termes de protection, Il existe plusieurs méthodes disponibles pour protéger les matériaux (et surtout les métaux) de la corrosion dans les milieux agressifs, comme l'utilisation d'une barrière de protection, la galvanisation, la protection cathodique, l'utilisation des solutions antirouille ou des inhibiteurs de corrosion. L'utilisation des inhibiteurs pour empêcher le processus de dissolution des métaux reste une application inévitable et très répandue, elle constitue un moyen pratique et économique pour lutter contre la corrosion.

Les inhibiteurs de corrosion sont des substances qui, lorsqu'elles sont ajoutées à de faibles concentrations dans des milieux corrosifs, diminuent ou empêchent la réaction du métal avec son environnement. La plupart des inhibiteurs commerciaux sont des composés synthétiques qui présentent une bonne action anticorrosion, mais la majorité d'entre eux sont hautement toxiques pour les êtres vivants et l'environnement (Kenniche, 2014).

Certaines substances d'origines végétales (huiles et extraits) présentent un effet inhibiteur puissant mais leur utilisation continue participe à l'épuisement des ressources végétales. Actuellement les inhibiteurs d'origine microbienne sont considérés de plus en plus comme une source d'inhibiteurs de corrosion stratégique (inépuisable), peuvent remplacer les inhibiteurs verts utilisés actuellement, de production et d'utilisation facile. Ils sont disponibles tout au long de l'année à moindre cout et sont biodégradables.

Le but de ce travail est d'évaluer l'activité antioxydante de la prodigiosine (métabolite secondaire biosynthétisé par une souche locale de *Serratia marcescens* isolée d'un aliment fermenté traditionnel Algérien) et de tester son effet inhibiteur, vis-à-vis de la corrosion de l'acier API 5L X52 (American Petroleum Institut) dans une solution de chlorure de sodium (NaCl).

I.1. Introduction

La première partie de ce chapitre présente d'abord, une vision sur les différents facteurs favorisant la corrosion de l'acier. Puis, une synthèse des différentes formes de la corrosion de l'acier en s'étalant sur la corrosion par effet biologique.

I.2. Définition de la corrosion

Selon la norme ISO 8044 (1999), la définition officielle de la corrosion, est la suivante : « interaction physico-chimique entre un métal et son milieu environnant entraînant des modifications dans les propriétés du métal et souvent une dégradation fonctionnelle du métal lui-même, de son environnement ou du système technique constitué par les deux facteurs ».

La corrosion est, donc, la destruction chimique ou électrochimique des matériaux métalliques par leur environnement. C'est, en fait, le phénomène suivant le quel les métaux ont tendance à revenir à leur état naturel d'oxyde, sulfate, carbonate... plus stable par rapport au milieu corrosif, et ainsi à subir une dégradation de leurs propriétés.

La corrosion peut être sèche (dans l'air) ou humide (dans l'eau). Notre étude porte en particulier sur la corrosion humide, dont il existe plusieurs formes : uniforme ou localisée.

I.3. Processus de la corrosion

La corrosion peut se développer suivant différents processus qui définissent chacun un type de corrosion.

I.3.1. Corrosion chimique

Elle est la conséquence d'une réaction hétérogène entre une phase solide et une phase liquide. Elle ne fait pas intervenir le passage d'un courant électrique. Il est très difficile d'en donner des exemples car elle est le plus souvent accompagnée de corrosion électrochimique (Daufin et Talbot, 1971).

I.3.2. Corrosion électrochimique

Elle se produit lorsqu'il existe des hétérogénéités, soit dans le métal, soit dans la solution corrosive. Ces hétérogénéités déterminent la formation à la surface du métal de

micro-anodes et de micro-cathodes qui constituent des micro-piles. Un courant électrique circule entre les électrodes (Deng et *al.*, 2013).

Les zones appelées anodes sont attaquées et les zones appelées cathodes sont le siège d'une ou de plusieurs réactions de réduction.

I.3.3. Corrosion biologique

Elle correspond à l'attaque directe ou indirecte des métaux par des microorganismes. Ceux-ci peuvent produire des composés, tel que le dioxyde de carbone, l'anhydride sulfureux ou des acides organiques qui attaquent le métal. Certaines bactéries comme *Desulfovibrio desulfuricans* réduisent les sulfates en soufre, et le sulfure de fer peut se former. L'attaque bactérienne apparaît en particulier dans les canalisations enterrées, les structures immergées et les pipelines pétroliers (Usher et *al.*, 2014).

I.4. Facteurs de corrosion

La résistance à la corrosion d'un matériau n'est pas une propriété intrinsèque. Elle dépend à la fois des caractéristiques du matériau et de celles du milieu. En plus de ces facteurs, les conditions d'emploi et la durée d'exploitation ont un rôle prépondérant sur les phénomènes de corrosion. Le tableau I.1 résume les principaux facteurs de corrosion.

Tab. I.1 : Principaux facteurs de corrosion (Babouri, 2008).

Facteurs relatifs au milieu et définissant le mode d'attaque	<ul style="list-style-type: none"> - Concentration du réactif ; - Teneur en oxygène, en impuretés, en gaz dissous (CO₂, H₂S) ; - Acidité (pH) du milieu, salinité, température, pression ; - Présence de bactéries.
Facteurs métallurgiques	<ul style="list-style-type: none"> - Composition de l'alliage, hétérogénéités cristallines ; - Impuretés dans l'alliage, inclusions ; - Traitements thermiques, mécaniques ; - Additions protectrices.
Facteurs définissant les conditions d'emploi	<ul style="list-style-type: none"> - Etat de surface, défaut de fabrication ; - Emploi d'inhibiteurs ; - Croûtes d'oxydes superficielles ; - Force électromotrice extérieure (électrolyse).
Facteurs dépendant du temps	<ul style="list-style-type: none"> - Vieillessement ; - Température ; - Modalité d'accès de l'oxygène ou autres gaz dissous ; - Apparition d'un dépôt (calciq ou autre).

I.5. Formes de corrosion des alliages

Lors d'une attaque d'un métal par un milieu agressif : la morphologie de la surface de ce métal peut prendre des formes diverses, qui résultent de la répartition des zones anodiques et cathodiques à l'interface métal-électrolyte et éventuellement de l'interaction d'autres phénomènes (biologiques, mécaniques) (Crolet, 2002).

I.5.1. Corrosion généralisée

La corrosion peut se produire sur toute la surface du matériau de manière uniforme. On parle alors de corrosion généralisée. L'attaque peut être très fortement ralentie lorsque des films d'oxyde protecteurs se développent à la surface du matériau, état que l'on qualifie de passivité (Crolet, 2002). La corrosion généralisée se divise en deux formes : la corrosion uniforme et la corrosion galvanique.

A. Corrosion uniforme

Elle se caractérise par une perte régulière, uniforme de métal depuis sa surface. C'est la forme de corrosion la plus courante. Le processus est initié par une interaction avec l'environnement, conduisant à des formations d'hydroxydes métalliques et de composés organométalliques. Elle ne fait intervenir qu'un métal. La surface entière du métal sert à l'oxydation et à la réduction : il n'y a pas de distinction entre les zones anodiques et les zones cathodiques (Rochaix, 1996) (Figure I.1). D'après Eliades (2002), il faut que cette corrosion soit très avancée avant qu'elle ne devienne visible : elle paraît donc difficile à détecter.

B. Corrosion galvanique

Lorsque deux ou plusieurs métaux ou alliages différents et proches en distance sont exposés aux fluides, la différence entre leurs potentiels de corrosion provoque un courant électronique entre eux (notion de couplage). En général, il y a oxydation, c'est à dire corrosion, de l'alliage le moins noble (qui devient l'anode), et réduction de l'alliage le plus noble (qui devient la cathode). Il est à noter que la différence de potentiel indique le sens de la réaction. Cependant, le rapport des surfaces a un rôle : plus l'anode aura une surface réduite, plus la réaction de corrosion et donc de dissolution, sera importante (Redon, 2012).

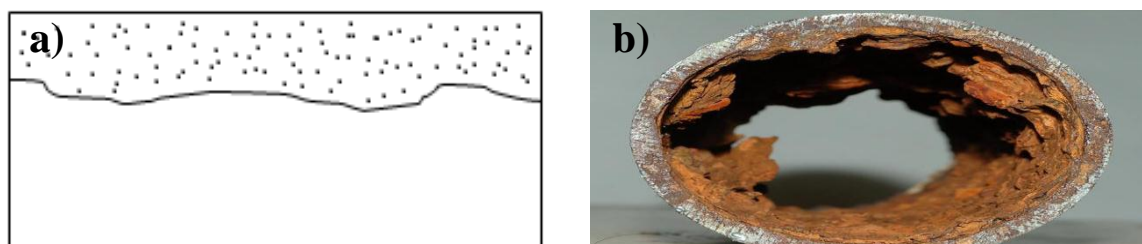


Fig. I.1 : Corrosion généralisée : a) Schématisation de la corrosion généralisée (uniforme), b) Image représentative d'une corrosion généralisée très avancée (Fontana et Greene, 1978).

I.5.2. Corrosion localisée

Les matériaux à l'état passif peuvent alors être sujets à des attaques de corrosion localisée. Cette corrosion localisée n'affecte en général qu'une très faible part de la surface du matériau, le reste demeurant à l'état passif, c'est-à-dire pratiquement pas attaqué (Crolet, 2002). Cette attaque peut prendre différentes formes (corrosion par piqûres, corrosion inter-granulaire, corrosion caverneuse...) (Béranger et Mazille, 2002) selon les mécanismes qui sont à son origine, mais est toujours liée à des hétérogénéités (tableau. I.2). La corrosion localisée comprend les formes suivantes :

Tab. I.2 : Hétérogénéités conduisant à la corrosion localisée (Babouri, 2008).

Hétérogénéités dans le métal ou à sa surface	Site anodique du matériau
Discontinuités dans les films ou couches d'oxyde ou dans des revêtements cathodiques/ métal	Zones exposées du métal au niveau des défauts de films passifs et revêtements cathodiques poreux
Crevasses, dépôts ou configurations géométriques induisant des différences de concentrations en espèce réductible	En général, sites au contact du milieu le moins riche en espèce réductible
Métaux différents en contact (corrosion bimétallique)	Métal le plus actif (potentiel le moins noble) dans le milieu considéré
Hétérogénéités de l'environnement	Site anodique du matériau
Différences dans l'aération ou dans la concentration des espèces réductibles	Surface du métal au contact du milieu le moins riche
Différences de température	Métal au contact du milieu le plus chaud
Différences de pH ou de concentration saline	Métal au contact du milieu le plus acide ou le plus concentré en sel

A. Corrosion par piqûres

Les piqûres se forment à la surface du métal (figure I.2.a). La corrosion par piqûres survient souvent sur les métaux de base qui sont protégés contre la corrosion généralisée par la formation d'un mince film d'oxyde. En présence d'ions chlorures, le film se rompt, et le métal sous-jacent subit une dissolution importante (Redon, 2012).

B. Corrosion caverneuse

Elle siège entre deux surfaces fermées ou dans des zones très étroites où l'échange d'oxygène est impossible, avec des solutions stagnantes (figure I.2.b). En premier lieu, il y a une diminution du pH. Puis, la couche passive de l'alliage se dissout et le processus de corrosion s'accélère (Redon, 2012).

C. Corrosion inter-granulaire

Parfois les joints de grains sont le siège d'une corrosion localisée très importante (figure I.2.c). Ceci est dû soit à la présence d'impuretés dans le joint, soit à l'enrichissement ou à l'appauvrissement local de l'un des constituants (Redon, 2012).

D. Corrosion par érosion, abrasion, cavitation

Cette corrosion est produite par le mouvement relatif d'un fluide corrosif et d'une surface métallique. On a apparition de sillons, vallées, surfaces ondulées, trous... ayant un aspect directionnel caractérisé (queue de comète, sabot d'un cheval...) (figure I.2.d) (Redon, 2012).

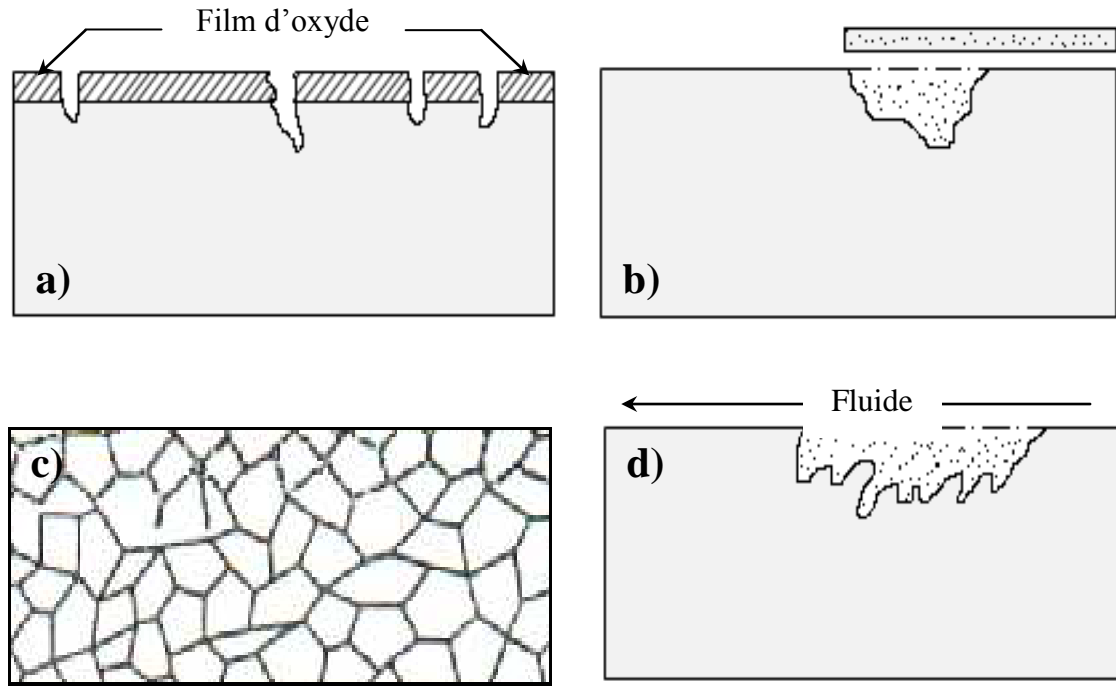


Fig. I.2 : Corrosion localisée : a) Par piqûres, b) Caverneuse, c) Inter-granulaire, d) Par érosion (Fontana et Greene, 1978).

E. Corrosion microbienne

La corrosion microbienne est la conséquence d'interactions qui se manifestent entre des microorganismes et les matériaux sur lesquels ils se sont fixés. Les microorganismes peuvent être soit à l'origine d'une corrosion primaire, soit être des facteurs aggravants pour une corrosion préexistante.

Bien que la nature électrochimique de la corrosion reste valable pour la corrosion microbienne, la participation des microorganismes dans le procédé induit plusieurs caractéristiques uniques, notamment la modification de l'interface métal/solution par formation d'un biofilm. Les biofilms affectent l'interaction entre les surfaces métalliques et de l'environnement, non seulement dans les processus de bio-détérioration comme la corrosion, mais aussi dans plusieurs procédés biotechnologiques appliqués à la récupération et à la manutention de matériaux (Videla, 2003).

Dans la nature, la vitesse de la corrosion d'origine microbienne n'est pas influencée par le type de microorganisme, ni limitée à son mécanisme. Mais elle est due à l'action synergique du nombre différents de groupes bactériens qui partagent un environnement

commun. Les bactéries les mieux étudiées dans ce phénomène, sont les bactéries anaérobies, comprenant les bactéries sulfatoréductrices (*Thiobacillus*), les bactéries productrices d'acide (*Clostridium*), ainsi que les bactéries aérobies, des champignons et des bactéries oxydants le manganèse et le fer (*Gallionella*, *Shewanella*, *Geobacter*) (Lin et Ballim, 2012). Le tableau I.3 regroupe certaines conditions physico-chimiques des bactéries étudiées en corrosion microbienne.

Tab I.3 : Conditions des différentes bactéries étudiées en corrosion microbienne
(Natarajan, 2014).

Organisme	pH	T. °C	Oxygène	Action	Métaux touchés
<i>Gallionella</i>	7-10	20-40	Aérobie	Oxyde le Fe et le manganèse	Fer et acier
<i>Pseudomonas</i>	4-9	20-40	Aérobie	Certaines souches peuvent réduire Fe ⁺⁺⁺ en Fe ⁺⁺	Fer et acier
<i>Cladosporium resinae</i> (champignons)	3-7	10-45	Aérobie	Produit des acides organiques	Les alliages d'aluminium

E.1. Bactéries sulfatoréductrices

Les bactéries réductrices de sulfate (BRS) appartiennent au groupe *Deltaproteobacteria* (voir caractéristiques tableau I.4) et comprennent des espèces telles que *Desulfovibrio* et *Desulfotomaculum*. Les BRS sont les bactéries les plus connues et étudiées impliquées dans la biocorrosion des alliages de cuivre, alliages de nickel, fonte, aciers au carbone, les aciers inoxydables et aciers faiblement alliés. Elles ont été fréquemment trouvées dans des installations telles que le transport, le stockage et les installations de production du pétrole et du gaz et sont la cause la plus probable de la corrosion et des problèmes tels que l'acidification et le biosalissure (biofouling) dans ces domaines (Lin et Ballim, 2012).

Les BRS sont capables d'oxyder la matière organique et d'utiliser le sulfite, le lactate ou tétrathionate comme accepteur terminal d'électrons. Le produit final principal de leur métabolisme est la production de sulfures, qui s'accumulent à la surface du métal et acidifient l'environnement, et catalysent le processus de corrosion. Cependant les BRS, ne sont pas le seul groupe de bactéries capables de produire du sulfure, ni la seule cause de la corrosion (Lin et Ballim, 2012).

Tab. I.4 : Caractéristiques de certaines bactéries réductrices de sulfate (Natarajan, 2014).

BRS	Caractéristiques
<i>Desulfovibrio</i>	Flagelle unique. Ne forme pas des spores. Pourvue d'une déshydrogénase, pH 4-8. 10-400°C, anaérobie
<i>Desulfotomaculum</i>	Flagelle péritriche, anaérobie, pH 6-8

Le mécanisme étudié en ce qui concerne les BRS qui induit la biocorrosion implique le transfert d'électrons à partir de la surface du métal à la voie de la réduction de sulfate à l'aide d'un atome d'hydrogène intermédiaire, ce qui nécessite l'utilisation des enzymes appelées hydrogénases (figure I.3) (Lin et Ballim, 2012).

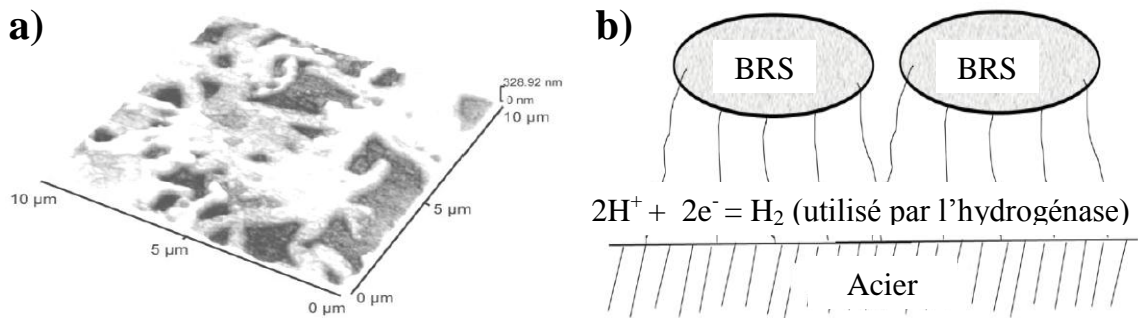


Fig. I.3 : Influence des BRS sur l'acier : a) Microscopie à force atomique, image d'un biofilm de BRS sur AISI 316 SS (Videla et Herrera, 2005), b) Modèle montrant l'ancrage de surface des cellules BRS (Natarajan, 2014).

E.2. Bactéries Mn oxydants (BMO)

On connaît tous que les microorganismes oxydants le manganèse sont les bactéries aérobies qui forment des oxydes de manganèse au sein de l'enveloppe cellulaire ou extracellulaire. De nombreuses études ont établi une relation entre le dépôt d'oxydes / hydroxydes de manganèse et la corrosion des aciers inoxydables dans les eaux naturelles. Le dépôt de ces accumulations de manganèse a été attribué à la présence de bactéries chimiolithotrophes Mn oxydant, comme *Leptothrix* et *Siderocapsa* (Lin et Ballim, 2012).

Les manganèses divalents (Mn^{2+}) sont oxydés en oxyhydroxyde de manganèse ($MnOOH$), puis oxydés en dioxyde de manganèse (MnO_2), qui est également déposé sur la surface métallique.

E.3. Bactéries produisant de l'acide (BPA)

Les bactéries produisant de l'acide sont un groupe de bactéries hétérotrophes qui sont capables de produire des produits métaboliques de l'acide organique lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions environnementales réductrices. Les acides sont produits pendant la fermentation de matières organiques pour provoquer une baisse du pH de neutre à des valeurs de pH de 3,5. Ces conditions acides sont assez agressives pour affecter l'intégrité de tous les matériaux métalliques, provoquant la corrosion. Les BPA se trouvent normalement à l'intérieur de biofilms, tubercules, nodules ou des incrustations dans des conditions réductrices et se trouvent généralement à l'interface de la biomasse métallique. Il est largement reconnu que des bactéries productrices d'acide sont, en fait, un facteur important de la corrosion due à une dépolarisation rapide de la cathode (Lin et Ballim, 2012).

Klebsiella oxytoca a été détectée dans les pipelines de diesel. Elle est connue de produire de l'acide nitrique et les nitrates peuvent jouer un rôle dans la biocorrosion (Lin et Ballim, 2012).

I.6. Conclusion

Tout ce qui nous entoure est susceptible de se détériorer. Lorsque la détérioration irréversible d'un métal a lieu par réaction chimique ou électrochimique avec son environnement, il s'agit de corrosion, pouvant être de différentes formes : uniforme ou localisée. Les propriétés des matériaux sont alors altérées.

En matière de protection contre la corrosion, il est possible d'agir sur le matériau lui-même, sur la surface du matériau ou sur l'environnement avec lequel le matériau est en contact par des inhibiteurs de corrosion.

Résumé

La plupart des inhibiteurs commerciaux sont des composés synthétiques toxiques et trop chers. Les inhibiteurs d'origine microbienne sont devenus une source d'inhibiteurs, écologiques qui garantissent une efficacité élevée à un prix moins cher. Ils sont considérés de plus en plus comme une source d'inhibiteurs de corrosion stratégique (inépuisable), qui peuvent remplacer les inhibiteurs verts utilisés actuellement, de production et d'utilisation facile. Ils sont disponibles tout au long de l'année à moindre cout et sont biodégradables. Dans ce contexte, ce travail évalue l'activité antioxydante et test l'effet inhibiteur de la prodigiosine synthétisée par une souche de *Serratia marcescens*. L'efficacité inhibitrice est vérifiée par les techniques électrochimiques.

Mots-clés: Acier API 5L X52, Prodigiosine, Corrosion, Inhibiteur, *Serratia marcescens*, activité antioxydante.

Abstract

Most commercial inhibitors are synthetic compounds, toxic and too expensive. Microbial inhibitors have become a source of environmental inhibitors, which ensure high efficiency at a cheaper price. They are regarded as a strategic source of corrosion inhibitors (inexhaustible) that can replace the green inhibitors currently used, easy to use and to produce. They are available throughout the year at a lower cost and are biodegradable. In this context, this work, evaluates the antioxidant activity and test the inhibitory effect of the prodigiosine synthesized by a strain of *Serratia marcescens*. The inhibitory efficiency is checked by electrochemical techniques.

Keywords: API 5L X52 steel, Prodigiosin, Corrosion, Inhibitor, *Serratia marcescens*, antioxidant activity.

