

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : *Pharmacie Industrielle*

Intitulé du mémoire

**Élaboration, étude de l'activité antibactérienne et évaluation
toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂**

Présenté par :

CHANANE Lamia

Dirigé par :

Dr. H. IMOUDACHE

Melle. N. MAKAOUI

Année universitaire 2018/2019

Résumé

L'objectif de ce travail est la synthèse et l'étude de l'effet antibactérien et toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂. Quatre échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ ont été synthétisés, à différents pH et températures, par voie chimique « Sol-gel ». La caractérisation par EDX-MEB et DLS a confirmé la composition chimique ainsi que la taille des particules des nanocomposites d'Ag-TiO₂ qui été de 60 à 70 nm. Dans le but de prouver l'effet de synergie des nanocomposites d'Ag-TiO₂, une étude comparative de l'effet antibactérien des 04 échantillons synthétisés et des NPs de TiO₂, a été réalisée sur quatre souches antimicrobiennes. Les résultats obtenus ont démontré que les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj), synthétisés à un pH fortement acide, présentent le meilleur effet bactéricide et bactériostatique notamment contre la bactérie à Gram négatif *Pseudomonas aeruginosa*. Les tests in vivo sur animal « Test de toxicité » des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) et « Effet irritant » d'une pommade élaborée à base de ces nanocomposites ont été réalisés conformément aux protocoles de l'OCDE, ont démontré la sécurité de ces produits.

Mots clés : nanocomposites, Ag-TiO₂, voie sol-gel, effet antibactérien.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو إعداد ودراسة التأثير المضاد للبكتيريا والتأثير السام لمركبات نانوية تدعى الفضة / أكسيد التيتانيوم. تم تصنيع أربعة عينات من مركبات الفضة / أكسيد التيتانيوم النانوية، عند درجة حموضة ودرجة حرارة مختلفة، وهذا بواسطة طريقة كيميائية تسمى «صول-جل». أكدت دراسة الميزات الهيكلية بواسطة مسح المجهر الإلكتروني إلى جانب طيف تشتت الطاقة، التركيب الكيميائي وحجم جسيمات مركبات الفضة / أكسيد التيتانيوم النانوية الذي كان 60-70 نانومتر. من أجل إثبات التأثير التآزري لمركبات الفضة / أكسيد التيتانيوم النانوية أجريت دراسة مقارنة للتأثير المضاد للبكتيريا للعينات الأربعة المصنعة وكذا الجسيمات النانوية لثاني أكسيد التيتانيوم، وهذا على أربع سلالات مضادة للميكروبات. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن مركبات الفضة / أكسيد التيتانيوم النانوية، التي تم تصنيعها في درجة حموضة قوية، لديهم أفضل تأثير مبيد للجراثيم والبكتيريا وخاصة ضد البكتيريا سالبة الغرام «الزائفة الزنجارية». في اختبارات الحيوانات الحية، تم إجراء اختبار السمية لمركبات الفضة / أكسيد التيتانيوم النانوية المصنعة في درجة حموضة قوية و "تأثير مهيج" لمرهم تم تطويره على أساس هذه المركبات النانوية والتي تم إجراؤها وفقاً لبروتوكولات منظمة التعاون الاقتصادي والتنمية، وقد أثبتت سلامة هذه المنتجات.

الكلمات المفتاحية: مركبات نانوية، الفضة / أكسيد التيتانيوم، طريقة صول-جل، التأثير المضاد للبكتيريا

Abstract

The objective of this work is the synthesis and study of the antibacterial and toxicological effect of Ag-TiO₂ nanocomposites. Four samples of Ag-TiO₂ nanocomposites were synthesized, at different pH and temperature, by chemical method "Sol-gel". Characterization by EDX-MEB and DLS confirmed the chemical composition as well as the particle size of the Ag-TiO₂ nanocomposites, which was 60-70 nm. In order to prove the synergistic effect of Ag-TiO₂ nanocomposites, a comparative study of the antibacterial effect of the 04 synthesized samples and the TiO₂ NPs, was carried out on four antimicrobial strains. The results obtained demonstrated that Ag-TiO₂ (aj) nanocomposites, synthesized at a strongly acidic pH, have the best bactericidal and bacteriostatic effect, especially against the Gram-negative bacteria "*Pseudomonas aeruginosa*". In vivo animal tests "Toxicity test" of Ag-TiO₂ (aj) nanocomposites and "Irritant effect" of an ointment made of these nanocomposites were carried out in accordance with OECD protocols, demonstrated the safety of these products.