ملخص

معظم المثبطات التجارية عبارة عن مركبات اصطناعية سامة ومكلفة للغاية. في حين أصبحت المثبطات الميكروبية مصدرا ايكولوجيا ذو كفاءة عالية و بسعر أرخص. حيث أصبح ينظر لها بشكل متزايد كمصدر استراتيجي لمثبطات التآكل (لا تنضب) يمكن أن تحل محل المثبطات الخضراء المستخدمة حاليا، فهي سهلة الاستخدام و الإنتاج و متوفرة على مدار السنة بتكلفة أقل وقابلة للتحلل. و في هذا السياق، مشروعنا يتضمن تقييم النشاط المضاد للأكسدة للبروديجيوزين المنتج من طرف سلالة من (*Serratia marcescens*). و يتم اختبار فعالية المثبط عن طريق التقنيات الكهروكيميائية.

المفتاح : فولاذ، بروديجيوزين، تآكل، مثبط، *Serratia marcescens*، نشاط مضاد للأكسدة.

II.1. Introduction

Les processus de corrosion sont responsables de nombreuses pertes, principalement dans le champ d'application industrielle. Il est clair que la meilleure façon de combattre ce problème est la prévention. Parmi les différentes méthodes permettant d'éviter ou de prévenir la destruction et la dégradation de la surface du métal, l'inhibiteur de corrosion est l'une des meilleures méthodes de protection connue contre la corrosion et les plus utiles dans l'industrie (Dariva et Galio, 2014).

Dans ce chapitre, les inhibiteurs de corrosion sont classifiés. Puis les huiles, les extraits de plantes et les bio-surfactants sont présentés aussi comme bio-inhibiteur de corrosion.

II.2. Inhibiteur de corrosion

Selon la norme internationale ISO 8044 (1999) et la National Association of Corrosion Engineers (NACE International, 2007), un inhibiteur de corrosion est un composé chimique qui, ajouté à faible concentration au milieu corrosif, ralentit ou stoppe le processus de corrosion d'un métal placé au contact de ce milieu.

II.3. Classement des inhibiteurs

Les inhibiteurs de corrosion peuvent être des produits chimiques synthétiques ou naturels et pourraient être classés par la nature chimique organique ou inorganique, le mécanisme d'action en tant qu'anodique, cathodique ou un mélange anodique-cathodique et par adsorption. En général, les inhibiteurs inorganiques ont des actions cathodiques ou anodiques. Les inhibiteurs organiques ont à la fois des actions, cathodiques et anodiques (adsorption) (Dariva et Galio, 2014).

II.3.1. Classement selon la nature chimique des molécules de l'inhibiteur

Sous ce classement, on regroupe les inhibiteurs inorganiques et organiques.

A. Inhibiteurs inorganiques (minéraux)

Les molécules inorganiques sont utilisées le plus souvent en milieu proche de la neutralité ou en milieu alcalin, et plus rarement en milieu acide. Les produits se dissocient en solution et ce sont leurs produits de dissociation qui assurent les phénomènes d'inhibition (anions ou cations).

Les principaux anions inhibiteurs sont les oxo-anions de type XO_4^{n-} tels les chromates, molybdates, phosphates, silicates... etc. Les cations sont essentiellement Ca^{2+} et Zn^{2+} et ceux qui forment des sels insolubles avec certains anions tels que l'hydroxyle OH^- . Le nombre de molécules en usage à l'heure actuelle va en se restreignant, car la plupart des produits efficaces présentent un côté néfaste pour l'environnement (Kenniche, 2014).

B. Inhibiteurs organiques

Les inhibiteurs organiques sont des composés organiques utilisés comme inhibiteurs, ils agissent comme cathodiques, anodiques ou un ensemble, en tant qu'inhibiteurs cathodiques et anodiques, en règle générale, ils agissent par un processus d'adsorption de surface, désignée comme une filmogène. Naturellement, la présence de molécules présentant une forte affinité pour les composés des surfaces métalliques montrant une bonne efficacité d'inhibition et un faible risque pour l'environnement. Ces inhibiteurs produisent un film protecteur hydrophobe qui adsorbe des molécules sur la surface métallique, ce qui fournit une barrière à la dissolution du métal dans l'électrolyte (figure II.1). Ils doivent être solubles ou dispersibles dans le milieu environnant le métal (Dariva et Galio, 2014).

Les molécules organiques sont promises à un développement plus que certain en termes d'inhibiteur de corrosion : leur utilisation est actuellement préférée à celle d'inhibiteurs inorganiques pour des raisons d'écotoxicité essentiellement. Les inhibiteurs organiques sont généralement constitués de sous-produits de l'industrie pétrolière (Fiaud et *al.*, 2002). Ils possèdent au moins un centre actif (les atomes N, S, P, O) susceptible d'échanger des électrons avec le métal, tel l'azote, l'oxygène, le phosphore ou le soufre.

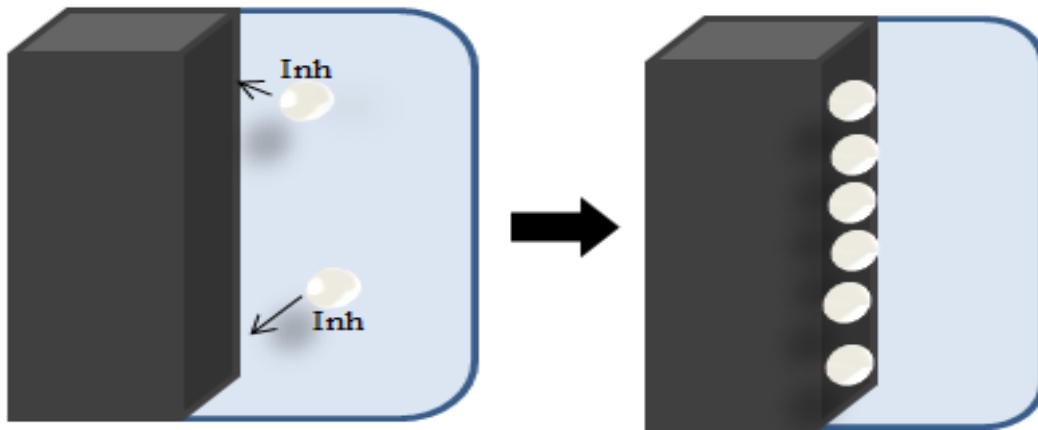


Fig. II.1 : Illustration du mécanisme d'actionnement de l'inhibiteur organique : agissant par adsorption de l'inhibiteur sur la surface métallique (Dariva et Galio, 2014).

II.3.2. Classement selon le mécanisme d'action

Le mécanisme d'action d'un inhibiteur peut être considéré sous deux aspects : un aspect mécanistique ou électrochimique (intervention dans les processus fondamentaux de la corrosion) et un aspect morphologique (intervention dans la structure inter-faciale) (Ichchou, 2011).

A. Mécanisme d'action électrochimique

La corrosion étant un processus essentiellement électrochimique, l'action de l'inhibiteur ne peut se faire qu'au niveau d'une des étapes des réactions élémentaires (transport d'espèces en solution, formation d'intermédiaires superficiels, adsorption des espèces à la surface des phases solides, transfert de charges électroniques). L'intervention de l'inhibiteur dans le processus de transport des espèces électro-actives (dioxygène, proton, produits de réaction) au sein de la solution étant peu probable, le mécanisme d'action d'un inhibiteur est donc le plus souvent à rechercher au voisinage immédiat de la surface métallique (Fiaud, 1990).

On distingue alors (Riggs, 1973): les inhibiteurs anodiques, cathodiques ou mixtes (regroupant alors les deux premières propriétés). L'inhibiteur de corrosion forme une couche barrière sur la surface métallique, qui modifie les réactions électrochimiques en bloquant soit les sites anodiques (siège de l'oxydation du métal), soit les sites cathodiques (siège de la réduction de l'oxygène en milieu neutre aéré ou siège de la réduction du proton H^+ en milieu acide).

A.1. Inhibiteurs anodiques

Les inhibiteurs anodiques (ou de passivation) augmentent la polarisation anodique ce qui déplace le potentiel de corrosion du matériau dans les plus positives afin de l'amener à une valeur pour laquelle il y a formation d'un film passif protecteur du matériau. Ces inhibiteurs agissent par une réaction de réduction anodique, qui bloque la réaction à l'anode et soutient la réaction naturelle de passivation de surface métallique. En général, les inhibiteurs réagissent avec le produit de corrosion, initialement formé, résultant en un film cohésif et insoluble sur la surface du métal (Dariva et Galio, 2014).

Les inhibiteurs anodiques réagissent avec les ions métalliques Me^{n+} produites sur l'anode, formant généralement, les hydroxydes insolubles qui se déposent sur la surface du métal en tant que film insoluble et imperméable à l'ion métallique. L'hydrolyse des inhibiteurs se traduit par les ions OH^- (Figure II.2) (Dariva et Galio, 2014).

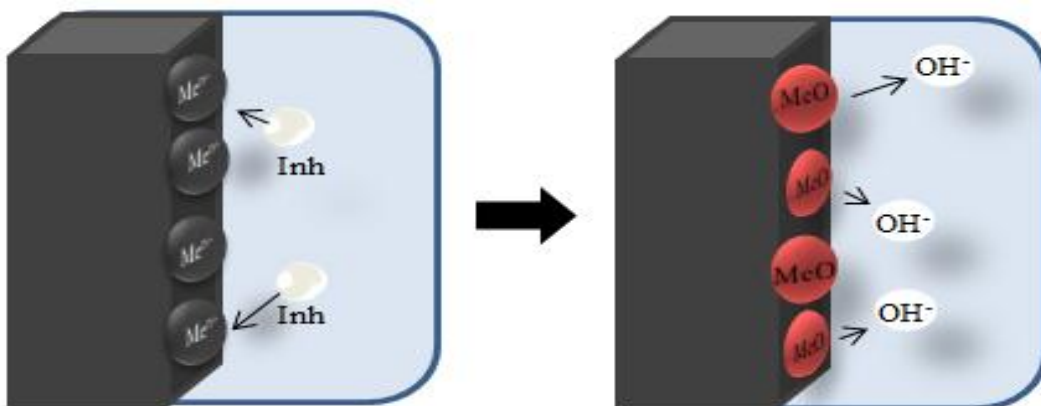


Fig. II.2 : Illustration de l'effet des inhibiteurs anodiques inorganiques et leurs mécanisme d'action (Dariva et Galio, 2014).

Les inhibiteurs anodiques doivent être utilisés avec précaution. En effet, si le film protecteur est altéré par une rayure ou par une dissolution, ou si la quantité d'inhibiteur est insuffisante pour restaurer le film, la partie exposée se corrode par piqûre profonde. En matière de corrosion localisée, la corrosion par piqûre est une forme particulièrement insidieuse : l'attaque se limite à des trous, très localisés et pouvant progresser très rapidement en profondeur tout en conservant le reste de la surface indemne.

Certains exemples d'inhibiteurs inorganiques anodiques sont les nitrates, les molybdates, les chromates de sodium, les phosphates, les hydroxydes et les sulfates (Dariva et Galio, 2014).

A.2. Inhibiteurs cathodiques

Pendant le processus de la corrosion, les inhibiteurs cathodiques de corrosion prévient l'apparition de la réaction cathodique du métal. Ces inhibiteurs ont des ions métalliques capables de produire une réaction cathodique en raison de l'alcalinité, produisant ainsi des composés insolubles qui précipitent sélectivement sur les sites cathodiques (figure II.3). Déposer sur le métal, un film compact et adhérent, limitant le contact métallique avec l'environnement, même si le métal est complètement immergé, ce qui empêche l'apparition de la réaction de corrosion. Pour cette raison, l'inhibiteur cathodique est indépendant de la concentration, par conséquent, il est beaucoup plus sûr que l'inhibiteur anodique (Dariva et Galio, 2014).

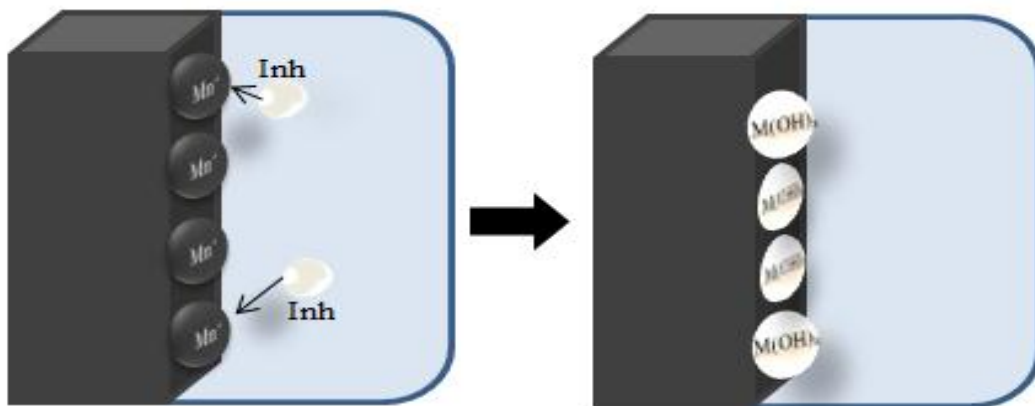


Fig. II.3 : Illustration montre le mécanisme d'actionnement des inhibiteurs cathodiques (Dariva et Galio, 2014).

Certains exemples d'inhibiteurs inorganiques cathodiques sont les ions du magnésium, du zinc, du nickel et qui réagissent avec l'hydroxyle (OH^-) de l'eau, formant des hydroxydes insolubles tel que $\text{Mg}(\text{OH})_2$, $\text{Zn}(\text{OH})_2$, $\text{Ni}(\text{OH})_2$ qui sont déposés sur le site cathodique de la surface métallique, afin de le protéger. On peut également cités des poly-phosphates, des phosphonates, des tanins et des lignines (Dariva et Galio, 2014).

A.3. Inhibiteurs mixtes

Ces inhibiteurs diminuent la vitesse des réactions anodiques et cathodiques et par conséquent la vitesse de corrosion par augmentation de la résistance de la solution suite à la formation d'un film à la surface du métal. Le déplacement de potentiel de corrosion lié par le sens de la formation de ce film, s'il est déposé à la surface cathodique, le potentiel de corrosion se déplace vers des valeurs négatives ou bien le cas contraire, le potentiel de corrosion se déplace vers des valeurs positives. Les inhibiteurs mixtes diminuent la vitesse des deux réactions partielles mais modifient peu le potentiel de corrosion (Madora, 2011).

B. Mécanisme d'action inter-facial d'inhibition

Ce mode de classement des inhibiteurs, les différencie à partir de leur mode de fixation sur la surface métallique : Les inhibiteurs d'adsorption ou "d'interface" et les inhibiteurs dits "d'interphase" (Lorbeer et Lorenz, 1980). Pour cela, le mécanisme d'inhibition est très complexe et n'a pas pu être expliqué par aucune théorie unique. A présent, il en existe quelques-unes qui expliqueraient l'action des inhibiteurs. On distingue l'inhibition par :

B.1. Adsorption des molécules inhibitrices à la surface métallique

L'adsorption est un phénomène de surface universel car toute surface est constituée d'atomes n'ayant pas toutes leurs liaisons chimiques satisfaites. Cette surface a, donc, tendance à combler ce manque en captant atomes et molécules se trouvant à proximité. Deux types d'adsorption peuvent être distingués : la physisorption (formation de liaisons faibles) et la chimisorption.

La première, encore appelée adsorption physique conserve l'identité aux molécules adsorbées.

La chimisorption, au contraire, consiste en la mise en commun d'électrons entre la partie polaire de la molécule et la surface métallique, ce qui engendre la formation de liaisons chimiques bien plus stables car basées sur des énergies de liaison plus importantes. Les électrons proviennent en grande majorité des doublés non appariés des molécules inhibitrices tels que O, N, S, P, ... etc. (tous ces atomes se distinguant des autres de par leur grande électronégativité). L'adsorption chimique s'accompagne d'une profonde

modification de la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées. La chimisorption est souvent un mécanisme irréversible (Bommersbach, 2005).

B.2. Formation d'un film intégrant les produits de dissolution du substrat

Cette forme d'inhibition, appelée également inhibition « d'interphase » traduit la formation d'un film tridimensionnel entre le substrat corrodé et les molécules d'inhibiteur (Bommersbach, 2005).

Les inhibiteurs d'interphase ne se contentent ainsi pas d'être adsorbés aux interfaces métal/oxyde et oxyde/électrolyte, mais sont également incorporés dans les couches barrières (en formant des complexes par exemple) ; ainsi ces molécules inhibitrices d'interphase conduisent à des réseaux homogènes et denses présentant de fait une faible porosité et une bonne stabilité.

II.4. Bio-inhibiteurs

La plupart des composés synthétiques présentent une bonne action anticorrosion, mais la plupart d'entre eux sont hautement toxiques pour les êtres humains et l'environnement. Ces inhibiteurs peuvent causer des dommages temporaires ou permanents au système d'organes tels que les reins ou le foie, ou de perturber le système enzymatique dans le corps. Par conséquent, en raison des préoccupations environnementales, les bio-inhibiteurs sont considérés de plus en plus comme une source d'inhibiteurs de corrosion. Ils sont utilisés pour la protection de métaux dans l'environnement acide, afin de remplacer les produits chimiques toxiques utilisés actuellement (Abiola et Tobun, 2010).

II.4.1. Huiles et extraits de plantes

Les huiles et les extraits sont obtenus des différentes parties d'une plante : des feuilles, des graines, des écorces, des racines ou d'autres structures spéciales. Leur composition est complexe, puisqu'elle est constituée d'un mélange de composés qui appartiennent aux différentes classes de la chimie organique, telle que les phénols, les hydrocarbures, les alcools, les aldéhydes, les cétones, ... etc.

Jusqu'à aujourd'hui, plusieurs extraits de plantes ont été utilisés comme inhibiteur de corrosion pour différents types de métaux en milieu acide chlorhydrique. Toutefois,

c'est l'acier et ces alliages qui ont retenu le plus l'attention des chercheurs à cause de leur large utilisation dans l'industrie (Benmessaoud Left et *al.*, 2013).

II.5. Bio-surfactants

Les bio-surfactants sont des agents à activité de surface (bio-tensioactifs), synthétisés par voie biologique. Ces molécules de haute énergie se répartissent à l'interface entre liquides non miscibles réduisant ainsi l'énergie libre du système (Mulligan et *al.*, 2001) et formant des microémulsions, des solutions aqueuses ou des mélanges d'hydrocarbures.

Ils sont des molécules amphiphiles constituées d'une partie hydrophile polaire et d'une partie hydrophobe non polaire. Généralement, le groupement hydrophile est constitué d'acides aminés, peptides ou de polysaccharides (mono ou di) ; le groupement hydrophobe est constitué d'acides gras saturés ou non saturés (Desai et Banat, 1997).

La portion hydrophile de la molécule permet de distinguer quatre types chimiques de bio-surfactants: les cationiques qui possèdent une charge positive ; les anioniques, agents de surface possédant un ou plusieurs groupes fonctionnels s'ionisant en solution aqueuse pour donner des ions chargés négativement ; les non ioniques, sans charge et les amphotères (zwitterioniques) qui possèdent deux groupements hydrophiles différents: l'un anionique et l'autre cationique. Selon le pH de la solution, ils peuvent agir en tant qu'espèce anionique, cationique ou neutre (West et Harwell, 1992). La portion hydrophobe, quant à elle, influe sur la chimie du bio-surfactant par son aromaticité, son nombre de carbones ou son degré de ramification.

II.5.1. Biosynthèse et rôle physiologique

Les microorganismes synthétisent les bio-surfactants qui sont soit des molécules intracellulaires, extracellulaires ou localisées à la surface de la cellule (Prabhu et Phale, 2003) pour faciliter la diffusion des hydrocarbures ou leurs dérivés à l'intérieur de la cellule bactérienne à fin de les dégrader (Al-Araji et *al.*, 2007).

Les bio-surfactants peuvent avoir d'autres rôles aussi importants que l'émulsification, par exemple : l'adhésion aux surfaces solides et la formation de biofilms (Alasan d'*Acinetobacter*), l'activité bactéricide (gramicidine, polymexine, surfactine), la

pathogénicité de certaines bactéries (rhamnolipides de *Pseudomonas*), ainsi que le piégeage des métaux lourds (Vandecasteele, 2008).

II.6. Conclusion

Les molécules inhibitrices peuvent agir suivant différents mécanismes, leur conférant ainsi des performances d'inhibition en fonction du milieu d'étude.

Dans le chapitre qui suit la présentation de la prodigiosine et ses différents domaines d'application illustrent l'intérêt de cette molécule et justifie notre choix d'être le bio-inhibiteur étudié.

III.1. Introduction

Des produits naturels sont synthétisés ou sécrétés par des organismes. L'un de ces produits sont des composés de faible poids moléculaire qui n'ont aucune fonction démontrée dans les cellules et connus sous le nom de métabolite secondaire. Ils ont un effet majeur sur la santé, la nutrition et l'économie de notre société. Il y a plusieurs organismes qui peuvent produire des pigments, qui sont l'une des classes importantes de ces métabolites secondaires et sont souvent appelés bio-pigments (Chandni et *al.*, 2012).

Ces pigments biologiques peuvent être obtenus à partir de deux sources principales, les plantes et des microorganismes. Les bio-pigments des microorganismes ont été préférés par rapport à ceux des plantes en raison de leur stabilité et la disponibilité tout au long de l'année. D'autre part, les bio-pigments de plantes présentent de nombreux inconvénients tels que l'instabilité vis-à-vis de la lumière et de la chaleur. L'un de ces bio-pigments d'origine microbienne est la prodigiosine (Chandni et *al.*, 2012).

Ce chapitre représente la prodigiosine en tant que molécule d'intérêt et ses applications dans plusieurs domaines.

III.2. Définition

Les prodigiosines sont une famille de pigments rouges naturels (prodiginines) ayant un faible poids moléculaire (323,4 Dalton), apparaissant seulement dans les derniers stades de la croissance bactérienne. La prodigiosine ($C_{20}H_{25}N_3O$) est produit par de nombreuses souches de *S. marcescens* où il a été montré associer avec des vésicules extracellulaires ou présents dans des granules intracellulaires (Chandni et *al.*, 2012).

III.3. Structure

Le groupe de la prodigiosine appartient à la famille des tripyrroles contenant un cycle 4-méthoxy, 2-2 bipyrrrole. Sa biosynthèse est un processus en deux étapes dans lequel le mono et précurseurs bipyrrrole sont synthétisés comme deux entités distinctes dans un premier temps et ensuite assemblés pour former la prodigiosine du produit final (figure III.1) (Bharmal et *al.*, 2012).

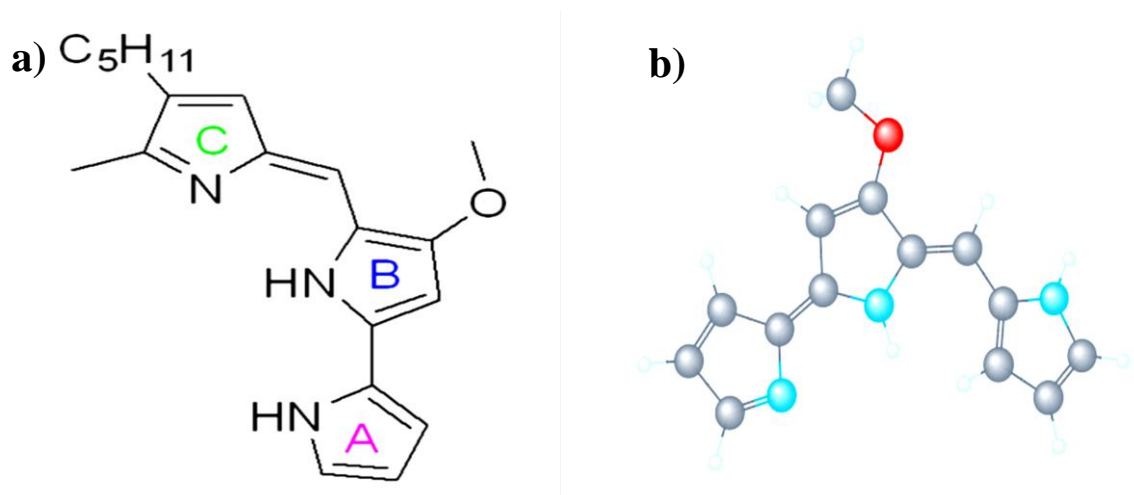


Fig. III.1 : Structure de la prodigiosine : a) Structure de la prodigiosine dont le A, B et C représentent les cycles pyrroles, b) Structure 3 dimensionnelle de la prodigiosine (PubChem, 2007).

III.4. Microorganismes producteurs

La prodigiosine est un métabolite secondaire multidimensionnel. Elle est produite par *S. marcescens*, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra* et certains actinomycètes Gram positif, tels que *Streptoverticillium rubr-reticuli* et *Streptomyces longisporus*.

Les prodiginines des actinomycètes comprennent des tripyrroles undecylprodiginine 1 linéaires, plusieurs isomères et dérivés (Figure III.2). Les antibiotiques anti-tumoraux isolé à partir de *Streptomyces sp* peuvent également être considérés comme des membres de la famille de prodiginine (Khanafari et al., 2006).

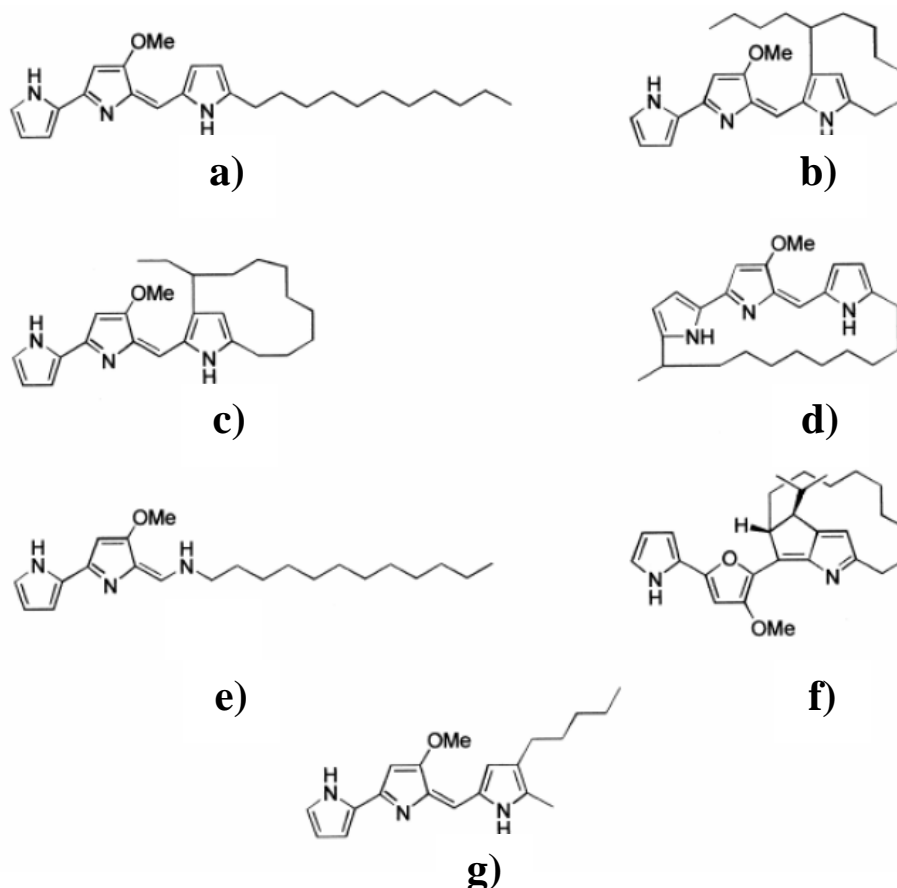


Fig. III.2 : Structures de prodiginines produites par les actinomycètes (a-f) et la structure de la prodigiosine (g) (Khanafari *et al.*, 2006).

III.5. Biosynthèse

La croissance des bactéries et la biosynthèse du pigment se produit en deux phases distinctes. Bullock *et al.* (1965) ont appelé ces deux phases ;

- La trophophase (phase nourriture), pour la période de croissance cellulaire ;
- L'idiophase (phase individuelle), pour la période pendant laquelle les métabolites secondaires spécifiques propres aux bactéries sont produits.

Les deux phases sont clairement séparées pendant la production de la prodigiosine par *S. marcescens*. Étant donné que la cinétique de croissance des souches pigmentées et non pigmentées de *S. marcescens* sont identiques, la prodigiosine n'a pas de fonction métabolique connue (Williams, 1973).

III.6. Conditions de l'expression de la prodigiosine

Les composantes nutritionnelles dans les milieux de croissance, ainsi que les paramètres physiques et biochimiques sont extrêmement importants pour une production efficace de la prodigiosine. On distingue :

III.6.1. Facteurs physiologiques

A. Temps

Des études montrent que la production effective de la prodigiosine est produite après 48 heures d'incubation et a été achevée au bout de 72 heures. La production du pigment est très variable selon les espèces et dépend de nombreux facteurs tels que le temps d'incubation. Le temps d'incubation le plus efficace est de 72 heures (Darshan et Manonmani, 2015).

B. Température

Selon Hardjito et *al.* (2002), la production de biomasse de *S. marcescens* n'a pas montré de changement important entre les températures de 25 et 37°C, cependant, ils ont trouvé que le rendement optimal du pigment est à 30°C. À cette température, la production du pigment est supérieure à celle de 25°C. Tao et *al.* (2005) ont montré que la production du pigment était optimale à 28°C. La production est considérablement réduite à des températures supérieures à 37°C.

C. pH

Le pH est un facteur physiologique très important pour la production de pigments microbiens parce que beaucoup de pigments naturels sont insolubles dans l'eau et montrent des changements selon le pH (Darshan et Manonmani, 2015).

Des études montrent que la souche *S. marcescens* ne pousse pas à un pH de 4,0, mais croît à un pH de 5,0 à 11,0. Le pigment a été produit à des valeurs de pH de 5,0 à 9,0. À pH inférieur, le pigment a été produit à 18 heures, alors qu'à pH 7,0-9,0, sa production a eu lieu à 12 heures (Darshan et Manonmani, 2015).

III.7. Inhibiteurs de pigments

Selon Hejazi et Falkiner (1997), la lumière visible (2000 lux) peut influencer la pigmentation sans modifier les caractéristiques de la croissance de la culture. La teneur en

prodigiosine maximale dans les cultures sombres et claires a été observée à 3-4 et 2-3 jours, respectivement.

Giri *et al.* (2004) ont rapporté que l'addition de maltose à un bouillon nutritif améliore la production de pigments deux fois à 28°C et 30°C. Le bouillon nutritif avec du glucose a montré une augmentation de deux fois à 28°C. La production du pigment était plus élevée dans un bouillon de graines de sésame, même sans l'ajout de sucres, en comparaison avec le bouillon de graines de sésame avec du glucose ou du maltose.

III.8. Applications de la prodigiosine

La prodigiosine a récemment reçu une grande attention pour sa large gamme d'activités biologiques, y compris les activités comme antipaludéen, antifongique, antibiotique. Elle a des propriétés anticancéreuses, anti-métastatiques et est mieux connue pour sa capacité à déclencher l'apoptose des cellules cancéreuses malignes. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de ces capacités ne sont pas pleinement élucidés (Darshan et Manonmani, 2015).

III.8.1. Anti bactérien

L'activité antibactérienne de la prodigiosine est plus élevée contre les bactéries Gram positif, y compris *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus avium* et *Streptococcus pyogenes* par rapport aux bactéries à Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus mirabilis* et *Klebsiella pneumoniae*.

L'activité antibactérienne de la prodigiosine est le résultat de sa capacité à traverser la membrane externe et d'inhiber des enzymes cibles, telles que l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, bloquant ainsi la croissance cellulaire (Darshan et Manonmani, 2015).

La prodigiosine a récemment été trouvée efficace à l'encontre de *Borrelia burgdorferi*, agent causal de la maladie de Lyme (Feng *et al.*, 2015).

III.8.2. Anticancéreux

L'apoptose est impliquée dans l'action de plusieurs agents chimio-thérapeutiques anticancéreux. Au cours des dernières années, la sélection de nouveaux médicaments

associés à l'apoptose qui seraient censés être efficaces contre les tumeurs à forte prolifération, comme les leucémies et les lymphomes a été introduite dans le dépistage de nouveaux médicaments anticancéreux (Montaner et *al.*, 2000).

La prodigiosine de *S. marcescens* libérée dans le milieu de culture induit l'apoptose dans les lignées de cellules cancéreuses hématopoïétiques. Par ailleurs, la prodigiosine est également présente dans d'autres lignées de cellules cancéreuses d'origine gastro-intestinale. Cela indique qu'elle pourrait avoir un potentiel en tant qu'un nouveau candidat antinéoplasique (Montaner et *al.*, 2000).

Bien que les cibles moléculaires de la prodigiosine ne sont pas clairement définis, ils ont été trouvés pour cibler différentes voies de signalisation par induction de cassures de l'ADN double brins et/ou par neutralisation des gradients de pH conduisant à des changements dans le cycle cellulaire (Pandey et *al.*, 2009).

III.8.3. Colorant

La plupart des colorants synthétiques sont dépendants de sources pétrochimiques, et certains colorants synthétiques contiennent des amines toxiques et cancérigènes qui sont nocifs pour l'environnement. D'autre part, la plupart des colorants naturels proviennent de plantes, d'animaux, de microorganismes et des minéraux sont généralement renouvelables et respectueux de l'environnement. A ce titre, la prodigiosine a des activités biologiques qui correspondent aux tendances récentes dans le développement de textiles bioactifs et des tissus avec des pigments rouges. Ajouté à cela, elle offre une grande disponibilité commerciale en raison de sa facilité de production (Jong Suk et *al.*, 2011).

III.8.4. Additif à des écrans solaires

La prodigiosine présente des activités antioxydantes capables d'augmenter le SPF (Sun Protection Factor) des écrans solaires commerciaux pour la protection de la peau humaine. Ces pigments ont un potentiel comme ingrédients pour une nouvelle gamme de produits et, en effet, représentent un nouveau model pour les écrans solaires qui utilisent des substances d'origine biologique (Suryawanshi et *al.*, 2015).

III.9. Conclusion

Les résultats actuels montrent que l'utilisation des pyrroles dans le domaine de l'inhibition de l'oxydation d'un matériau présente une méthode efficace pour éviter la corrosion du fer et des alliages dans les solutions agressives (de chlorures et de sulfures). Le mécanisme de protection est associé à une adsorption chimique de pyrrole sur la surface en provoquant un processus de transfert de charge entre les deux phases. La prodigosine qui présente une structure chimique en tripyrrole a justifié notre choix en vue de réaliser des essais anticorrosion par le biais de cette molécule.

Dans la partie expérimentale, nous avons réalisé une étude électrochimique afin d'évaluer l'effet inhibiteur de la prodigosine sur l'acier API X52, dans un milieu NaCl en fonction de la température, via diverses techniques électrochimiques.

IV.1. Introduction

La partie théorique a permis de rappeler les notions fondamentales sur les inhibiteurs de corrosion. Or, l'objectif de ce mémoire est d'isoler l'inhibiteur de corrosion à partir de la culture d'une souche de *S. marcescens*, d'étudier son activité antioxydante ainsi que le comportement électrochimique de cet inhibiteur sur l'alliage API 5L X52. Dans ce chapitre les principales méthodes expérimentales pour atteindre notre but sont décrites. Certaines, principalement, les méthodes d'isolement de l'inhibiteur, les tests antioxydants et les méthodes électrochimiques, serviront à étudier l'efficacité de l'inhibiteur à travers des tests de corrosion.

Ce travail a été réalisé au niveau de deux laboratoires (laboratoire de Microbiologie, département de biologie, faculté des sciences et laboratoire du département Génie des procédés, faculté de Technologie), Université Hassiba Ben bouali de Chlef.

IV.2. Matériel biologique

IV.2.1. Microorganisme

Le microorganisme est une bactérie isolée à partir d'un aliment fermenté traditionnel local d'origine céréalier (Berouil ou Hammoum). La souche est conservée dans un bouillon LB (Luria Bertani) au glycérol à -20°C.

IV.2.2. Activation de la souche

Des pré-cultures sur bouillon LB nous ont permis d'activer la souche et de vérifier sa pureté.

IV.3. Matériau utilisé

L'acier utilisé dans notre étude est de type API 5L X52. Matériau du pipeline gazier (région Sonatrach de Relizane). La composition chimique du matériau étudié est présentée dans le tableau IV.1. Elle est conforme aux spécifications standards API (Hadj meliani, 2009).

Tab. IV.1 : Composition chimique de l'acier API 5L X52 (% masse) (Hadj meliani, 2009).

Elément	C	Mn	Si	Cr	Ni	Mo	S	Cu	Ti	Nb	Al
% masse	0,22	1,22	0,24	0,16	0,14	0,06	0,036	0,19	0,04	<0,05	0,032

IV.4. Méthodes

IV.4.1. Identification et caractéristiques de la souche de *S. marcescens*

A. Vérification de la pureté de la souche de *S. marcescens*

La souche bactérienne de *S. marcescens* ; maintenue dans un bouillon LB à une température de congélation (-20°C) ; a été subi une revivification dans des tubes à essais contenant 10 mL de bouillon LB et dans des boîtes de pétries contenant la gélose LB à 30°C pendant 24 heures.

À partir de la culture précédente on réalise un examen macroscopique et microscopique après coloration de Gram afin de vérifier la pureté de la souche.

Une pique centrale d'une gélose LB permet l'ensemencement par un cure-dent stérile, l'incubation à 30°C permet de suivre l'envahissement de la gélose par la souche bactérienne en fonction du temps. Des mouvements en vague permettent de déterminer le type d'envahissement (swarming).

B. Caractérisation biochimique de la souche de *S. marcescens*

B.1. Mise en évidence des enzymes respiratoires

- Test de catalase

L'importance de cette enzyme a été évoquée, elle empêche en effet l'accumulation d'H₂O₂. La technique la plus simple consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée et y à ajouter un peu de la culture à étudier. Si la souche examinée possède une catalase positive, nous observons un dégagement immédiat des bulles gazeuses (Marchal, 1987).



- Test d'oxydase

Selon Guiraud (1998), poser sur une lame le disque oxydase (OX) et ajouter une colonie et déposer à l'aide d'une pipette pasteur. La présence d'une cytochrome-oxydase se traduit en 20 à 60 secondes par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.

B.2. Identification par galerie API 20 E

Le profil fermentaire des sucres a été démontré par ensemencement d'une galerie biochimique API 20 E (bioMérieux) par une suspension bactérienne dans l'eau distillée stérile. Le remplissage des cupules a été réalisé à l'aide d'une pipette pasteur stérile, pointée sur le côté de la cupule. L'ajout d'huile de paraffine stérile (pour : ADH, LDC, ODC, H₂S et URE) permet l'anaérobiose. L'incubation est effectuée à 30°C pendant 24 heures. L'ajout des réactifs (TDA, VP (1 et 2), Kovacs, nitrate 1, nitrate 2 et la poudre de zinc) après l'incubation, facilite l'interprétation.

IV.4.2. Etude cinétique de croissance et de production des métabolites

Selon Guiraud (1998) le milieu LB est inoculé à partir d'une pré-culture de 18 heures à raison de 10% (v/v). Le volume de culture est le 1/10 du volume de récipient bouché au coton. Incubé à 30°C avec agitation de 160 rpm pendant 216 heures. Des prélèvements de 5 mL à chaque intervalle de temps sont effectués (0, 4, 24, 48, 72, 96, 192 et 216 heures). La densité optique à 600 et à 535 nm est déterminée ainsi que la mesure du pH et de la tension de surface.

IV.4.3. Extraction des métabolites

Une centrifugation à 10000 rpm à 4°C pendant 10 minutes nous a permis de séparer le culot cellulaire du surnageant. Sur le surnageant de culture nous avons déterminé le pH et la tension de surface selon les méthodes ci-dessous.

Sur le culot cellulaire nous avons extrait la prodigiosine selon la méthode suivante (Giri et *al.*, 2004) :

Le culot a été remis en suspension dans un volume égal de méthanol acidifié à pH 3 (4 mL de HCl 1N - 96 mL de méthanol). Le mélange a été agité au vortex pendant 1 minute et la suspension a été centrifugée à nouveau à 10000 rpm pendant 10 minutes. Ces étapes sont répétées jusqu'à obtention d'un culot clair. L'extrait méthanolique (surnageant) a été concentré par évaporation sous hotte à 37°C.

Sur cet extrait nous avons réalisé les tests d'activité antioxydante et anticorrosive selon les méthodes citées ci-dessous.

IV.4.4. Techniques analytiques

A. Mesure du pH

Le pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre. Il suffit de plonger la pointe de l'électrode dans la culture, la valeur du pH s'affiche au potentiomètre au centième d'unité. Le pH mètre doit être étalonné avant son utilisation à l'aide des solutions tampons dont le pH est de 7, 10, et 4.

B. Détermination de la tension de surface

La libération des agents tensio-actifs dans la culture bactérienne par le microorganisme au cours de sa croissance a été surveillée en mesurant la tension superficielle du milieu de culture. Les mesures ont été effectuées sur des échantillons du surnageant de culture par le biais d'un tensiomètre « Tolido » en utilisant la technique de l'anneau. La force de rupture exprimée en mN/m est affichée sur un écran analogique. La force obtenue est comparée à un étalon d'eau distillée. Un volume de 10 mL de surnageant (ou d'eau distillée) est utilisé pour la mesure. L'anneau en acier inoxydable est immergé dans le liquide jusqu'à une profondeur limite sans touché le fond de la cupule en verre (Desai et Banat, 1997).

C. Analyse spectrale

L'analyse spectrale a été faite sur les extraits méthanoliques de la prodigiosine (extraites à 24, 48, 72, 96 et 192 heures). Cette analyse a été effectuée sur un spectrophotomètre UV-VIS et les extraits ont été balayés dans une gamme de 300 à 800 nm pour déterminer les spectres d'absorption maximale. Le méthanol a été utilisé comme blanc (Williams, 1955).

IV.4.5. Activité antioxydante de la prodigiosine

A. Test de piégeage du radical libre DPPH

Cette méthode est basée sur la mesure de la capacité des antioxydants à piéger le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH[•]). Ce dernier est réduit à la forme d'hydrazine (non radical) en acceptant un atome d'hydrogène.

Le DPPH est généralement le substrat le plus utilisé pour l'évaluation rapide et directe de l'activité antioxydante en raison de sa stabilité en forme radicale libre et la

simplicité de l'analyse. Il absorbe dans le visible à la longueur d'onde de 515 à 520 nm (Bozin et *al.*, 2008).

Le test consiste à mettre le radical DPPH (de couleur violette) en présence des molécules dites « antioxydantes » afin de mesurer leur capacité à réduire le radical DPPH. La forme réduite (de couleur jaune) n'absorbe plus, ce qui se traduit par une diminution de l'absorbance à cette longueur d'onde.

Pour dépister l'activité antioxydante, le test au DPPH a été utilisé selon le protocole décrit par Velazquez et *al.* (2003).

Dans des tubes on introduit 750 µL de l'extrait et 1,5 mL de la solution méthanolique de DPPH (2,4 mg/100 mL), les tubes sont placés à l'obscurité à température ambiante pendant 30 minutes. La lecture a été effectuée par la mesure de l'absorbance à 517 nm.

Selon Sharififar et *al.* (2007), l'inhibition du radical libre de DPPH en pourcentage (I%) est calculée de la manière suivante :

$$I \% = \frac{\text{Abs Contrôle négatif} - \text{Abs Échantillon}}{\text{Abs Contrôle négatif}} \times 100 \dots\dots\dots(\text{IV.2})$$

Où : I % : Pourcentage de l'activité anti-radicalaire ; Abs Échantillon : Absorbance de l'échantillon ; Abs Contrôle négatif : Absorbance du contrôle négatif.

L'IC₅₀ ou concentration inhibitrice de 50 % (aussi appelée EC₅₀ pour Efficient concentration 50), est la concentration de l'échantillon testé nécessaire pour réduire 50% de radical DPPH*. Les IC₅₀ sont calculées graphiquement par les régressions linéaires des graphes tracés, pourcentages d'inhibition en fonction de différentes concentrations des extraits testés (Bertoncelj et *al.*, 2007).

B. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

Le pouvoir réducteur du fer (Fe³⁺) dans les extraits est déterminé selon la méthode décrite par Oyaizu (1986).

1 mL de l'extrait à différentes concentrations (de 5 à 20 mg/mL) est mélangé avec 2,5 mL d'une solution tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 2,5 mL d'une solution de ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ à 1%. L'ensemble est incubé au bain-marie à 50°C pendant 20 minutes. Ensuite, 2,5 mL d'acide trichloroacétique à 10% sont ajoutés pour stopper la réaction et les tubes sont centrifugés à 3000 rpm pendant 10 minutes.

Une aliquote (2,5 mL) de surnageant est combinée avec 2,5 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de $FeCl_3$ à 0,1%. La lecture de l'absorbance du milieu réactionnel se fait à 700 nm contre un blanc semblablement préparé, en remplaçant l'extrait par de l'eau distillée qui permet de calibrer l'appareil (spectrophotomètre UV-VIS).

Le contrôle positif est représenté par une solution d'un antioxydant standard ; l'acide ascorbique, dont l'absorbance a été mesurée dans les mêmes conditions que les échantillons. Une augmentation de l'absorbance correspond à une augmentation du pouvoir réducteur des extraits testés.

La concentration IC_{50} qui est définie comme la concentration des antioxydants nécessaire pour réduire 50% de la concentration initiale du thiocyanate ferrique est un indice utilisé pour comparer et exprimer la puissance des capacités réductrices des substances bioactives.

C. Test de décoloration du β -carotène

Cette technique de spectrophotométrie dans l'ultraviolet a initialement été développée par Marco (1968), puis légèrement modifiée par Miller (1971).

Le β -carotène est physiologiquement un composé important reconnu par sa forte activité biologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, il est utilisé dans les boissons comme un agent de coloration et sa décoloration indique la réduction de qualité de ces produits (Bougatef et *al.*, 2009). Cependant, dans le test du blanchiment du β -carotène, la présence des 11 paires de doubles liaisons rend le β -carotène extrêmement sensible aux radicaux libres dérivés d'hydroperoxydes qui sont formés à partir de l'oxydation d'acide linoléique dans un système émulsion aqueuse en résultant le blanchiment du β -carotène. La présence des antioxydants réduisent l'ampleur de la destruction du β -carotène en

neutralisant les hydroperoxydes et d'autres espèces radicalaires formées à l'intérieur de ce système.

Dans cette analyse la capacité antioxydante est déterminée par la mesure de l'inhibition des composés organiques volatils et les hydro-peroxydes conjugués diène résultant de l'oxydation de l'acide linoléique (Athamena et *al.*, 2010).

Dans ce test, (Kartal et *al.*, 2007), 1 mg de β -carotène a été dissous dans 2 mL de chloroforme. La solution obtenue a été introduite dans un ballon contenant 100 μ L d'acide linoléique et 400 mg de Tween 40. Après évaporation du chloroforme (30°C), 200 mL d'eau distillée saturée en oxygène ont été ajoutés avec agitation vigoureuse. De cette nouvelle solution 2,5 mL sont transférés dans des tubes, et 350 μ L de l'extrait (2 mg/mL) ou du témoin BHT (antioxydant de contrôle) sont ajoutés. L'absorbance a été immédiatement mesurée pour le BHT à 490 nm. Les tubes ont été placés, à l'obscurité, à température ambiante pendant 48 heures. Une deuxième lecture est mesurée à 48 heures. L'activité antioxydante relative après 48 heures est calculée selon la relation suivante :

$$AAR = \frac{\text{Abs Échantillon (48h)}}{\text{Abs BHT (0h)}} \times 100 \dots\dots\dots(\text{IV.3})$$

Où : AAR : activité antioxydante relative ; Abs Échantillon (48h) : absorbance de l'échantillon après 48 heures ; Abs BHT (0h) : absorbance du BHT à t=0 heure.