Key words: nanocomposites, Ag-TiO₂, sol-gel pathway, antibacterial effect.

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu le tout Puissant, de m'avoir donné la force et le courage pour dépasser toutes les difficultés et mener à bien ce travail.

Je remercie vivement mon promoteur Docteur IMOUDACHE Hichem pour son esprit ouvert, sa patience, son encouragement et sa motivation qui m'ont permis de travailler dans des bonnes conditions.

Mes plus grands remerciements vont à Madame MAKAOUI Nassima, pour sa disponibilité et son suivi, sa confiance, sa rigueur scientifique, son sens d'écoute et d'échange et surtout ses conseils précieux et ses orientations.

Je remercie aussi Madame Pr. HADJ ZIANE pour l'accueil dans son laboratoire ainsi que Mademoiselle MOGHNI Nassiba pour son aide et ses conseils.

Je tiens à remercier également toute l'équipe de laboratoire de chimie analytique, de microbiologie et de pharmacotoxicologie du Centre de Recherche et Développement du GROUPE SAIDAL, pour leur accueil, leur encouragement, et surtout la bonne humeur tout au long la période du stage notamment Mme OUAREK Salima, Mme AZINE Kanza, Melle AKKACHE Lynda, Melle BELKADI Asma, Mme HADJERSI Nassima, Mme MEKERRI Yasmine, Melle BRAHITI Aicha et Melle ALLAOUI Zahra.

Je tiens à exprimer mon plus profond respect à tous les membres de jury pour leur présence et d'avoir accepté d'évaluer ce modeste travail.

En fin, je tiens à remercier l'ensemble des enseignants de Département de Génie des Procédés et à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Je ne laisserai pas cette occasion passer, sans remercier chaleureusement toutes mes chères camarades en Master qui m'ont non seulement aidé et soutenu pour réaliser ce travail, mais aussi ils m'ont laissé que des bons souvenirs.

Merci !

Dédicace

Je dédie ce modeste travail

A mes très chers parents

Mon père et ma mère, l'homme et la femme de ma vie, que nulle dédicace ne puisse exprimer mes vrais sentiments, pour leur amour infini, leur encouragement contenu, leur aide chaleureux, leur soutien indéfectible, leur éducation digne, et leur patience illimité.

Votre amour a fait de moi ce que je suis fière de l'être aujourd'hui.

Que dieu vous protège-pour moi

A mon très cher fiancé

Hichem qui n'a jamais cessé, de me motivé, de me soutenir, de m'épauler pour atteindre mes objectives. Ta confiance, compréhension, tendresse et amour ont été toujours ma source d'encouragement. Que dieu te garde pour moi.

A mes très chers frères

Chouaib et Fares mais particulièrement Nouredine, qui a sacrifié son temps et son travail pour déplacer avec moi tout au long ce travail. Que de réussite, de santé et de bonheur.

Ma très chère sœur et son mari

Pour leur soutien et leur encouragement contenu, sans oublié la petite princesse Imane qui a été ma source de joie et qui m'a toujours fait sourire.

Ma très chère famille

Dalila, Zahra, Kaouther, Zakia, et Nadia pour le soutien morale, pour la motivation, pour les bons moments et les souvenirs inoubliables durant ce travail. Je ne pourrai jamais le faire sans vous. Que de bonheur mes sœurs de cœur

A ceux que j'aime

Merci !