IV.4.6. Préparation des échantillons de l'acier

Des éprouvettes, en forme de parallélépipède sont préparées à partir de la conduite en acier selon la figure IV.1. Les dimensions sont 10x10x10 (mm³).

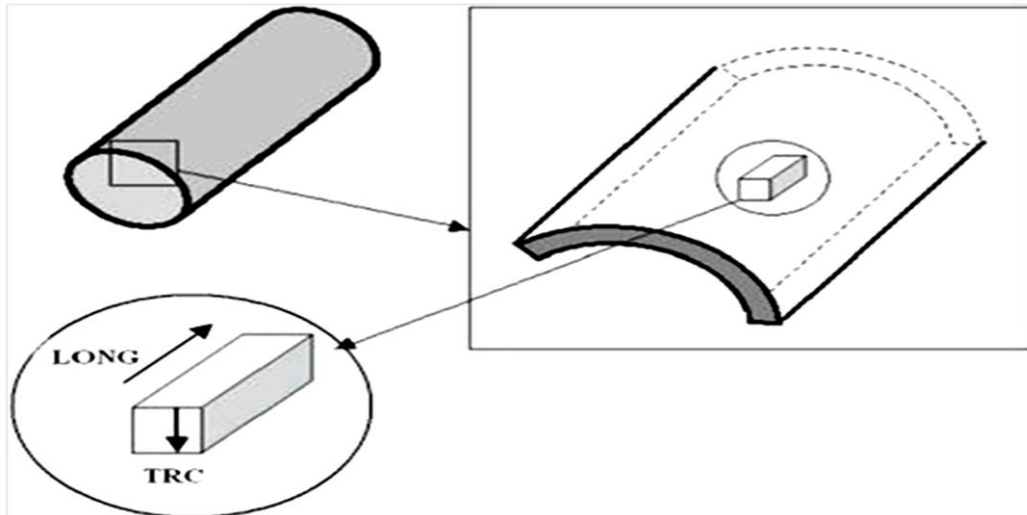


Fig. IV.1 : Sens de prélèvement des échantillons.

IV.4.7. Traitement de surface pré-expérimental

Pour étudier l'effet inhibiteur de notre extrait, il est nécessaire que la surface soit décapée et polie. L'échantillon a été soudé avec un fil conducteur en cuivre (pour les tests électrochimiques), puis tous ces échantillons d'aciers utilisés ont été polis sur des disques abrasifs SiC de différentes granulométries (Afin d'obtenir des états de surface identiques et des manipulations reproductibles), enfin une délimitation de la surface à $0,25 \text{ cm}^2$ par du vernis a été effectuée (figure IV.2).

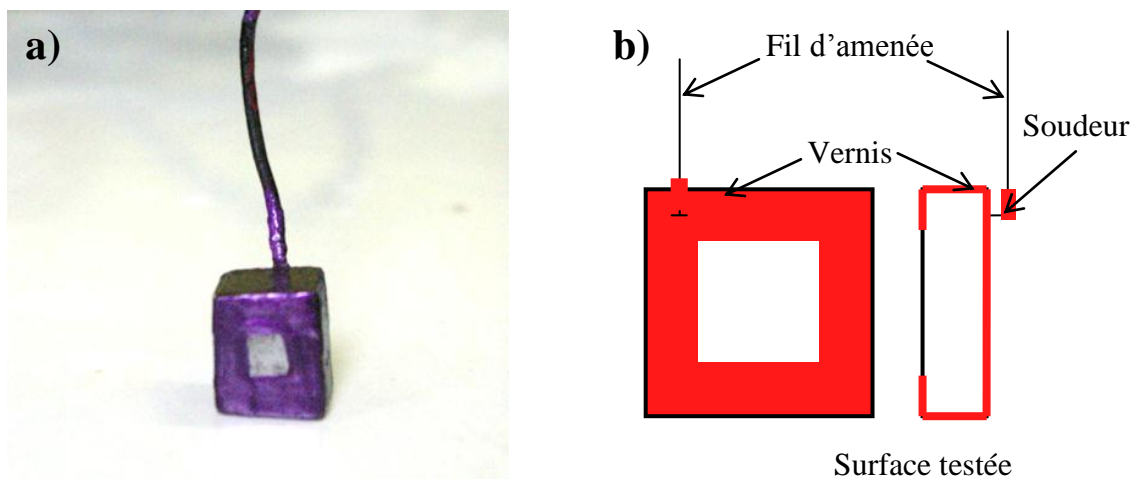


Fig. IV.2 : Traitement de la surface de l'échantillon : a) Image représentative de l'échantillon préparé, b) Schéma de l'échantillon préparé vue de face et de côté.

IV.4.8. Préparation des solutions

A. Milieu corrosif

Pour évaluer l'effet inhibiteur des extraits sur l'alliage API X52, le milieu corrosif choisi était une solution aqueuse de sel contenant du chlorure de sodium (NaCl) de 30 g/L.

B. Solutions inhibitrices

0,1 g d'extrait de la prodigiosine ; isolé à partir de la culture de la souche de *S. marcescens* par la méthode citée ci-dessus, est ajouté à 1000 mL d'une solution de NaCl.

La détermination de la concentration optimale d'inhibiteur a été effectuée en préparant des solutions diluées de 5%, 10%, 20% et 30% en masse à partir de la solution mère (tableau IV.2).

Chaque concentration a été étudiée pour trois températures différentes pour la détermination de l'efficacité de l'inhibiteur en fonction de la température. Les températures choisies sont : ambiante (24°C), 50°C et 80°C.

Tab. IV.2 : Milieu corrosif utilisé sans et avec l'addition de l'inhibiteur avec l'effet de concentrations et de températures.

NaCl	Sans inhibiteur											
	24°C				50°C				80°C			
	Avec inhibiteur											
	5%			10%			20%			30%		
	24°C	50°C	80°C	24°C	50°C	80°C	24°C	50°C	80°C	24°C	50°C	80°C

IV.4.9. Tests électrochimiques préliminaires des extraits

Afin de choisir le meilleur bio-inhibiteur de corrosion, des tests électrochimiques préliminaires ont été effectués. Des extraits prélevés à partir du surnageant de culture et du culot bactérien à différents intervalles de temps (24, 48 et 72 heures) ont été étudiés.

La méthode consiste à prélever 0,2 mL de chaque surnageant de culture et de chaque extrait (prodigiosine) et le mettre dans 100 mL de la solution de chlorure de sodium pour mesurer le potentiel de corrosion en fonction du temps et en fonction du courant.

IV.4.10. Caractérisation électrochimique

Certaines méthodes stationnaires électrochimiques d'études des inhibiteurs de corrosion de l'acier API 5L X52 ont été mises en place : la chronopotentiométrie et la courbes de polarisation : autrement dite la voltammétrie linéaire.

A. Suivi du potentiel d'abandon au cours du temps (Chronopotentiométrie)

La chronopotentiométrie consiste à immerger l'électrode de travail dans un électrolyte donné et de suivre l'évolution de son potentiel libre en fonction du temps, en imposant ou non le passage d'un courant. Dans notre cas aucun courant ne sera imposé afin d'observer l'évolution naturelle du potentiel libre de l'électrode de travail vers son état stationnaire représenté par le potentiel d'équilibre (OCP). Le potentiel tend vers sa valeur d'équilibre après une durée variable qui dépend de la nature de l'électrode et des conditions ambiantes (réactifs...).

Le suivi de l'évolution du potentiel d'électrode dans le temps permet d'obtenir des informations sur l'évolution de l'interface métal/électrolyte. Durant l'enregistrement, le potentiel de corrosion n'atteint pas une valeur stationnaire immédiatement. D'une façon générale, quatre cas (figure IV.3) peuvent se produire :

Le potentiel augmente puis se stabilise (courbe a). Ce phénomène peut traduire l'apparition d'un phénomène de passivation d'un métal par une couche protectrice isolant le matériau de l'électrolyte. Le potentiel diminue puis se stabilise (courbe b). Il peut s'agir d'une corrosion continue.

Le potentiel diminue dans un premier temps puis augmente et se stabilise (courbe c). Il peut s'agir de la destruction d'une couche passivante préexistante suivie d'une nouvelle passivation du métal par un agent oxydant de la solution.

Le potentiel augmente puis diminue et se stabilise (courbe d et d'). Il peut s'agir de la formation d'une couche protectrice au premier contact de l'électrode suivie d'une destruction de la même couche par un phénomène de piqûres.

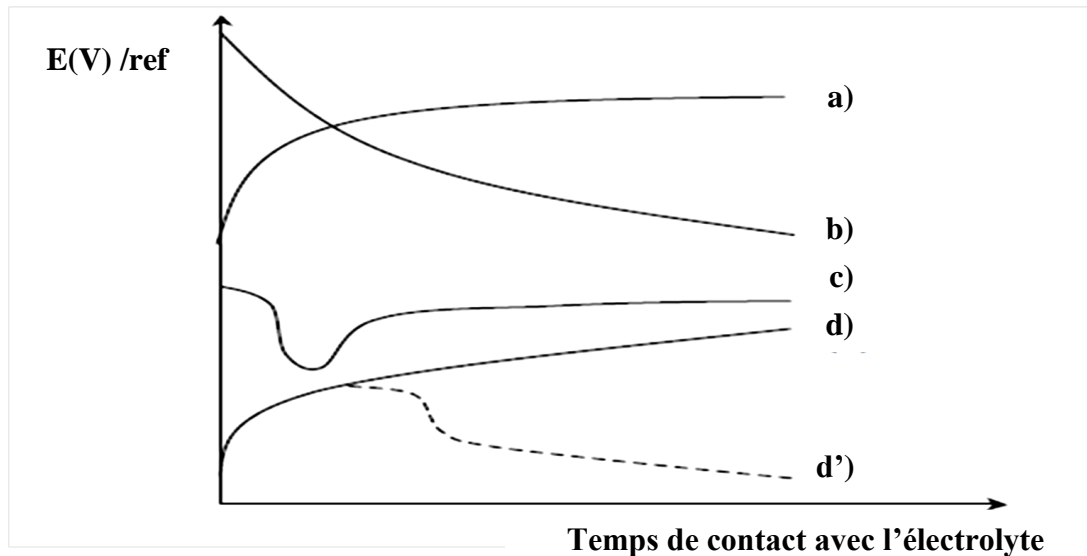


Fig. IV.3 : Evolution du potentiel d'abandon en fonction du temps : a) Passivation du métal, b) Attaque continue, c) Attaque suivie de passivation, d) Evolution d'une couche protectrice qui peut se détruire par la suite (d') (Babouri, 2008).

Avec le potentiel de repos, on peut estimer la tendance à l'oxydation, le degré de noblesse, fixer un caractère général d'anode ou de cathode à chacun des membres d'un couple galvanique. Cependant la mesure du potentiel de repos ne donne aucune indication sur la vitesse de corrosion. Pour cela, il est nécessaire de mesurer la valeur de l'intensité du courant de corrosion.

B. Méthode de Tafel (Courbes de polarisation)

Appelée aussi courbes intensité-potentiel, courbes de polarisation globale, ou courbes potentiodynamiques. La détermination des courbes intensité-potentiel des matériaux en milieu corrosif est un outil fondamental de l'étude des phénomènes de corrosion. La densité de courant mesuré en fonction du potentiel donne la courbe de polarisation qui renseigne sur la cinétique des réactions d'électrode en jeu. Selon la méthode employée, contrôle du potentiel ou contrôle du courant, on obtient respectivement les courbes de polarisation potentiostatique $I = f(E)$. Ces courbes sont obtenues en faisant varier de façon continue le potentiel appliqué à l'électrode de travail depuis le domaine cathodique (valeurs négatives du potentiel) jusqu'au domaine anodique. On mesure le courant stationnaire qui s'établit après un certain temps dans le circuit électrique entre cette électrode de travail et une contre-électrode. La vitesse de balayage en potentiel doit être

suffisamment lente pour assurer la réversibilité des réactions et pour que le système puisse être considéré dans un état quasi-stationnaire (Assouli, 2002).

Cette méthode permet de déterminer d'une façon précise les paramètres électrochimiques d'un métal au contact d'un électrolyte à savoir : la vitesse instantanée de corrosion (I_{corr}), le potentiel de corrosion (E_{corr}) et les pentes de Tafel.

Elle utilise les portions de la courbe $[i = f(E)]$, éloignées du potentiel de corrosion, c'est-à-dire les portions pour lesquelles $E \gg E_{\text{corr}}$ (domaine anodique) ou $E \ll E_{\text{corr}}$ (domaine cathodique).

B.1. Tracé des courbes de polarisation linéaires

Pour déterminer expérimentalement les paramètres électrochimiques, une présentation logarithmique de la densité de courant est en général préférable, car elle met en évidence la relation linéaire entre le logarithme de la densité de courant et le potentiel (Figure IV.4) (Stern et Geary, 1957).

Il suffira d'extrapoler jusqu'à leur point d'intersection les tronçons rectilignes de la courbe $\text{Log } I = f(E)$: la cote d'abscisse de ce point d'intersection sera le potentiel de corrosion E_{corr} et la cote d'ordonnée correspondante, le logarithme du courant de corrosion I_{corr} .

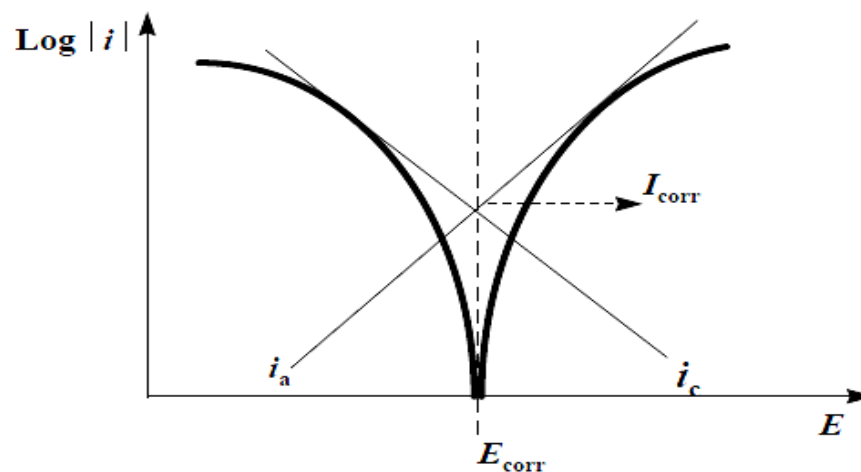


Fig. IV.4 : Détermination des paramètres électrochimiques à partir des droites de Tafel (Jaubert, 2004).

Quel que soit le type de mécanisme par lequel agit l'inhibiteur, le pouvoir protecteur de ce dernier caractérise le ralentissement de la corrosion, c'est-à-dire la diminution du courant de corrosion (ou de la vitesse de corrosion). L'efficacité d'un inhibiteur s'exprime par l'équation suivante :

$$E(\%) = \frac{i_{corr} - i_{corr}^{inh}}{i_{corr}} \times 100 \dots\dots\dots(IV.4)$$

i_{corr} et i_{corr}^{inh} représentent respectivement les courants de corrosion en absence et en présence d'inhibiteur. Il est possible d'accéder aux valeurs des courants de corrosion de manière expérimentale, plus précisément en se basant sur les tracés des courbes de polarisation linéaires.

IV.4.11. Paramètres expérimentaux électrochimiques

Pour les mesures électrochimiques, les différents paramètres fixés le long de la manipulation sont résumés ci-dessous :

- Tous les tracés sont obtenus après stabilisation du potentiel d'abandon, après un temps d'immersion d'une heure ;
- Les potentiels sont référencés à l'électrode au calomel saturée (ECS), dont l'extrémité est placée près de l'électrode de travail pour minimiser l'influence de la chute ohmique. Le potentiel appliqué à l'échantillon varie d'une façon continue, avec une vitesse de balayage égale à $0,5 \text{ m.s}^{-1}$, et une plage de -300 mV/ ECS à 300 mV/ ECS Vs autour du potentiel d'abandon ;
- Le matériel utilisé pour ces essais est :
 - Un potentiostat, Radiomètre PGP 201, piloté par le logiciel Voltmaster 4 (voir figure 1 de l'annexe VII) ;
 - Une cellule électrochimique de mesure (150 cm^3) en verre pyrex de forme cylindrique à double parois thermostaté, aux coté du cylindre des rodages coniques permettant l'introduction des électrodes ;
 - Des électrodes : Les électrodes utilisées dans la cellule électrochimique sont :
 Electrode de travail (ET) : est l'acier X52 découpé en petite plaque cubique d'une surface active de $0,25 \text{ cm}^2$. Electrode auxiliaire ou contre électrode (CE) : Est un cylindre de platine polie de 1 cm^2 de surface, son rôle est d'assurer le passage du courant électrique dans la cellule électrochimique et l'électrode

de référence (ER) : qui est une électrode au calomel saturée notée ECS en chlorure de potassium (KCl), constituée par le système $Hg_2/Hg ; Cl/KCl$;

- un micro-ordinateur muni des logiciels d'acquisition des données (figure IV.5).

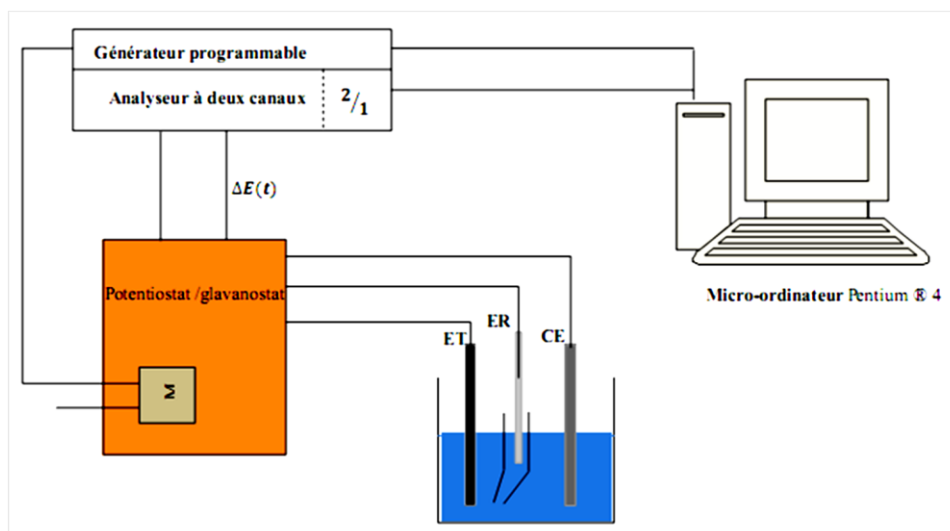


Fig. IV.5 : Montage potentiostatique pour mesures électrochimiques.

Tous les essais ont été effectués à température ambiante ($24^{\circ}C$, $50^{\circ}C$, $80^{\circ}C \pm 3^{\circ}C$), après 1 heure d'immersion au potentiel d'abandon.

IV.5. Conclusion

C'est à l'aide des différents procédés expérimentaux présentés dans ce chapitre qu'on est arrivé à isoler, à évaluer l'activité antioxydante et à étudier l'efficacité de notre inhibiteur obtenu à partir d'une culture de *S. marcescens* dans un milieu agressif (NaCl) à différentes températures.

Les résultats obtenus ainsi que leurs discussions et interprétations sont présentés dans le chapitre suivant.

V.1. Introduction

L'objectif de ce chapitre est de présenter les résultats des différentes expériences utilisées dans le cadre de cette étude.

Dans un premier temps nous avons suivi la cinétique de croissance et de production des métabolites (surfactant et prodigiosine) et évalué l'activité antioxydante de la prodigiosine produits par une souche de *S. marcescens*. Les essais électrochimiques ont été menées en solutions aqueuses (NaCl) sans et avec inhibiteurs. L'inhibiteur utilisé est correspond à l'extrait de la prodigiosine. L'action de cet inhibiteur a été testée pour plusieurs concentrations et à différents températures. L'évaluation de l'efficacité des inhibiteurs a été évaluée par les techniques électrochimiques stationnaires.

V.2. Identification et caractéristiques de la souche de *S. marcescens*

La souche a été isolée à partir d'un aliment céréalier traditionnel fermenté au niveau de la région de Djellida (Wilaya de Aïn Defla) en 2013.

V.2.1. Vérification de la pureté de la souche de *S. marcescens*

La pureté de la souche a été vérifiée par culture sur milieu LB (Luria Bertani) gélosé à 30°C. Après 24 heures d'incubation, seules des colonies de petites taille, rondes, convexes, lisses, de couleurs rouge et à consistance crémeuse apparaissent à la surface du milieu (figure V.1.a).

L'incubation après ensemencement par pique centrale du milieu LB en boîte de pétrie révèle la croissance en vague. Cette souche présente un caractère envahissant (swarming) (figure V.1.c et d).

L'examen microscopique après coloration différentielle de Gram a montré que les cellules étaient toutes semblables, à Gram négatif (roses) et à forme allongée (figure V1.b).

Les mêmes observations ont été signalées par Giri et *al.* (2004) montrant des caractéristiques identiques à notre souche.

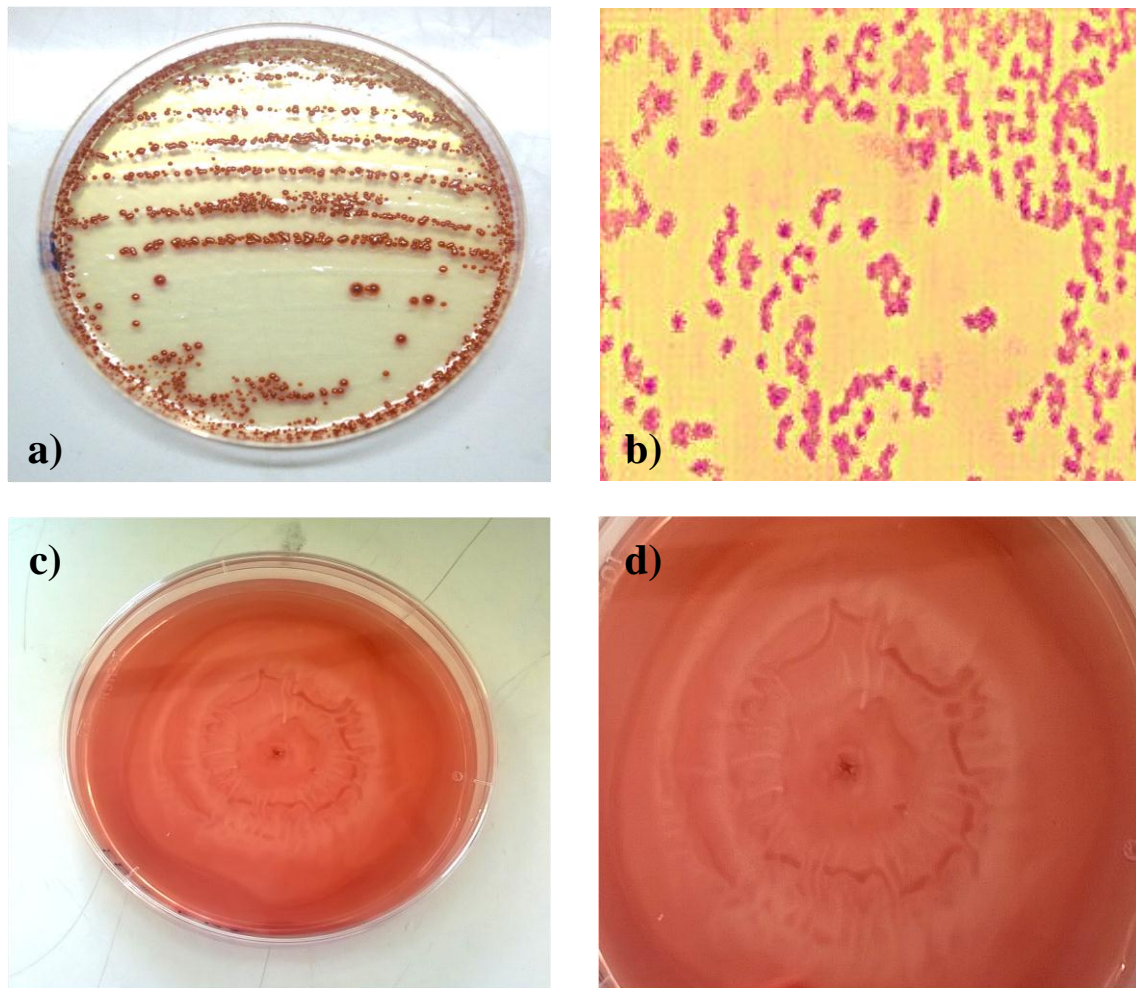


Fig. V.1 : Pureté de la culture de la souche *S. marcescens* : a) Observation macroscopique des colonies, b) Observation microscopique (X100), c) et d) Caractère envahissant (swarming).

V.2.2. Caractérisation biochimique de la souche de *S. marcescens*

A. Mise en évidence des enzymes respiratoires

A.1. Test de catalase

D'après la figure V.2.a, nous remarquons que le résultat du test catalase est positif. Il est basé sur le dégagement immédiat de bulles gazeuses qui est dû à l'élimination du peroxyde d'hydrogène issue de la voie respiratoire oxydative par l'enzyme catalase.

A.2. Test d'oxydase

Nous avons observé qu'il n'y a aucun changement de couleur du disque oxydase, cela indique que notre souche est caractérisée par l'absence d'oxydase (figure V.2.b).

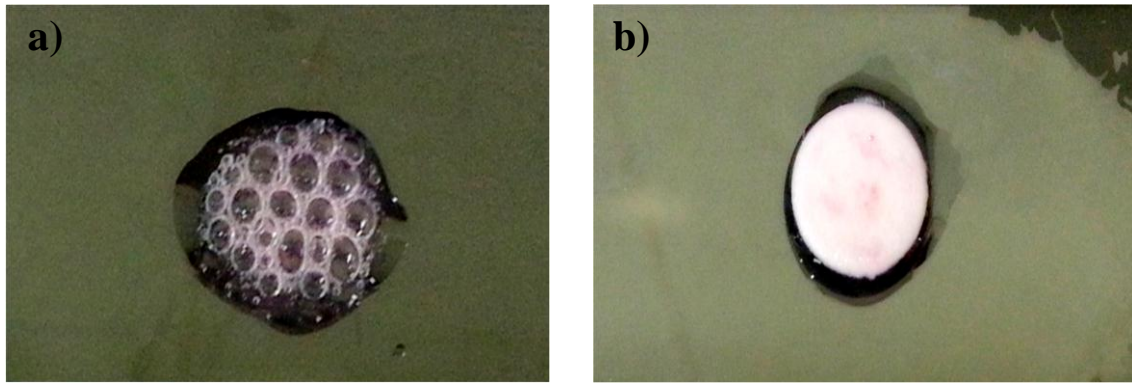


Fig. V.2 : Mise en évidence des enzymes respiratoires : a) Test de catalase, b) Test d'oxydase.

B. Identification par galerie API 20 E

Les résultats de l'identification biochimique sur galerie API 20 E sont illustrés dans le tableau V.1.

L'examen de la galerie API 20 E (figure V.3) révèle que notre souche assimile tous les sucres (hexoses et pentoses), pourvue de la β -galactosidase, la citratase, la gélatinase et capable de produire le dioxyde d'azote (NO_2).

Elle est également dépourvue de la Tryptophane désaminase de l'arginine dihydrolase et de l'uréase. Incapable de produire le sulfure d'hydrogène (H_2S) et le di-azote (N_2). Ces caractéristiques sont communes au genre de *Serratia*.

Le test VP (production d'acétoïne) est distinctif entre *S. marcescens* et les autres espèces appartenant à ce genre. *S. marcescens* est capable de produire de l'acétyle méthyle carbinol (supérieur ou égale à 70%).

Le caractère indologène est présent chez *S. marcescens*. Ceci nous a permis de confirmer que la souche est présumée d'être *S. marcescens*.

Tab. V.1 : Caractérisation biochimique de la souche de *S. marcescens* par galerie API 20

E.

	Lecture	Résultat	Discussion
ONPG	Jaune	+	Présence de la β -galactosidase
ADH	Jaune	-	pas de l'arginine dihydrolase
LDC	Jaune	-	pas de la lysine décarboxylase
ODC	Jaune	-	Pas de l'ornithine décarboxylase
CIT	Bleu	+	Utilisation du citrate, présence de la citratase
H₂S	Incolore	-	Pas de production d'H ₂ S
URE	Jaune	-	Pas d'uréase
TDA	Jaune	-	Pas de la tryptophane désaminase
IND	Rose	+	Production d'indole
VP	Rose-rouge	+	Production d'acétoïne
GEL	Diffusion	+	Présence de Gélatinase
GLU	Jaune	+	Fermentation – oxydation (glucose)
MAN	Jaune	+	Fermentation – oxydation (mannitol)
INO	Jaune	+	Fermentation – oxydation (inositol)
SOR	Jaune	+	Fermentation – oxydation (sorbitol)
RHA	Jaune	+	Fermentation – oxydation (rhamnose)
SAC	Jaune	+	Fermentation – oxydation (saccharose)
MEL	Jaune	+	Fermentation – oxydation (melibiose)
AMY	Jaune	+	Fermentation – oxydation (amygdaline)
ARA	Jaune	+	Fermentation – oxydation (arabinose)
NO₂	Rouge	+	Production du dioxyde d'azote
N₂	Rouge	-	Pas de production de l'azote

**Fig. V.3** : Caractérisation biochimique de la souche de *S. marcescens* par galerie API 20

E.

V.3. Etude cinétique de croissance et de production des métabolites

Les deux principaux métabolites produits par la souche de *S. marcescens* sont le biosurfactant (Serrawettine) et la prodigiosine (pigment rouge).

Au cours de la croissance nous avons suivi l'évolution du pH, de la densité optique à 600 nm, la tension de surface (exprimée en mN/m) et la production du pigment (après extraction au méthanol acidifié à pH 3 ; par mesure de la densité optique d'une aliquote à 535 nm). Les conditions de culture sont les suivantes :

- pH initial de 6,8 ;
- 30°C avec agitation à 160 rpm ;
- Erlenmeyer bouchés au coton remplie au 1/10 de leur volume.

Les résultats trouvés sont illustrés dans les figures V.4, V5 et V.6. Nous remarquons ce qui suit :

- Le pH augmente en fonction du temps passant de 6,8 à 9,34 (souche alcalinisante) ;
- Une baisse importante de la tension de surface jusqu'à une valeur de 29,9 mN/m après 36 heures de culture, nous remarquons également une stabilisation de la tension de surface aux alentours de 46,3 mN/m après 7 jours de culture ;
- Comparé à la croissance, la prodigiosine est produite à partir de 12 heures de croissance et continue d'augmenter au fur et à mesure de la culture (voire figure 1 de l'annexe VI) ;
- L'absorbance maximale en spectrophotométrie UV-visible de la substance rouge a été obtenue à 535 nm. Nous remarquons que la souche produit cette substance en fonction de la durée d'incubation où elle atteint le maximum de production à 96 heures de culture.

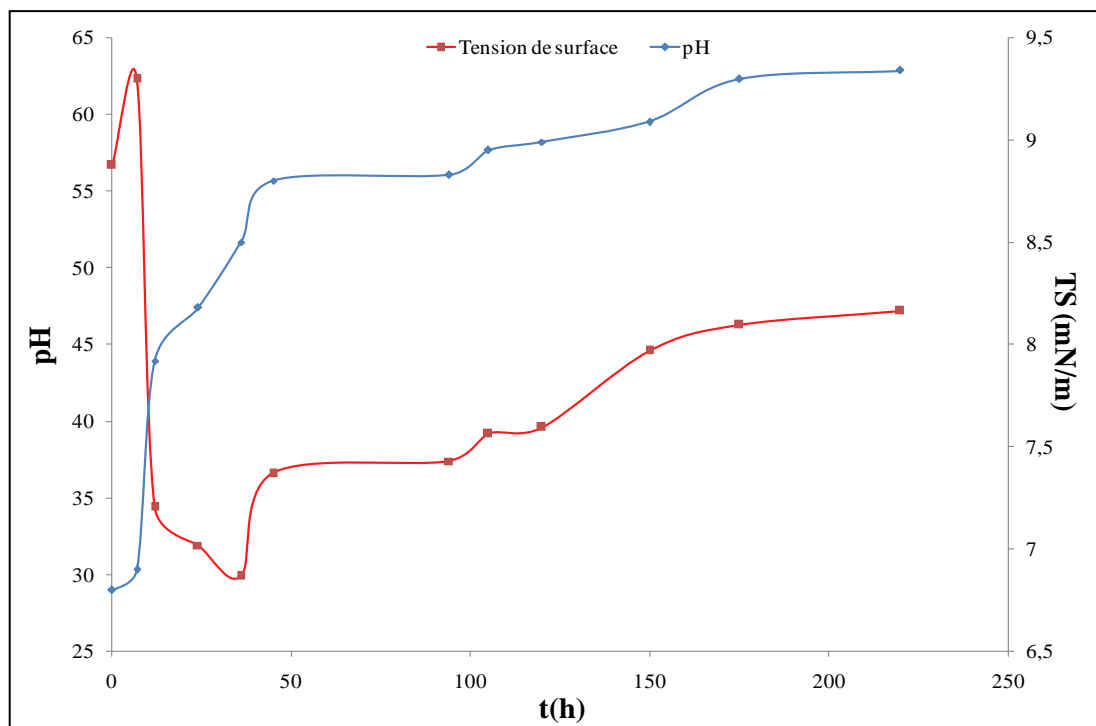


Fig. V.4 : Evolution du pH et de la tension de surface en fonction du temps durant la croissance de *S. marcescens* à 30°C et agitation à 160 rpm sur milieu LB.

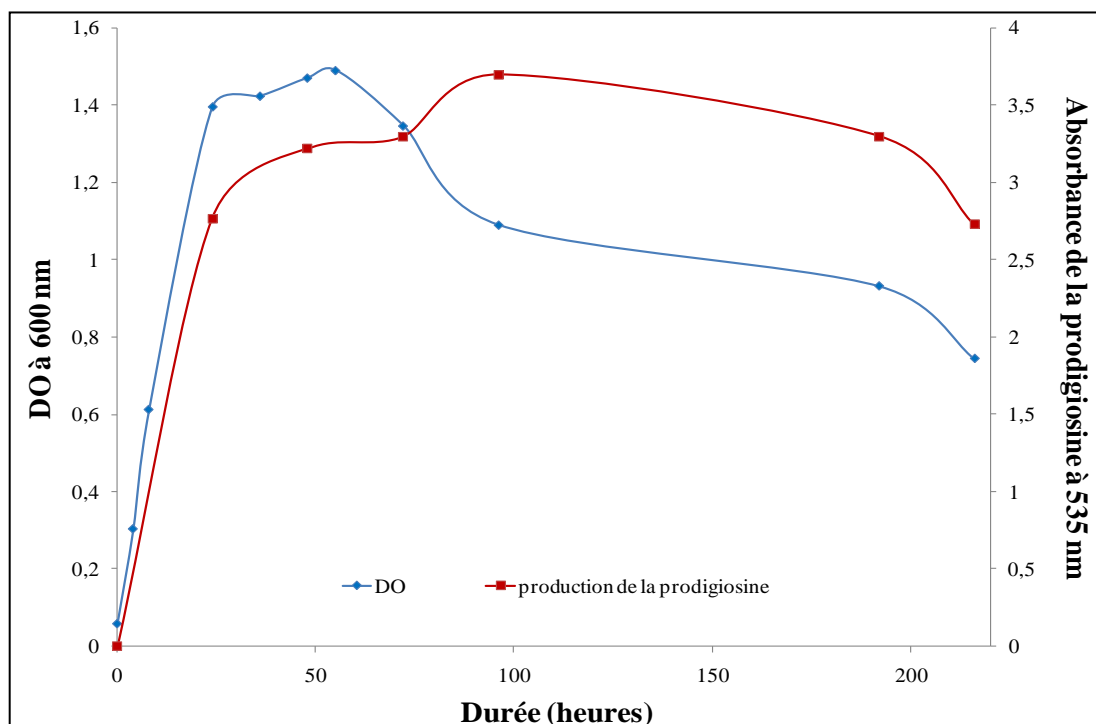


Fig. V.5 : Evolution de la DO 600 et de la production de la prodigiosine en fonction du temps de durant la croissance de *S. marcescens* à 30°C et agitation à 160 rpm sur milieu LB.

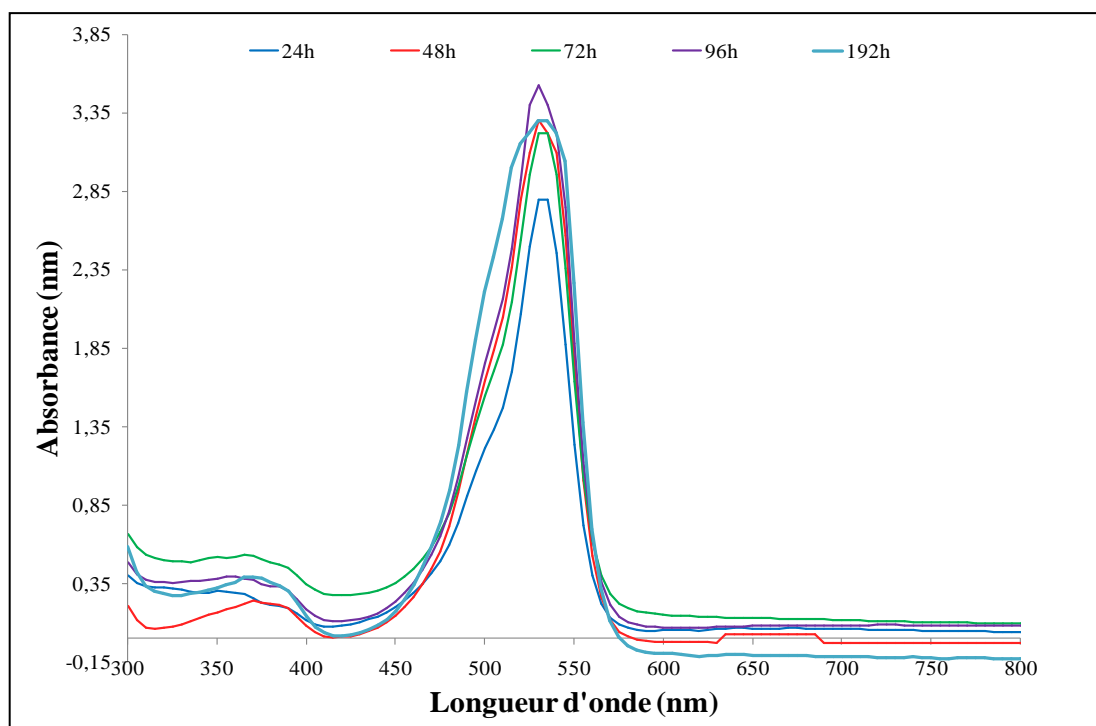


Fig. V.6 : Evolution de la concentration en prodigiosine durant la croissance de *S. marcescens* (spectre d'absorbance moléculaire).

S. marcescens produit trois types de serrawettines (W1, W2 et W3). La tension de surface du surnageant de la culture la plus faible correspond à la W3.

Les travaux de Matsuyama et *al.* (1986) montrent qu'effectivement W3 fait baisser la tension de surface à 28.8 mN.m^{-1} alors que W1 et W2 la baissent à 32.2 mN.m^{-1} et à 33.9 mN.m^{-1} respectivement.

La tension de surface obtenue à 36 heures de culture est un indice de production de la W3.

Par ailleurs les travaux de Ahmad et *al.* (2012) et Hines et *al.* (1988) montrent que les spectres d'absorption maximale pour la prodigiosine sont également à 535 nm.

V.4. Activité antioxydante de la prodigiosine

L'activité antioxydante *in vitro* a été évaluée par les trois méthodes : le test au DPPH, la mesure du pouvoir réducteur (FRAP) et la technique de décoloration du β -carotène. Très peu de travaux portant sur cette propriété ont été réalisés.

V.4.1. Test de piégeage du radical libre DPPH

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical DPPH par la prodigiosine et l'acide ascorbique sont représentés (voir la figure 1 et 2 de l'annexe VIII).

L'activité antioxydante de l'extrait de la prodigiosine comparé à l'acide ascorbique vis-à-vis du radical DPPH à été évaluée par spectrophotométrie en suivant la réduction de ce radical qui s'accompagne par son passage de la couleur violette (DPPH[•]) à la couleur jaune (DPPH-H) mesurable à 517 nm. Cette capacité de réduction est déterminée par une diminution de l'absorbance induite par des substances anti-radicalaires.

Les résultats du pouvoir antioxydant des extraits testés montrent que le pourcentage d'inhibition de l'extrait est supérieur à 80% à une concentration de l'ordre de 16 mg/mL.

La valeur IC₅₀ déterminée en mg/mL exprimant la concentration efficace de l'extrait antioxydant nécessaire pour le piégeage et la réduction de 50% de moles de DPPH en dissolution dans du méthanol est de l'ordre de 8 mg/mL.

Selon les résultats enregistrés, l'extrait de la prodigiosine est doté d'un pouvoir antioxydant modéré, son IC₅₀ est faible que celui de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 2 mg/mL.

Cette activité antioxydante a été signalée par Vora et *al.* (2014), la valeur trouvée est de l'ordre de 30,98% pour une concentration de l'ordre de 8 mg/mL, alors que Gulani et *al.* (2012) ont confirmé cette propriété.

V.4.2. Test de la réduction du fer FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

L'activité anti oxydante de l'extrait de la prodigiosine a été évaluée en utilisant la méthode de FRAP. Cette dernière est un essai simple, rapide et reproductible. La présence des réducteurs dans l'extrait provoque la réduction de Fe³⁺/complexe ferricyanide à la forme ferreux. Par conséquent, le Fe²⁺ peut être évalué en mesurant et en surveillant l'augmentation de la densité de la couleur verte dans le milieu réactionnel à 700 nm.

Les résultats du pouvoir réducteur des extraits testés (voir la figure 3 de l'annexe VIII) montrent que l'absorbance la plus élevée est de l'ordre de 0,565 nm à une concentration de 20 mg/mL. La valeur IC₅₀ est de l'ordre de 18,4 mg/mL.

Selon ces résultats, l'extrait de la prodigiosine est doté d'un pouvoir réducteur intéressant, son IC₅₀ est faible que celui de l'acide ascorbique dont la valeur est de l'ordre de 0,5 mg/mL (voir la figure 4 de l'annexe VIII).

V.4.3. Test de décoloration du β-carotène

L'aptitude de l'extrait à inhiber la peroxydation lipidique évaluée par la technique de décoloration du β-carotène montre que l'oxydation de l'acide linoléique est inhibée par l'extrait de la prodigiosine.

Les résultats du pouvoir antioxydant de l'extrait testé montrent que le pourcentage d'inhibition de l'extrait est de l'ordre de 61,66% à une concentration de l'ordre de 2 mg/mL.

L'extrait de la prodigiosine est doté d'un pouvoir antioxydant appréciable, son pourcentage d'inhibition est faible que celui du BHT dont la valeur est de l'ordre de 91,75%.

La prodigiosine est antioxydante que ce soit en phase aqueuse ou organique. Ce qui montre un intérêt certain de cette molécule dans différentes applications (pharmaceutiques, alimentaires, cosmétiques et médicales). En comparant à des molécules d'origine végétale telles que :

- Les extraits méthanoliques de *Satureja calamintha* : (IC₅₀ du DPPH : 2,07 mg/mL ; IC₅₀ du FRAP : 2,5 mg/mL) (Bougandoura et Bendimerad, 2013) ;
- L'extrait phénolique de l'huile d'olive (*Olea europaea*) : (IC₅₀ du DPPH : 25,38 mg/kg ; pourcentage d'inhibition du β-carotène pour 2 mg/mL : 67,40%) (Merouane et al., 2014) ;
- Les extraits de la poudre de tomate (pelure + pulpe) : (FRAP : DO = 0,746 et DO = 0,329 respectivement pour une concentration de 0,125 mg/mL) (Hireche, 2013) ;

- L'extrait des feuilles de *Helianthemum lippii* : pourcentage d'inhibition du β -carotène : 97.64% à 3 mg/mL (Benhammou, 2012) ;
- L'extrait aqueux de *Nigella sativa L* : le pourcentage d'inhibition du β -carotène est de l'ordre de 26% pour 2 mg/mL (Meziti, 2009).

Les valeurs trouvées dans le cas de la prodigiosine sont dans l'intervalle de l'acceptable.

V.5. Tests électrochimiques préliminaires des extraits

L'efficacité inhibitrice des extraits testés est obtenue d'après l'étude des courbes de polarisation de l'acier API X52 dans la solution de NaCl (30 g/L) sans et avec inhibiteur après 30 minutes d'immersion à température ambiante (24°C).

L'examen des figures V.7 et V.8 montre que l'allure de la courbe de polarisation varie d'un extrait à un autre. En utilisant les droites de Tafel (voir chapitre IV), nous avons déterminé les différents paramètres concernant la cinétique de corrosion par rapport à l'extrait étudié. Le tableau V.2 regroupe ces valeurs.

Après la comparaison des courbes de polarisation, on note que la valeur du courant dans le milieu témoin (sans inhibiteur) est plus élevée par rapport à tous les milieux avec les extraits obtenus par la souche de *S. marcescens*, ce qui implique que ces produits présentent un effet inhibiteur. La valeur du courant la plus petite est attribuée à la courbe de polarisation de la prodigiosine extraite après 72 heures.

La suite de notre travail se portera, donc, sur l'optimisation de la concentration de la prodigiosine extraite après 72 heures pour l'inhibition de la corrosion de l'acier API X52. On effectuera des dilutions de 5%, 10%, 20% et 30% à partir d'une solution mère (0,1 g de prodigiosine /1000 mL de solution de NaCl).

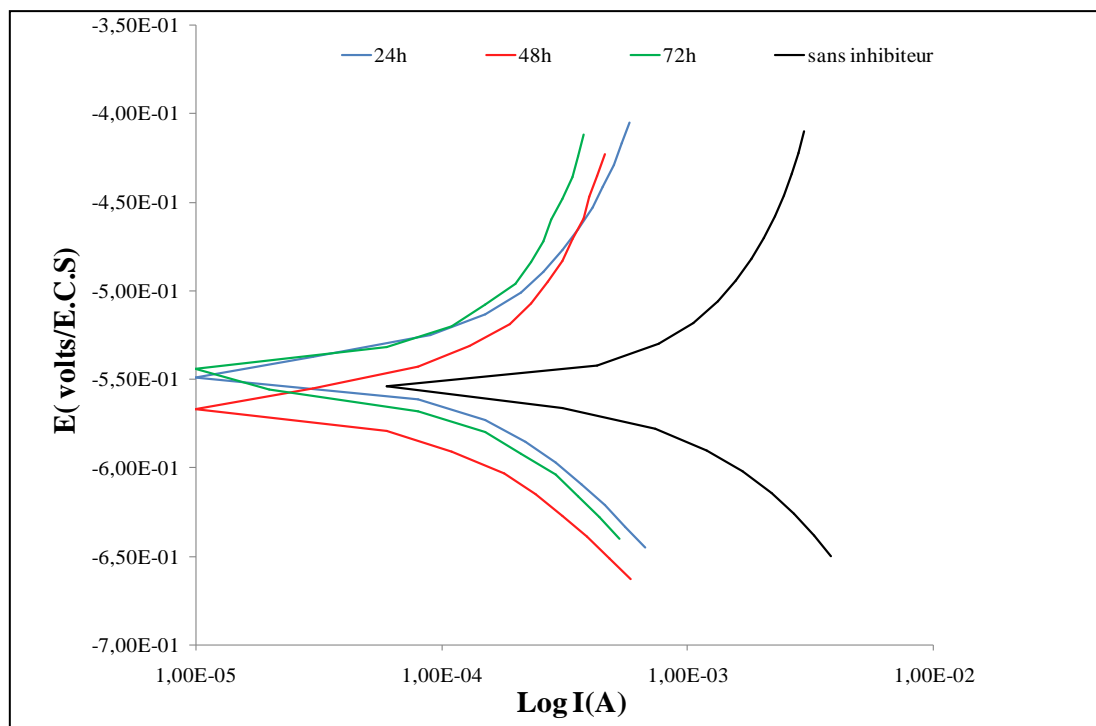


Fig. V.7 : Courbes de polarisation de l’acier X52 sans et avec addition du surnageant en milieu NaCl à température ambiante (24°C).

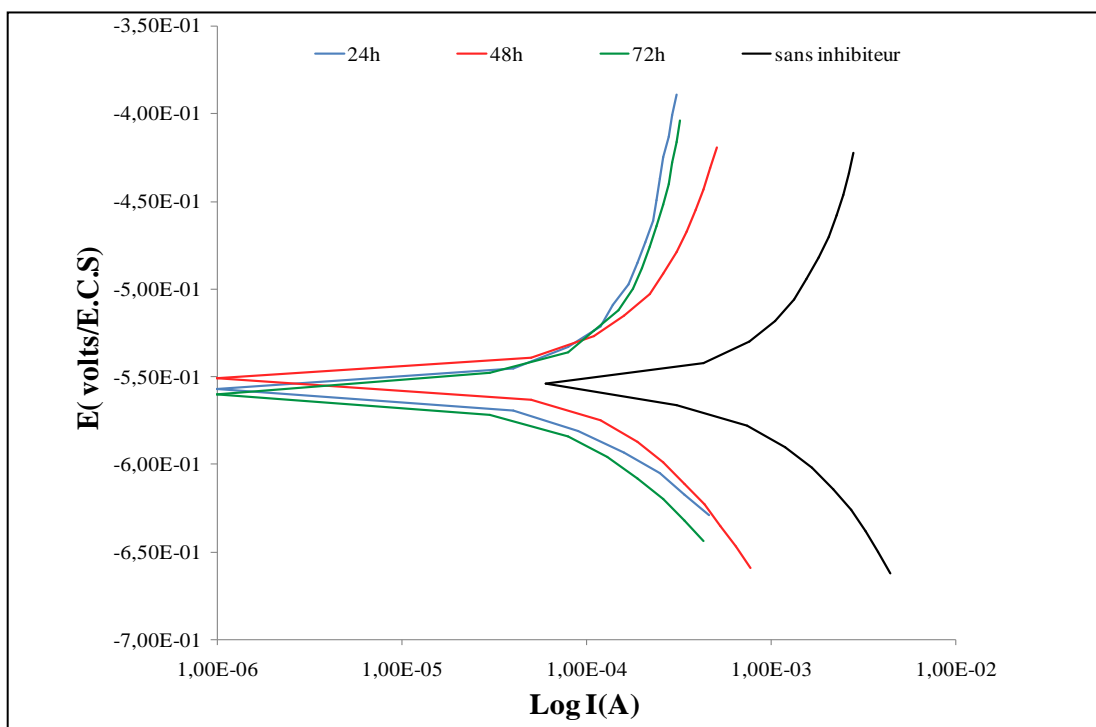


Fig. V.8 : Courbes de polarisation de l’acier X52 sans et avec addition de l’extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à température ambiante (24°C).

Tab.V.2 : Paramètres électrochimiques et efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier X52 dans (NaCl) avec addition des extraits testés.

Extraits	Surnageant			Prodigiosine		
Durée (h)	24	48	72	24	48	72
Paramètres						
I_{corr} (mA/cm ²)	0,684	0,676	0,700	0,076	0,076	0,064
$-E_{\text{corr}}$ (mV)	525	561	562,5	541,5	550	575
E%	90,756	90,864	90,540	98,972	98,972	99,135

I_{corr} (sans inhibiteur) : 7,4 mA/cm².

V.6. Optimisation de la concentration de la prodigiosine

Afin de comprendre le comportement électrochimique du matériau avec l'inhibiteur de corrosion (prodigiosine), nous avons tout d'abord étudié le comportement électrochimique de notre matériau en absence d'inhibiteur puis avec inhibiteur à différentes concentrations et à différentes températures. Le comportement électrochimique a été déterminé par le suivi du potentiel libre et par les mesures de polarisation linéaire.

V.6.1. Comportement électrochimique en l'absence d'inhibiteur

Le milieu corrosif de NaCl à 30 g/L a été choisi pour cette étude. Pour ce milieu, des tests d'immersion d'une heure à différentes température (24°C, 50°C, 80°C) ont été réalisés.

Le suivi du Potentiel en Circuit Ouvert (OCP) permet d'enregistrer les modifications à l'interface entre l'électrode de travail et le milieu. La figure V.9 présente l'évolution du potentiel libre de l'acier X52 après une heure d'immersion dans le milieu NaCl à différentes température (24°C, 50°C et 80°C). Les valeurs de l'OCP extraites à partir des courbes de la figure sont représentées dans le tableau V.3.

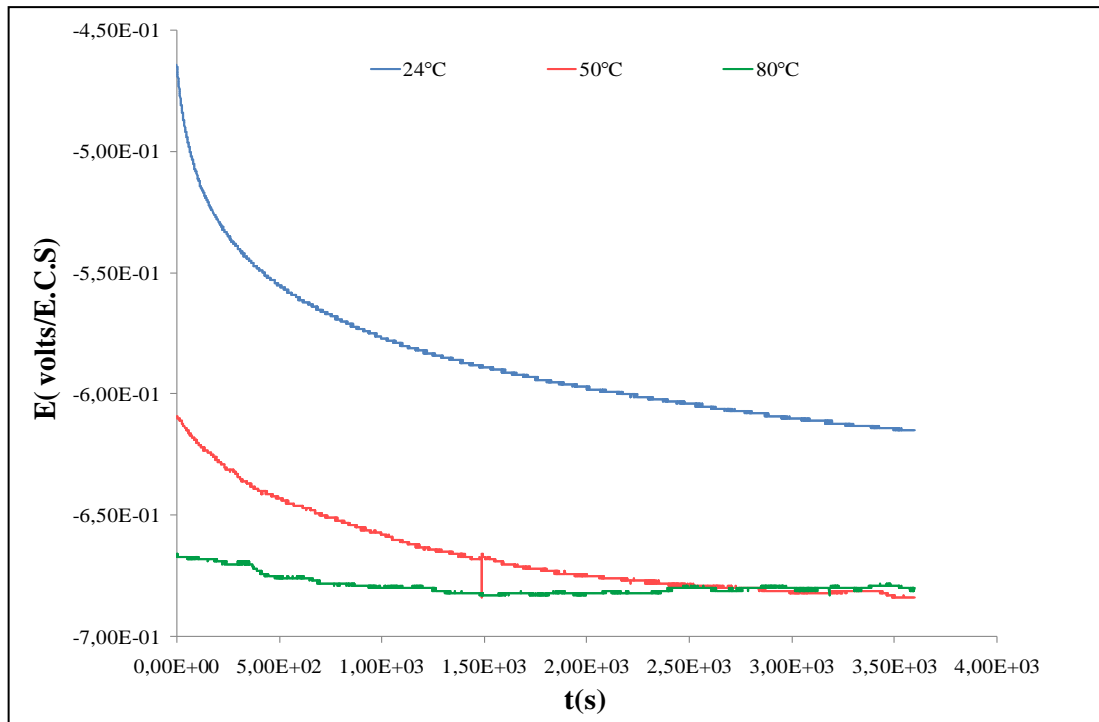


Fig. V.9 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 à différentes températures en milieu NaCl.

Tab. V.3 : Valeurs extraites des courbes du potentiel libre.

Milieu	Températures	Valeurs de l'OCP
NaCl	24°C	-6,15E-01
	50°C	-6,84E-01
	80°C	-6,80E-01

Quelle que soit la température, à l'immersion, les potentiels de départ sont plus élevés, ce qui montre que les pièces ont subi une certaine attaque. Donc, l'évolution du potentiel en fonction du temps est caractéristique d'un mécanisme de corrosion avec formation de produits de corrosion. On remarque que la corrosion, est plus accélérée à températures élevées car les potentiels enregistrés se stabilisent à des valeurs plus négatives. Ceci est confirmé par les résultats illustrés par la figure V.10, qui montrent que les densités de courant de corrosion enregistrées pour des températures élevées, sont supérieures à la valeur trouvée une température ambiante avoisinante 24°C.

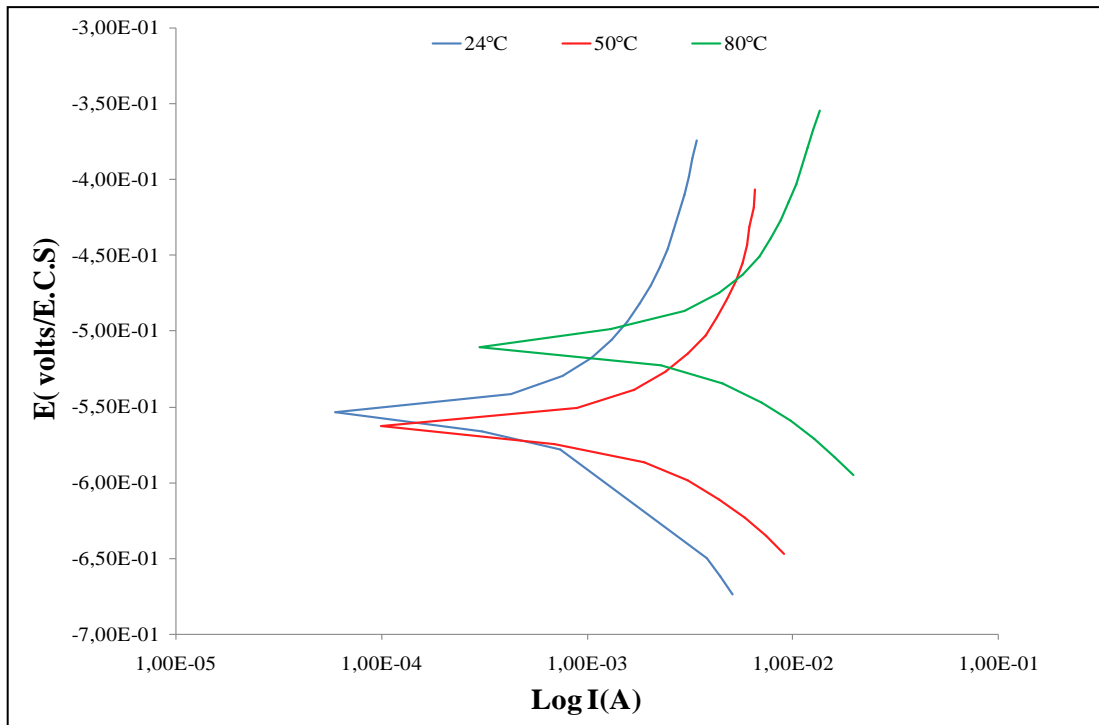
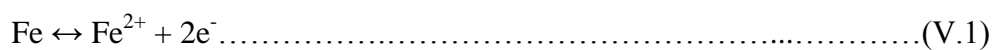


Fig. V.10 : Courbes Intensité-potential de l’acier X52 à différentes températures en milieu NaCl.

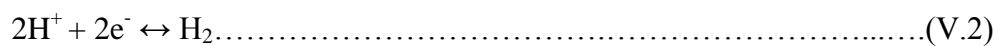
Les courbes de polarisation linéaire, obtenues dans l’intervalle de potentiels -300 à +300 mV/E_{corr} avec une vitesse de balayage de 0,5 mV.s⁻¹, sont présentées dans la figure V.10. Ces courbes ont été tracées après stabilisation de l’OCP (60 minutes) dans le milieu NaCl à différentes température (24°C, 50°C, 80°C).

La courbe intensité-potential évolue depuis le domaine cathodique où on constate une diminution du courant jusqu’à une valeur minimale qui correspond au potentiel de corrosion (E_{corr}). Après cette valeur, la zone anodique apparait avec une forte augmentation du courant par rapport à la partie cathodique ce qui traduit l’oxydation du fer. Les courbes de polarisation montrent deux domaines de potentiel :

- Un domaine d’activation anodique dû à l’oxydation du fer :



- Un domaine d’activation cathodique, où la réaction de réduction de l’acide contrôle le processus cathodique :



Quel que soit le milieu étudié, on remarque une augmentation de la densité du courant de corrosion avec la température qui confirme l'augmentation des cinétiques de corrosion de l'acier avec ce paramètre (température).

En utilisant les droites de Tafel (voir chapitre IV), nous avons déterminé les différents paramètres concernant la cinétique de corrosion à différentes températures dans le milieu utilisé. Le tableau V.4 regroupe ces valeurs.

Tab. V.4 : Valeurs extraites des courbes du Tafel.

Paramètres	Température	Valeurs
I_{corr} (mA/cm ²)	24°C	7,4
	50°C	7,0
	80°C	4,4
$-E_{\text{corr}}$ (mV)	24°C	562,5
	50°C	550
	80°C	550

V.6.2. Comportement électrochimique en présence d'inhibiteur

Le mécanisme d'inhibition par l'extrait de la prodigiosine a été étudié. Dans cette partie, nous avons examiné l'influence de la température et la concentration sur l'efficacité inhibitrice.

A. Suivi du potentiel libre

Les figures V.11, V.12 et V.13 présentent l'évolution du potentiel de corrosion (E_{corr}) au cours d'une heure d'immersion pour les différentes concentrations en extraits de la prodigiosine aux températures 24°C, 50°C et 80°C respectivement. Les courbes obtenues ont été comparées à une courbe de référence obtenue sans inhibiteur (NaCl 30 g/L). Les valeurs de l'OCP sont rassemblées dans le tableau V.5.

Dans le milieu NaCl, quelle que soit la température et la concentration, l'évolution du potentiel d'abandon présente des variations qui caractérisent la corrosion de l'échantillon avec formation de produits de corrosion. Aux températures de 24°C et 50°C

et à n'importe quelle concentration d'inhibition ; la valeur de l'OCP devient plus noble par rapport à sans inhibiteur indiquant que l'extrait de la prodigiosine apporte un effet inhibiteur à la corrosion à ces températures.

A la température de 80°C, le potentiel d'abandon pour le matériau en absence d'inhibiteur est largement supérieur à ceux en présence à différentes concentrations. Ceci implique, que la prodigiosine à température de 80°C accélère le phénomène de corrosion et donc on assistera à une corrosion bactérienne.

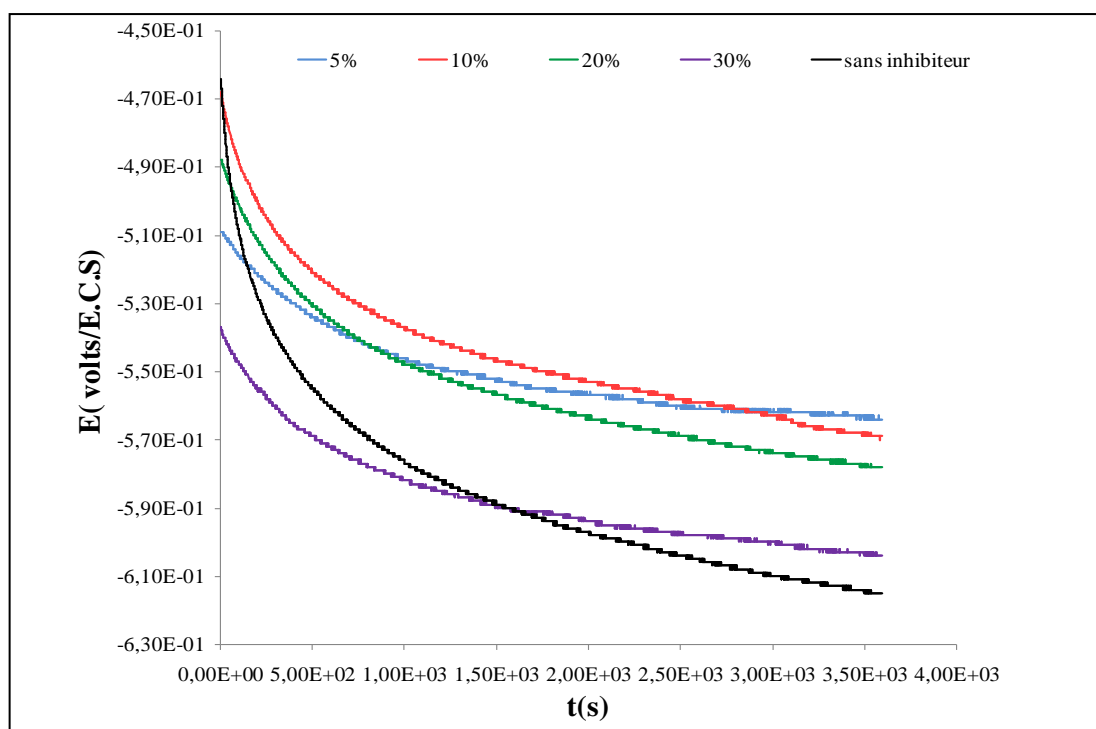


Fig. V.11 : Suivi du potentiel de corrosion de l'acier X52 sans et avec addition de l'extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à température ambiante (24°C).

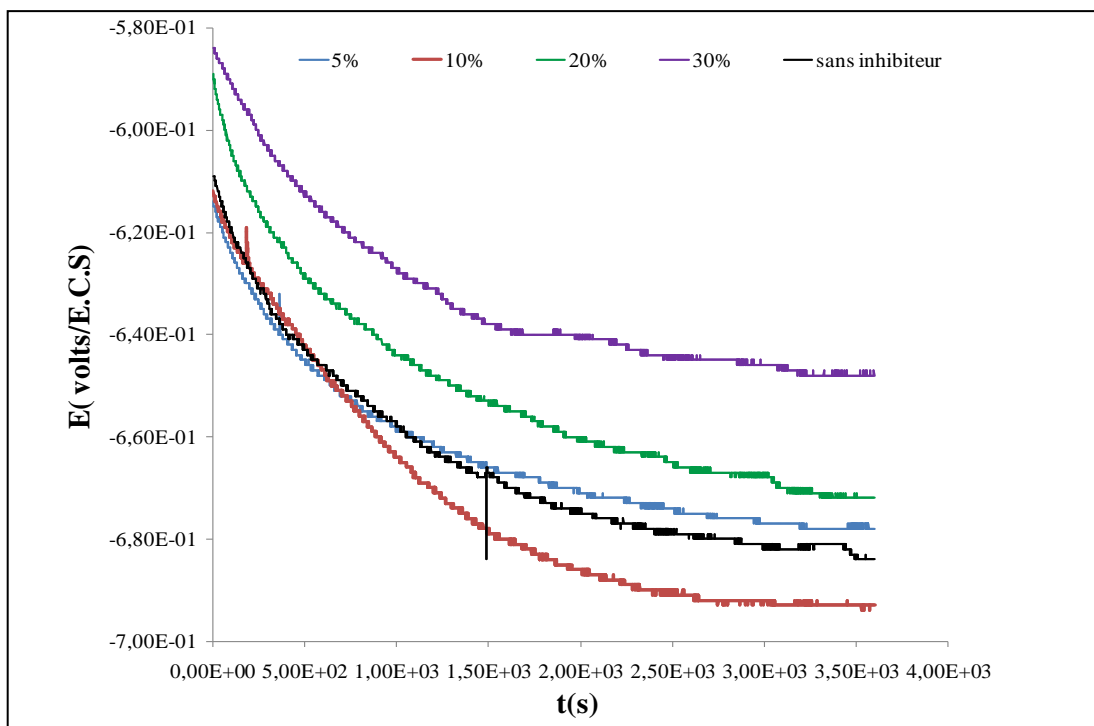


Fig. V.12 : Suivi du potentiel de corrosion de l’acier X52 sans et avec addition de l’extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à 50°C.

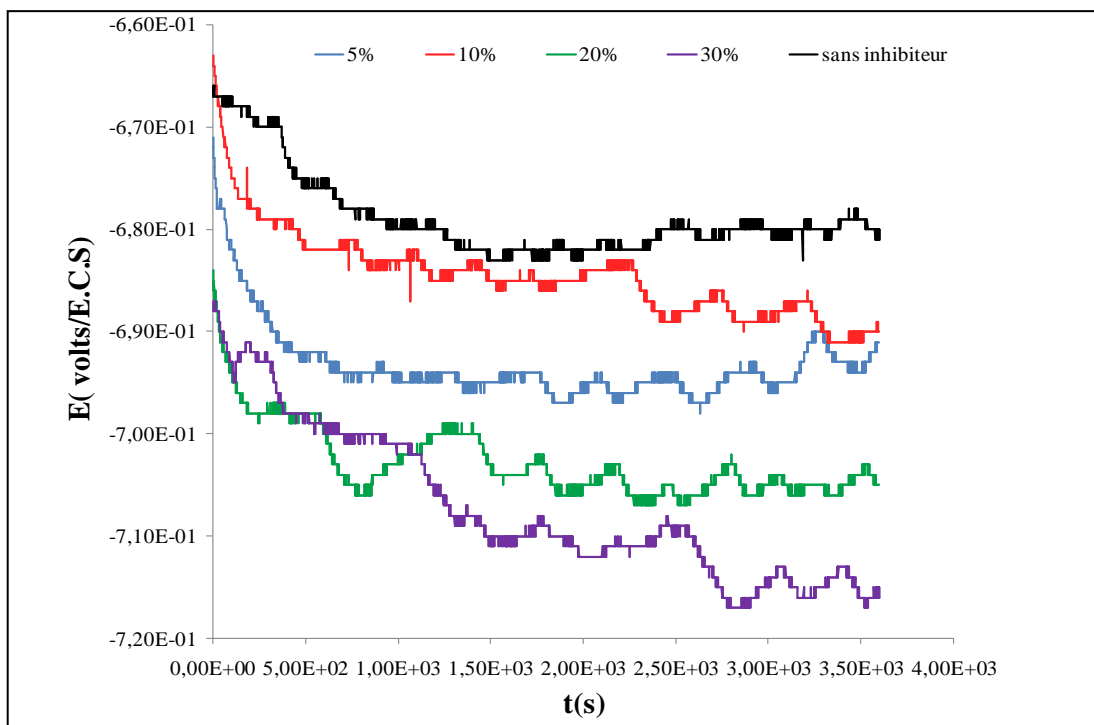


Fig. V.13 : Suivi du potentiel de corrosion de l’acier X52 sans et avec addition de l’extrait de la prodigiosine en milieu NaCl à 80°C.

Tab. V.5 : Valeurs extraites des courbes du potentiel libre pour l'extrait de la prodigiosine.

Concentration	Températures	Valeurs de l'OCP
0%	24°C	-6,15E-01
	50°C	-6,84E-01
	80°C	-6,80E-01
5%	24°C	-5,64E-01
	50°C	-6,78E-01
	80°C	-6,91E-01
10%	24°C	-5,69E-01
	50°C	-6,93E-01
	80°C	-6,90E-01
20%	24°C	-5,78E-01
	50°C	-6,72E-01
	80°C	-7,05E-01
30%	24°C	-6,04E-01
	50°C	-6,48E-01
	80°C	-7,15E-01

B. Courbes de polarisation

Les courbes de polarisation linéaires de l'acier X52 dans le milieu NaCl à différentes concentrations de l'extrait sont présentées dans les figures IV.14, IV.15 et IV.16 ci-dessous. Celles-ci ont été obtenues après 1 heures d'immersion et à des températures de 24°C, 50°C et 80°C respectivement.

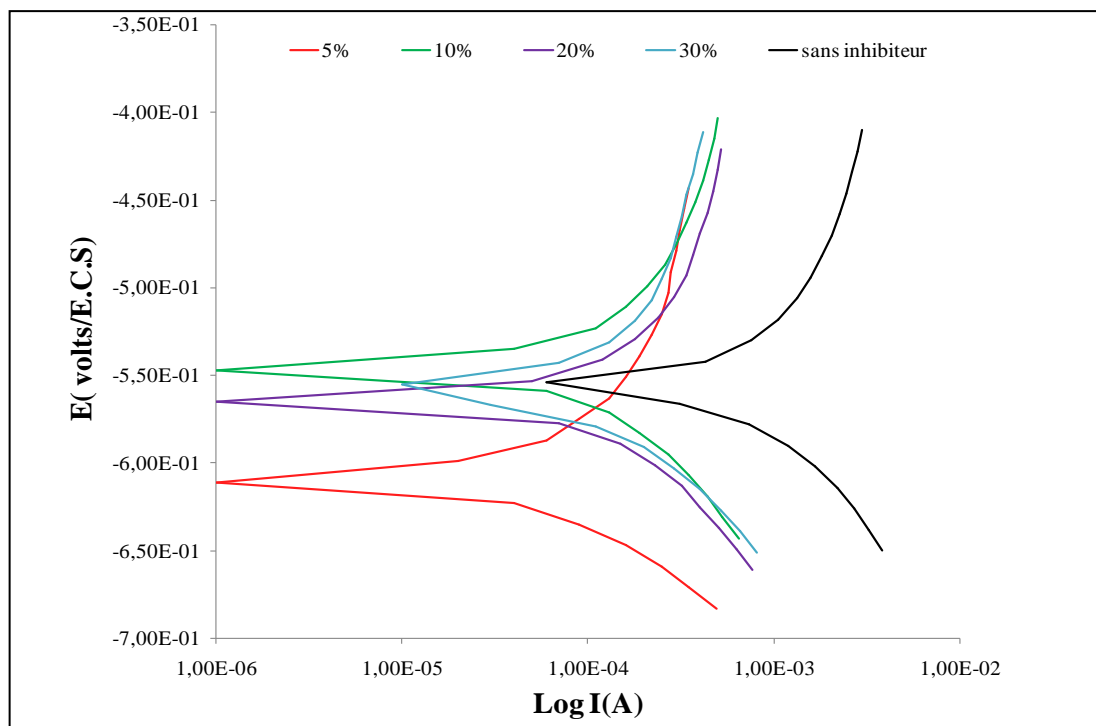


Fig. V.14 : Courbes de polarisation de l’acier X52 sans et avec addition de l’inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à température ambiante (24°C).

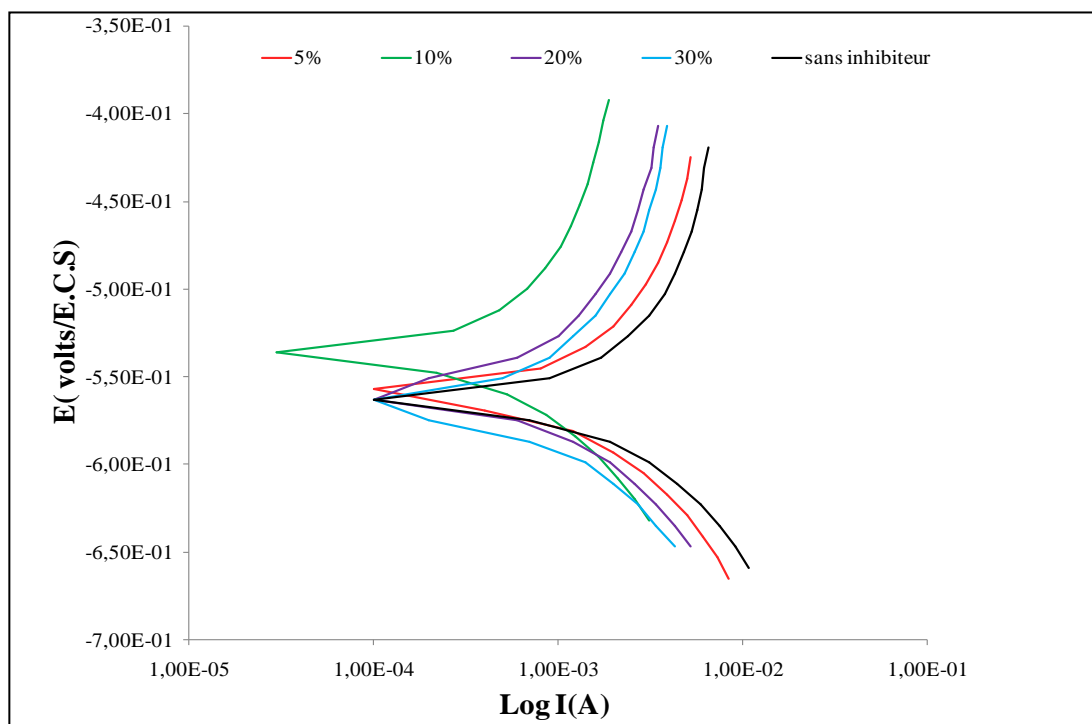


Fig. V.15 : Courbes de polarisation de l’acier X52 sans et avec addition de l’inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à 50°C.

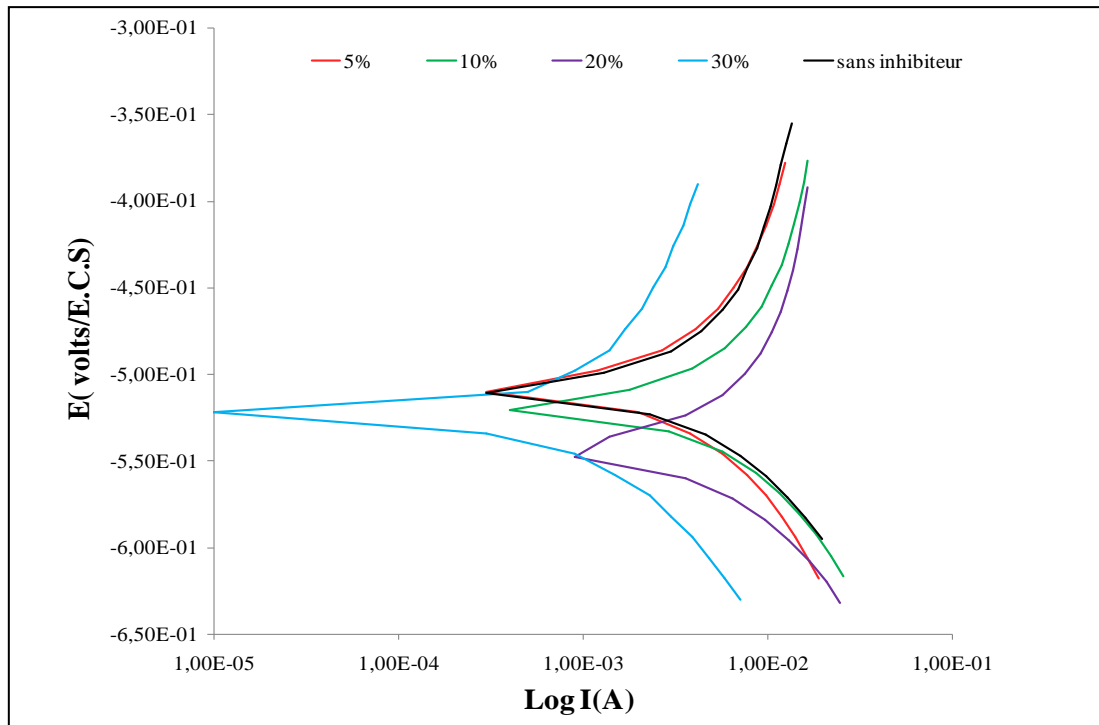


Fig. V.16 : Courbes de polarisation de l'acier X52 sans et avec addition de l'inhibiteur (prodigiosine) en milieu NaCl à 80°C.

En général, les réactions anodiques et cathodiques d'un acier dans une solution de NaCl aérée sont caractérisées par l'oxydation de l'acier et par la réduction de l'hydrogène dissous dans le milieu. L'analyse des tableaux et des courbes de polarisation nous a permis de constater que :

- A température 24°C, une faible différence est observée entre les potentiels de corrosion avec et sans inhibiteur pour les concentrations supérieures ou égales à 10%. Ces observations confirment le caractère mixte de l'inhibiteur et montrent clairement que notre inhibiteur réduit la dissolution anodique de l'acier (décrite par la réaction) ($Fe \leftrightarrow Fe^{2+} + 2e^-$) et retarde l'évolution de la décharge cathodique des protons H^+ ($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$). Pour une concentration de 5%, la différence entre le potentiel avec et sans inhibiteur est trop importante malgré qu'il y'a une diminution du courant de corrosion. Ce qui indique, qu'à cette concentration, l'inhibiteur agit comme un inhibiteur cathodique car le potentiel de corrosion du matériau en présence d'inhibiteur s'est déplacé vers les valeurs les plus négatives en retardant la décharge cathodique par accumulation des produits de corrosion sur les sites cathodiques ;

- L'ajout de l'inhibiteur en solution induit une diminution importante des deux courants partiels anodique et cathodique. Néanmoins, la diminution du courant de corrosion est proportionnelle à la teneur introduite en inhibiteur ;
- A 50°C, la densité du courant de corrosion pour avec et sans prodigiosine est la même pour des concentrations inférieures à 30%. Ce qui implique que l'effet inhibiteur de la prodigiosine n'apparaît pas que pour des concentrations de 10% ;
- Pour cette concentration, l'inhibiteur agit comme un inhibiteur anodique qui retarde plutôt la dissolution du matériau ;
- A 80°C, la prodigiosine n'est pas efficace comme inhibiteur, car les densités de courant de corrosion avec inhibiteur sont trop élevées par rapport au matériau sans inhibition sauf pour une concentration de 30%. L'augmentation de la densité du courant de corrosion est en conformité avec une corrosion accélérée par le produit prodigiosine ;
- A 30% de prodigiosine, l'inhibition est cathodique car le potentiel de corrosion du matériau en présence d'inhibiteur s'est déplacé vers les valeurs les plus négatives.

Le tableau V.6 présente les paramètres électrochimiques de l'acier API X52 extraits à partir des courbes de polarisation.

Tab. V.6 : Paramètres électrochimiques et efficacité inhibitrice de la corrosion de l'acier X52 dans le milieu NaCl avec et sans addition de différentes concentrations de l'extrait de la prodigiosine.

Paramètres	Concentration	0 %	5%	10%	20%	30%
	Température					
I_{corr} (mA/cm ²)	24°C	7,4	0,066	0,06	0,054	0,7
	50°C	7,0	7,12	6,00	7,28	7,6
	80°C	4,4	6,2	4,4	76	0,6
$-E_{\text{corr}}$ (mV)	24°C	562,5	575	583	575	540,5
	50°C	550	566,5	566,5	550	550
	80°C	500	500	550	550	1050

E%	24°C	-	99,189	99,270	90,540	99,108
	50°C	-	-	14,285	-	-
	80°C	-	-	0	-	86,363

L'efficacité inhibitrice de l'extrait atteint des valeurs maximales (99,27%) pour des concentrations de 10% à une température de 24°C dans le milieu NaCl.

V.7. Conclusion

Nous avons examiné dans ce travail, l'inhibition de la corrosion d'un acier API X52 en milieu NaCl en présence de l'extrait de la prodigiosine.

Nous pouvons conclure que :

- L'inhibiteur réagit autant qu'inhibiteurs mixtes à 24°C, anodique à 50°C juste pour une concentration de 50°C et cathodique à 80°C pour la même concentration ;
- L'efficacité inhibitrice atteint sa valeur maximale de 99,27 % pour une concentration de 10 % à une température de 24°C ;
- A des températures élevées, la prodigiosine n'a pas d'effet inhibiteur par contre, même à faibles concentrations, la prodigiosine favorise la corrosion.

Conclusion

Nous avons examiné dans ce travail, l'activité antioxydante et l'efficacité anticorrosive sur l'acier API X52 en milieu NaCl de la prodigiosine produite par une souche de *Serratia marcescens* isolée à partir d'un aliment fermenté traditionnel Algérien. Les résultats trouvés montrent que :

- Après identification et caractérisation sur galerie API 20 E, Notre souche est pure et elle a un caractère envahissant (swarming) ;
- La tension de surface obtenue à 36 heures de culture est un indice de production du surfactant W3 ;
- La spectrophotométrie UV-visible montre que l'absorbance maximale de la prodigiosine a été obtenue à 535 nm ;
- La prodigiosine présente une activité antioxydante importante concernant les trois tests (DPPH : 86,59% ; FRAP : DO = 0,565 nm à une concentration de l'ordre de 20 mg/mL, β -carotène : 61,66% pour une concentration de l'ordre de 2 mg /mL) ;
- L'inhibiteur réagit autant qu'inhibiteurs mixtes à 24°C, anodique à 50°C juste pour une concentration de 10% et cathodique à 80°C pour une concentration de 30% ;
- L'efficacité inhibitrice atteint sa valeur maximale de 99,27% pour une concentration de 10% à une température de 24°C ;
- Le pouvoir réducteur élevé de cette molécule est un indice révélateur de sa capacité anticorrosive, sa capacité d'inhibition du blanchiment du β -carotène montre son caractère liposoluble.

Perspectives

Au terme de cette investigation, nous recommandant ce qui suit :

- Déterminer le caractère physisorbant ou chimisorbant de la prodigiosine ;
- Etudier l'effet de persistance sur l'acier et étendre l'étude sur d'autres matériaux ;
- Etudier et améliorer son statut de stabilité à différentes conditions physicochimiques et hydrodynamiques ;
- Définir un milieu de culture permettant une production maximale de la molécule ;
- Mettre au point aux bio-précédés adaptés à la bactérie pour une production en grande quantité de la molécule.

Annexe I : Appareillage

- Autoclave de laboratoire vertical NÜVE
- Agitateur magnétique chauffant IKA® C-MAG HISIO
- Agitateur vortex VWR VV3
- Balance analytique de précision OHAUS®
- Bin marie Memmert
- Congélateur réglé à -20°C Electrostar
- Centrifugeuse de paillasse réfrigérée SIGMA 1-15PK
- Etuve de stérilisation WTE binder
- Etuve réglée à 30°C Memmert
- Microscope binoculaire optique ZEISS
- pH mètre HANNA pH 211
- Réfrigérateur réglé à 4°C Electrostar
- Spectrophotomètre à double faisceau OPTIZEN 2120 UV
- Potentiostat, Radiomètre PGP 201, piloté par le logiciel Voltmaster 4
- Cellule électrochimique de mesure (150 cm³) en verre pyrex de forme cylindrique à double parois thermostaté, aux coté du cylindre des rodages coniques
- Mico-ordinateur DELL muni des logiciels d'acquisition des données
- Agitateur rotatif (Shaker) Excella® réglé à 30°C et agitation de 160 rpm

Annexe II : Produits chimiques

- Peptone
- Chlorure de sodium (NaCl)
- Agar Agar
- Ethanol absolu
- Violet de gentiane
- Fushine
- Méthanol absolu
- Eau oxygénée à 20 volumes
- Huile de paraffine stérile
- Huile à immersion
- Hydroxyde de sodium (NaOH)
- Acide chlorhydrique (HCl)
- Lugol

- Réactif Arginine Di Hydrolase (ADH)
- Réactif lysine décarboxylase (LDC)
- Réactif Ornithine Décarboxylase (ODC)
- Réactif Tryptophane Désaminase (TDA)
- Réactif Voges-Proskauer 1 (PV1)
- Réactif Voges-Proskauer 2 (PV2)
- Nitrate 1 et Nitrate 2
- Poudre de zinc
- Réactif DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazil)
- Acide ascorbique
- Hydroxytoluène Butylé (BHT)
- Tampon phosphate
- Ferricyanure de potassium $K_3Fe(CN)_6$ 1%
- Acide trichloroacétique à 10%
- $FeCl_3$ à 0,1%
- β -carotène
- Chloroforme
- Acide linoléique
- Tween 40
- Eau distillée saturée en oxygène

Annexe III : Milieux de culture

- Bouillon LB (Lurai Bertani)
- Gélose LBA (Lurai Brrtani Agar)

Annexe IV : Compositions des milieux de culture

Tab. 1 : Composition du bouillon LB.

Constituant	Quantité
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Extrait de levure	5 g
Eau distillée	1000 mL

- pH = 7,2 ;

- Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Tab. 2 : Composition de la gélose LB.

Constituant	Quantité
Peptone	10 g
Chlorure de sodium	10 g
Extrait de levure	5 g
Agar Agar	20 g
Eau distillée	1000 mL

- pH = 7,2 ;
- Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Annexe V : Préparation du tampon phosphate

- **Solutions mères**

- Phosphate de sodium dibasique 0,2 M (35,61 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau distillée) ;
- Phosphate de sodium monobasique 0,2 M (31,21 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau distillée).

- **Tampon du travail**

Pour obtenir un pH de 6,6, mélanger 18,75 mL de phosphate de sodium dibasique 0,2 M et 31.25 mL de phosphate de sodium monobasique 0,2 M.

Annexe VI : Evolution des cultures de la souche de *Serratia marcescens* en fonction de la durée d'incubation

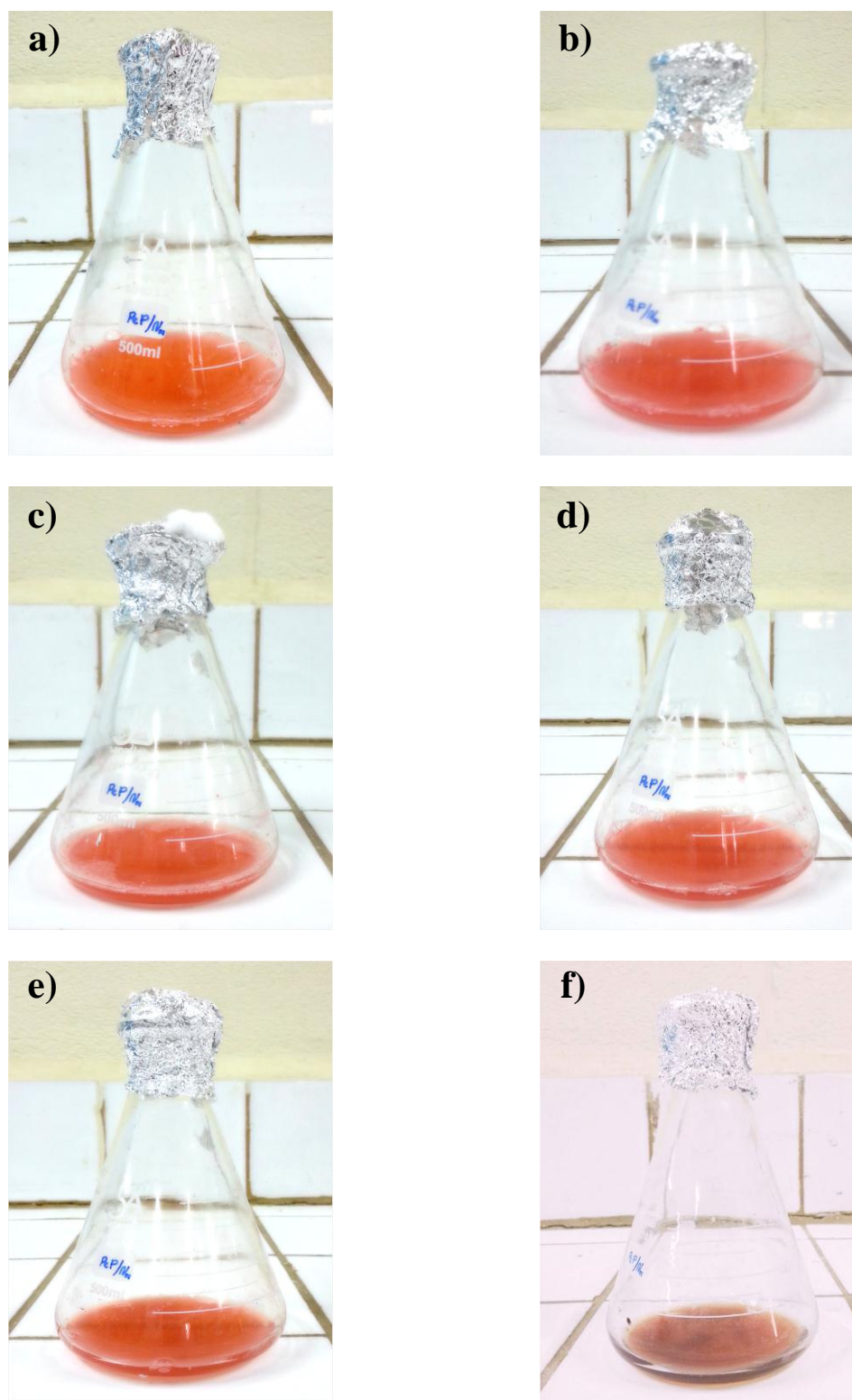


Fig. 1 : Cinétique de croissance et de production des métabolites : a) Après 24 heures, b) Après 84 heures, c) Après 72 heures, d) Après 96 heures, e) Après 192 heures.

Annexe VII : Chaine électrochimique

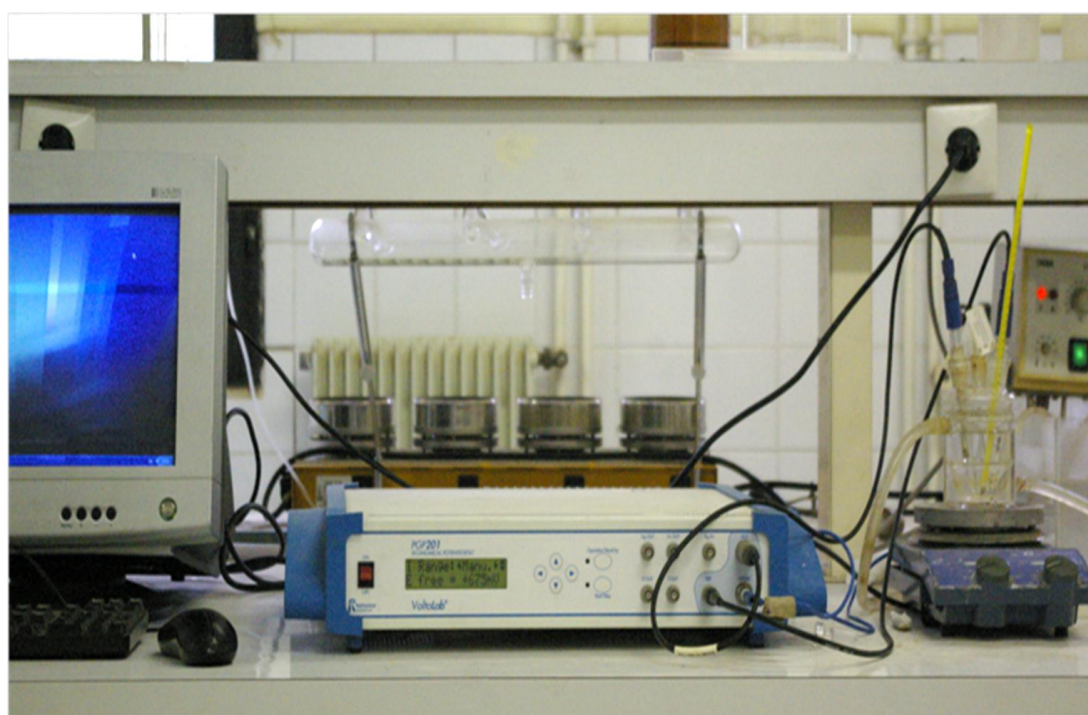


Fig. 1 : Chaine électrochimique.

Annexe VIII : Courbes d'étalonnages

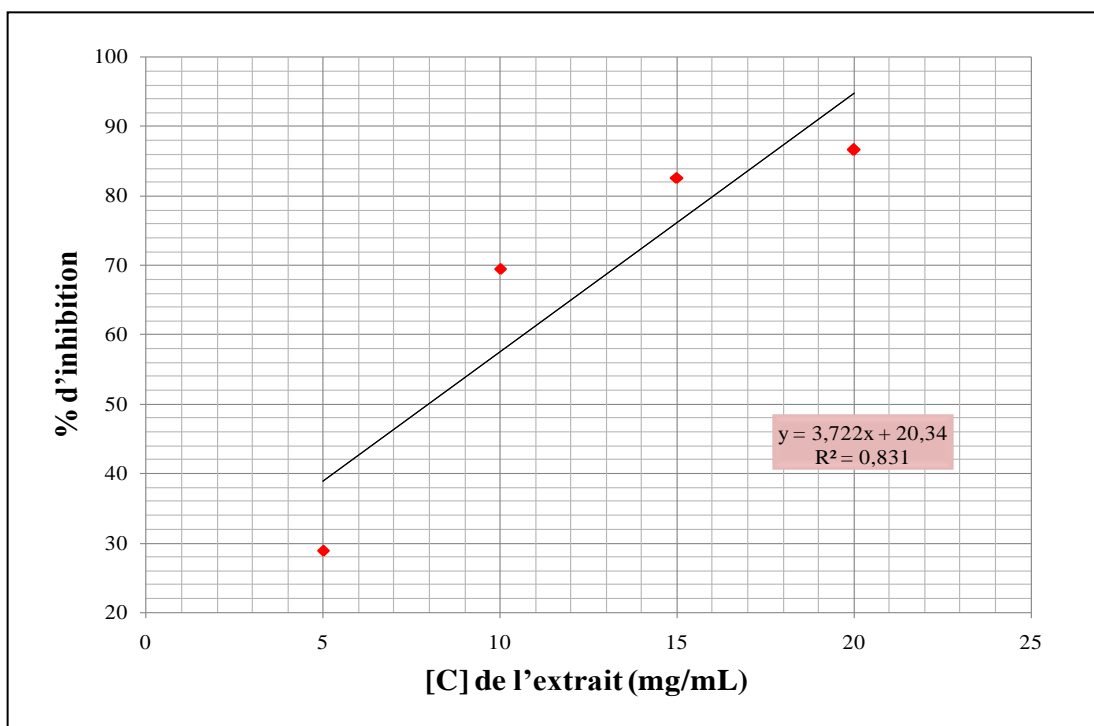


Fig. 1 : % d'inhibition du DPPH en fonction des concentrations de l'extrait de la prodigiosine.

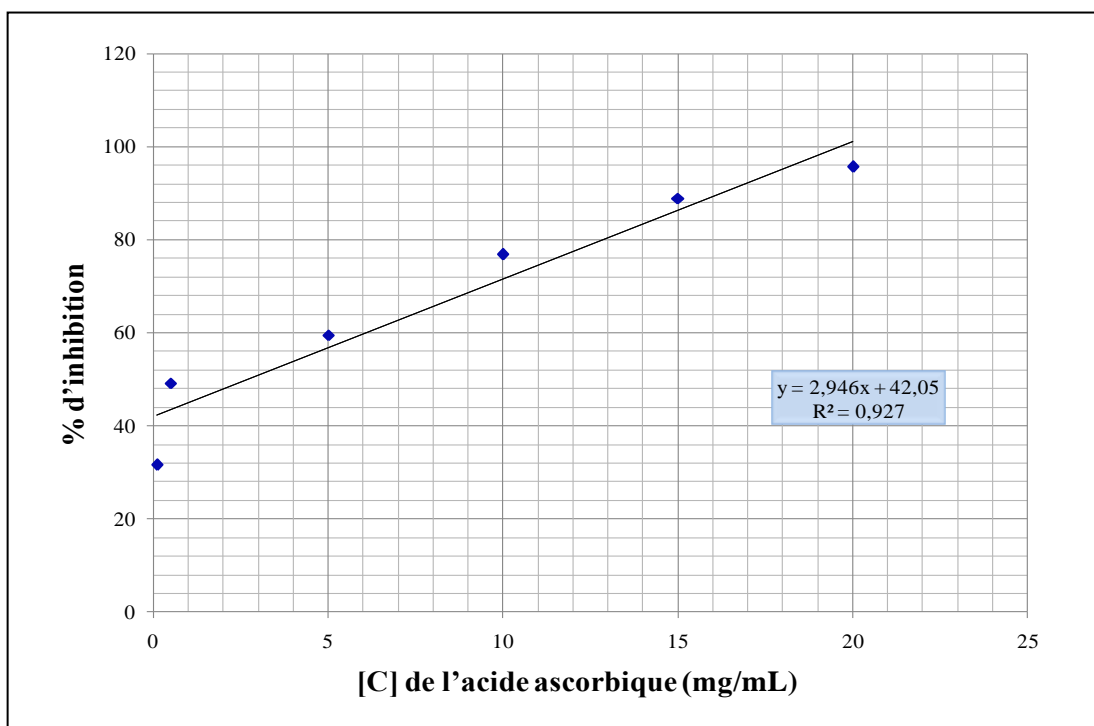


Fig. 2 : % d'inhibition du DPPH en fonction de différentes concentrations de l'acide ascorbique.

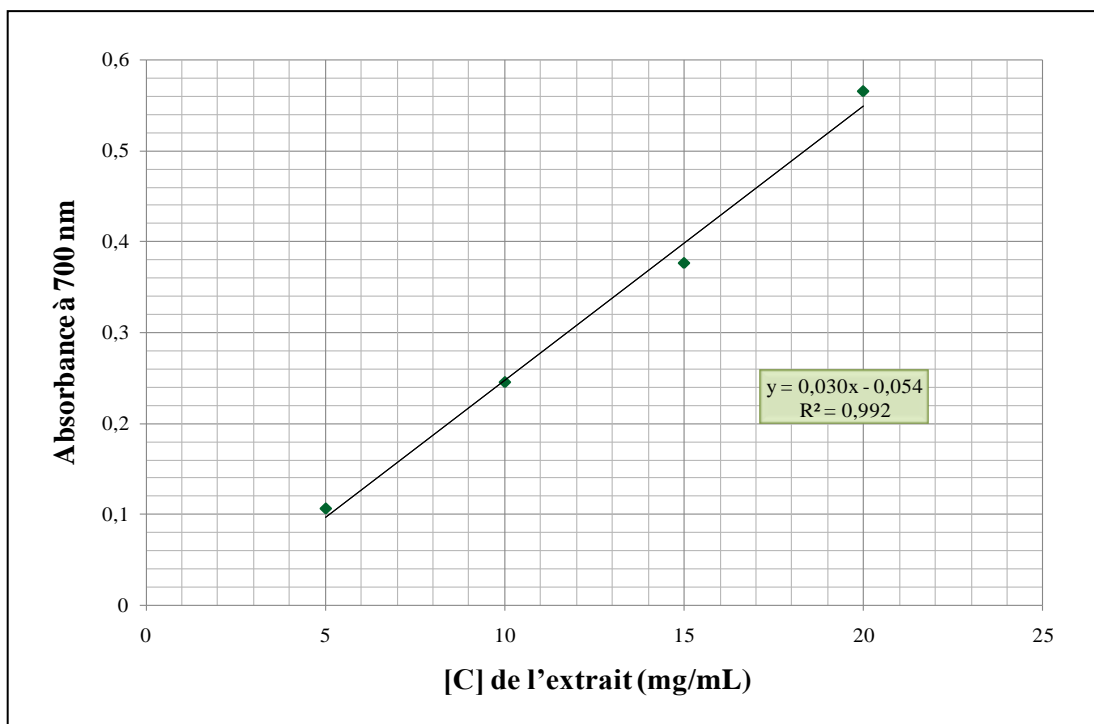


Fig. 3 : Pouvoir réducteur de l'extrait de la prodigiosine.

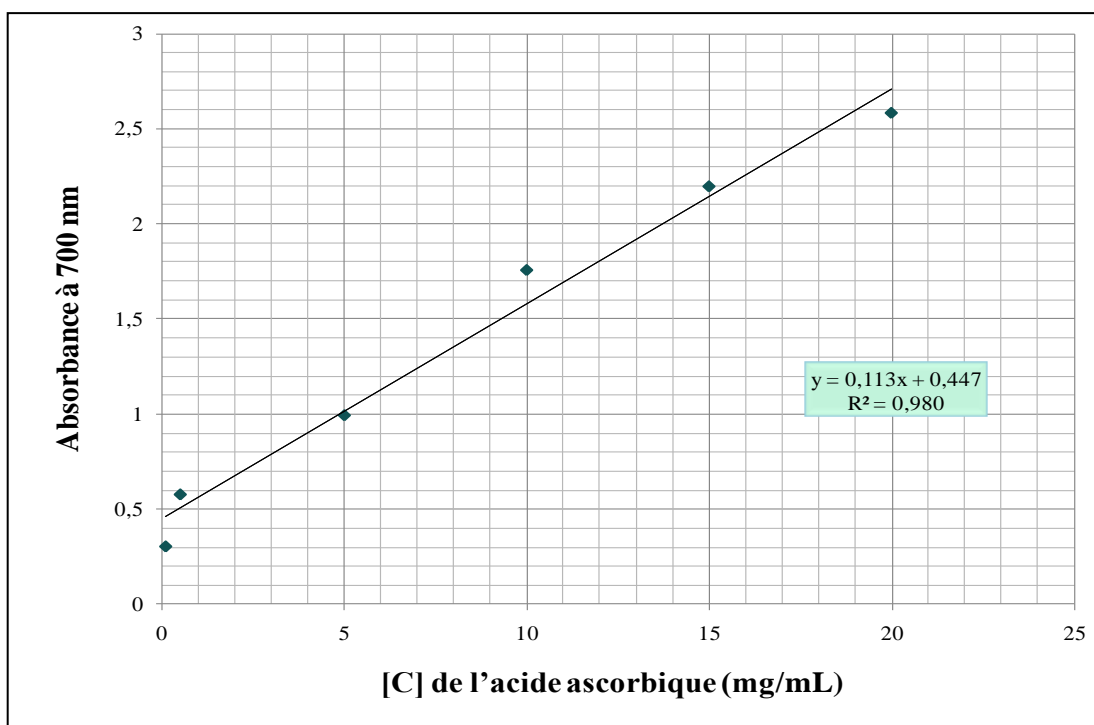


Fig. 4 : Pouvoir réducteur de l'acide ascorbique.

Bibliographie**(A)**

Abiola, O. K., Tobun, Y., (2010). Chinese Chemical Letters.

Ahmad, A.S., Ahmad, W.Y.W., Zakaria, Z.K., Yosof, N.Z., (2012). Applications of bacterial pigments as colorant: the Malaysian perspective. New York : Springer Briefs in Molecular Science.

Al-Araji, L., Abd Rahman, R.N.Z.R., Basri, M., Salleh, A.B., (2007). Minireview : Microbial Surfactant. (AsPac) J. Mol. Biol. Biotechnol., Vol. 15, n°3, 99-105.

Assouli B., (2002). Etude par émission acoustique associée aux méthodes électrochimiques de la corrosion et de la protection de l'alliage cuivre zinc (60/40) en milieu neutre et alcalin. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Athamena, S., Chalghem, I., Kassah-Laouar, A., Laroui, S., Khebri, S., (2010). Activité anti-oxydante et antimicrobienne d'extraits de *Cuminum cyminum* L. Lebanese Science Journal, Vol. 11, n°1.

(B)

Babouri, L., (2008). Etude de la résistance à la corrosion des alliages de cuivre en milieu salin. Mémoire de magister, Université de Skikda.

Benhammou, N., (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd de Tlemcen.

Benmessaoud Left, D., Zertoubi, M., Irhzo, A., Azzi, M., (2013). Huiles et Extraits de plantes comme inhibiteurs de corrosion pour différents métaux et alliages dans le milieu acide chlorhydrique. J. Mater. Environ. Sci., 4(6), 855-866.

Béranger, G., Mazille, H., (2002). Les facteurs de la corrosion/ prévention et lute contre la corrosion. Anglet, (Théma- Cor 2002) ID2, 1-16.

Bertoncelj, J., Dobersek, U., Jamnik, M., Golob, T., (2007). Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. Food Chemistry, Vol. 105, 822-828.

Bharmal, M., Jahagirdar, N., Aruna, K., (2012). Study on optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* MSK1 isolated from air, I.J.A.B.R., vol. 2(4), 671-680.

Bommersbach, P., (2005). Evolution des propriétés d'un film inhibiteur de corrosion sous l'influence de la température et des conditions hydrodynamiques. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Bougandoura, N., Bendimerad, N., (2013). Evaluation de l'activité antioxydante des extraits aqueux et méthanolique de *Satureja calamintha ssp. Nepeta* (L.) Briq. Nature & Technologie, n°09, 14-19.

Bougatef, A., Hajji, M., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M., (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food. Chem, 114, 1198-1205.

Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., Igic, R., (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum L., Alliaceae*), Food Chemistry, Vol. 111, 925-929.

Bullock, J.D., Hamilton, D., Hulme, M.A., Powell, A.J., Smalley, H.M., Shepard, D., Smith, G.N., (1965). Metabolic development and secondary biosynthesis in *Penicillium urticae*. Can. J. Microbiol, 11, 765-778.

(C)

Chandni, G., Sourav, B., Arijit, D., (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials Malaysian. Journal of Microbiology, Vol 8(2), 116-122.

Crolet, JL., (2002). Coût de la corrosion/ prévention et lute contre la corrosion. Anglet, (Théma- Cor 2002) ID1., 1-20.

(D)

Dariva, C.G., Galio, A.F., (2014). Corrosion Inhibitors – Principles, Mechanisms and Applications. InTech, Chapter 16, 367-372.

Darshan, N., Manonmani, H.K., (2015). Prodigiosine and its potentiel applications. J. Food Sci. Technol., 52(9), 5393-5407.

Daufin, G., Talbot, J., (1971). Etude de quelques problèmes de corrosion dans l'industrie laitière. Première partie. Généralités sur la corrosion des métaux et alliages. Le Lait, 51 (507), 375-398.

Deng, W., Lin, P., Li, Q., Mo, G., (2013). Ultrafine-grained copper produced by machining and its unusual electrochemical corrosion resistance in acidic chloride pickling solutions. Corrosion Science, 74(0), 44-49.

Desai, J. D., Banat, I. M., (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 47-64.

(E)

Eliades, T., Athanasiou, A.E., (2002). In vivo aging of orthodontic alloys: implications for corrosion potential, nickel release, and biocompatibility. *Angle Orthod.*, 72, 222-237.

(F)

Feng, J., Shi, W., Zhang, S., Zhang, Y., (2015). Identification of new compounds with high activity against stationary phase *Borrelia burgdorferi* from the NCI compound collection. *Emerging Microbes and Infections*, 1-15.

Fiaud, C., (1990). Inhibiteurs de corrosion. *Techniques de l'ingénieur*, COR1005.

Fiaud, C., Lemaitre, N., Pebère, N. Inhibiteurs de Corrosion in : Beranger. G., Mazille. H., (2002). *Corrosion et anticorrosion. Mécanique et ingénierie des matériaux*, Lavoisier. Paris, Hermès Science Publications, 245-266.

Flemming, H.C., (1996). Biofouling and microbiologically influenced corrosion (MIC) an economical and technical overview. In : Heitz, E., Sand, W., Flemming, H.C. (eds.). *Microbial Deterioration of Materials*, Springer, Heidelberg, 514p.

Fontana, M.G., Greene, N.D., (1978). *Corrosion Engineering*, Mc Graw-Hill book CY Inc., New York, London.

(G)

Giri, AV., Anandkumar, N., Muthukumar, G., Pennathur, G, (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil, *BMC Microbiol.*, 4(11), 2-14.

Guiraud, J.P., (1998). *Microbiologie alimentaire*, 2^{ème} Ed. Dunod, Paris, 310-321.

Gulani, C., Bhattacharya, S., Das, A., (2012). Assessment of process parameters influencing the enhanced production of prodigiosin from *Serratia marcescens* and evaluation of its antimicrobial, antioxidant and dyeing potentials. *Malaysian J Microbiol.*, 8(2), 116-122.

(H)

Hadj meliani, M., (2009). Approche globale à deux paramètres ($K\rho$ - $T\rho$) Estimation des contraintes de confinements dans des structures portant des entailles. Thèse de doctorat, Université Paul Verlaine de Metz, Île du Saulcy.

Hardjito, L., Huq, A., Colwell, R., (2002). The influence of environmental conditions on the production of pigment by *Serratia marcescens*. Biotechnol. Bioprocess Eng., 7, 100-104.

Hejazi, A., Falkiner, F.R., (1997). *Serratia marcescens*. J. Med. Microbiol., Vol. 46, 903-912.

Hines, D.A., Saurugger, P.N., Ihler, G.M., Benedik, M.J., (1988). Optimization study of Prodigiosin pigment. J. Bacteriol., 170, 4141.

Hireche, M., (2013). Dosage des polyphénols de la tomate et étude de leur pouvoir anti oxydant. Mémoire de Master, Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef.

(I)

Ichchou, I., (2011). Étude électrochimique de l'inhibition classique ou par des monocouches auto-assemblées d'un dérivé de la thiourée, vis-à-vis de la corrosion en milieu acide de l'acier au carbone XC38. Mémoire de Magister, Université de Tlemcen.

(J)

Jaubert, L., (2004). Etude de la corrosion uniforme d'aciers non alliés et inoxydables : utilisation conjointe de l'émission acoustique et des techniques électrochimiques. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Jong Suk, S.L., Yong-Sook, K., Sooyeon, P., Jihoon, K., So-Jung, K., Mi-Hwa, L., Sangryeol, R., Jong-Myoung, C., Tae-Kwang, O., Jung-Hoon, Y., (2011). Exceptional Production of both Prodigiosin and Cycloprodigiosin as major metabolic constituents by a novel marine bacterium, *Zooshikella rubidus* S1-1. Applied and environmental microbiology, Vol. 77, n°14, 4967-4973.

(K)

Kartal, N., Sokmen, M., Tepe, B., Daferera, D., Polissiou, M., Sokmen, A., (2007). Investigation of the antioxidant properties of *Ferula orientalis* L. using a suitable extraction procedure. Food Chemistry, 100, 584-589.

Kenniche, K., (2014). Etude de l'efficacité de deux inhibiteurs bio sur l'acier API 5L X52. Mémoire de Master, Université de Hassiba Ben Bouali de Chlef.

Khanafari, A., Assadi, M.M., Fakhr, F.A., (2006). Review of Prodigiosin, Pigmentation in *Serratia marcescens*. Online Journal of Biological Sciences, 6(1), 1-13.

(L)

Lin, J., Ballim, R., (2012). Biocorrosion control : Current strategies and promising alternatives. African Journal of Biotechnology, Vol. 11(91), 15736-15747.

Lorbeer, P., Lorenz, W.J., (1980). Electrochim. Acta, 25, 375.

(M)

Madora, N., (2011). Etude de l'effet d'inhibition des composants dithiole thiones et sont sel dérive dans le milieu H₂SO₄. Mémoire de Master, Université de Ouargla.

Marchal, N., Bourdon, J.L., Richard, C.L., (1987). Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Ed. Doin, Paris, 109-161.

Marco, G.L., (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants, J. Am. Oil Chem. Soc., 45, 594-8.

Matsuyama, T., Murakami, T., Fujita, M., Fujita, S., Yanol, I., (1986). Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. Journal of General Microbiology, 132, 865-875.

Mehanna, M., (2009). Mécanismes de transfert direct en corrosion microbienne des aciers : Application à *Geobacter sulfurreducens* et à l'hydrogénase de *Clostridium acetobutylicum*. Thèse de doctorat, Université de Toulouse.

Merouane, A., Noui, A., Medjahed, H., Nedjari Benhadj Ali, K., Saadi, A., (2014). Activité antioxydante des composés phénoliques d'huile d'olive extraite par méthode traditionnelle. Int. J. Biol. Chem. Sci., 8(4), 1865-1870.

Meziti, A., (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa L.* Étude in vitro et in vivo. Mémoire de Magister, Université El-haj Lakhdar de Batna.

Miller, H.E., (1971). Simplified method for the evaluation of antioxidants, Journal of the American Oil Chemists' Society, 48(2), 91-97.

Montaner, B., Navarro, S., Piqué, M., Vilaseca, M., Martinell, M., Giralt, E., Gil, J., Pérez-Tomàs, R., (2000). Prodigiosin from the supernatant of *Serratia marcescens* induces apoptosis in haematopoietic cancer cell lines. British Journal of Pharmacology, 131, 585-593.

Mulligan, C.N., Young, R.N., Gibbs, B.F., (2001), Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil : a review. Engineering Geology, 60, 371-380.

(N)

Natarajan, K. A., (2014). Biofilms and general mechanisms in biocorrosion. NPTEL, 5p.

National Association of Corrosion Engineers (NACE International), (2007).

Norme Internationale ISO 8044 (1999).

(O)

Oyaizu, M., (1986). Studies on products of browning reaction- Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition, 44, 307-315.

(P)

Pandey, R., Chander, R., Sainis, K.B., (2009). Prodigiosins as anti cancer agents : living upto their name. Curr. Pharm. Des., 15(7), 732-41.

Prabhu, Y., Phale, P., (2003). SB PP2 Novel metabolic pathway, role of biosurfactant and cell surface hydrophobicity in hydrocarbon assimilation. Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol. 61, 342-351.

PubChem, (2007). (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5351169#section=Top>).

(R)

Redon, N., (2012). Resistance a la corrosion des fils Copper Ni-Ti 35® et des fils acier inoxydable multibrins D-Rect® en milieu acide. Mémoire pour l'obtention du Certificat d'Etudes Cliniques Spéciales Mention Orthodontie, Université de lorraine.

Riggs, O.L., (1973). Theoretical aspects of corrosion inhibitors and inhibition, Corrosion inhibitors. C.C. Nathan, Ed. NACE, Houston, 7-27.

Rochaix, C., (1996). Electrochimie. Thermodynamique – Cinétique. Paris, Nathan, 239p.

(S)

Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M., Khoshnoodi, M., (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. Food Control, 18, 800-805.

Stern, M., Geary, A.L., (1957). Electrochimie.

Suryawanshi, RK., Patil, CD., Borase, HP., Narkhede, CP., Stevenson, A., Hallsworth, JE., Patil, SV., (2015). Towards an understanding of bacterial metabolites prodigiosin and violacein and their potential for use in commercial sunscreens. Int. J. Cosmet. Sci., 37(1), 98-107.

(T)

Tao, J.L., Wang, X.D., Shen, Y.L., Wei, D.Z., (2005). Strategy for the improvement of prodigiosin production by a *Serratia marcescens* mutant through fed-batch fermentation. World J. Microbiol. Biotechnol., 21, 969-972.

(U)

Usher, KM., Kaksonen, AH., Cole, I., Marney, D., (2014). Critical review : Microbially influenced corrosion of buried carbon steel pipes. International Biodeterioration and Biodegradation, 93(0), 84-106.

(V)

Vandecasteele, J. P., (2008). Petroleum Microbiology, Ed. TECHNIP, Paris, 816p.

Velazquez, E., Tournier, H.A., De Buschiazzo, P.M., Saavedra, G., Schinella, G.R., (2003). Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. Fitoterapia, 74, 91-97.

Videla, H. A., (2003). Biocorrosion and biofouling of metals and alloys of industrial usage. Present state of the art at the beginning of the new millennium. Rei. Metal. Madrid. Vol. Extr., 256-264.

Videla, H. A., Herrera, L. K., (2005). Microbiologically influenced corrosion : looking to the future. International microbiology, 8, 169-180.

Vora, J.U., Jain, N.K., Modi, H.A., (2014). Extraction, Characterization and Application studies of red pigment of halophile *Serratia marcescens* KH1R KM035849 isolated from Kharaghoda soil. Int. J. Pure App. Biosci., 2(6), 160-168.

(W)

West, C.C., Harwell, J.H., (1992). Surfactants and subsurface remediation, Environ. Sci. Technol., 36(12), 2324-2330.

Williams, R.P., (1973). Biosynthesis of prodigiosin, a secondary metabolite of *Serratia marcescens*. Applied Microbiology Mar., Vol. 25, n°3, 396-402.

Williams, R.P., Green, J.A., Rappoport, D.A., (1955). Studies on pigmentation of *Serratia marcescens* : Spectral and paper chromatographic properties of prodigiosin, J. Bacteriol., 71, 115-120.