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Les nanoparticules et les nanomatériaux.....	3
I.1. Définition des nanoparticules.....	3
I.2. Définition des nanomatériaux	3
I.3. Type des nanomatériaux.....	4
I.3.1. Les nano-objets... ..	4
I.3.2. Les matériaux nanostructurés.....	4
I.4. Procédés de synthèse des nanoparticules	5
I.4.1. Approche « <i>top-down</i> ».....	6
I.4.2. Approche « <i>bottom-up</i> »	6
I.4.2.1. Méthodes chimiques	6
I.4.2.2. Méthodes physiques	8
I.5. Propriétés des nanomatériaux	9
I.6. Domaines d'applications des nanomatériaux.....	9
I.6.1. Application médical.	9
I.6.2. Application en dermo-cosmétique	10
I.6.3. Application dans l'industrie agroalimentaire	11
I.7. Les nanoparticules d'Argent	11
I.8. Les nanoparticules de Dioxyde de titane... ..	12
Chapitre II : Etat des connaissances biologiques et toxicologiques des nanoparticules d'Ag et de TiO₂.....	14
II.1. Les microorganismes.....	14
II.2. Les bactéries	14
II.3. Classification des principales bactéries d'intérêt médical	15
II.3.1. Bactéries à gram positif	16
II.3.1.1. <i>Staphylococcus</i>	16
II.3.1.2. <i>Bacillus</i>	16
II.3.2. Bactéries à gram négatif	17
II.3.2.1. <i>Pseudomonas</i>	17
II.3.2.2. <i>Escherichia</i>	18
II.4. Levure « <i>Candida albicans</i> »	18
II.5. Germes présents sur la peau	19

II.6. Effet antimicrobien	20
II.7. Effet antibactérien des nanoparticules d'argent « Quelques travaux scientifiques » ..	21
II.8. Pénétration cutanée des NPs de TiO ₂	22
Chapitre III : Matériels et méthodes	24
III.1. Introduction	24
III.2. Synthèse des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	24
III.2.1. Matières premières	24
III.2.2. Matériels	25
III.2.3. Protocole de synthèse des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	26
III.2.3.1. Protocole de synthèse des NPs de TiO ₂	26
III.2.3.2. Protocole de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	27
III.3. Caractérisation des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	28
III.3.1. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)	28
III.3.1.1. Principe de mesure	28
III.3.1.2. Mode opératoire	29
III.3.2. Microanalyse « EDX-MEB »	29
III.3.2.1. Principe	29
III.3.2.2. Mode opératoire	29
III.3.3. Diffraction des rayons-X (DRX)	30
III.3.3.1. Principe	30
III.3.3.2. Mode opératoire	30
III.3.4. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge	30
III.3.4.1 Principe	30
III.3.4.2. Mode opératoire	31
III.4. Contrôle physico-chimique des nanoparticules de TiO ₂	31
III.4.1. Aspect de la poudre de TiO ₂ synthétisée	31
III.4.2. Solubilité	31
III.4.3. Identification	31
III.5. Formulation de la pommade	31
III.5.1. Matières premières	31
III.5.2. Matériels	32
III.5.3. Mode opératoire	32
III.6. Etude de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	33
III.6.1. Choix des souches microbiennes	33

III.6.2. Mode opératoire	34
III.6.3. Lecture des résultats	36
III.7. Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (Test in vivo)	36
III.7.1. Test de toxicité	36
III.7.1.1 Mode opératoire	37
III.7.1.2. Observations	38
III.7.2. Effet irritant sur la peau de l'animal	38
III.7.2.1. Principe de l'essai in vivo	38
III.7.2.2. Préparation des animaux	38
III.7.2.3. Mode opératoire	38
III.7.2.4. Essai d'irritation cutanée initial et confirmatoire (<i>in vivo</i>)	39
III.7.2.5. Période d'observation	40
III.7.2.6. Observations cliniques et cotation des réactions cutanées	40
Chapitre IV : Résultats et discussions	42
IV.1. Introduction	42
IV.2. Synthèse des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	42
IV.3. Caractérisation des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	44
IV.3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	44
IV.3.2. Analyse par EDX-MEB	44
IV.3.3. Diffraction des rayons X (DRX)	46
IV.3.4. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge	47
IV.3.4.1. Spectre IR des NPs de TiO ₂	47
IV.3.4.2. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj)	48
IV.3.4.3. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj,cal)	49
IV.3.4.4. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (N)	49
IV.3.4.5. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (cal)	49
IV.4. Contrôle physico-chimique des NPs de TiO ₂	50
IV.4.1. Aspect	50
IV.4.2. Solubilité	50
IV.4.3. Identification	51
IV.5. Etude de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	51
IV.5.1. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52

IV.5.2. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur l' <i>Escherichia Coli</i>	53
IV.5.3. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Staphylococcus aureus</i>	54
IV.5.4. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Bacillus subtilis</i>	55
IV.5.5. Étude comparative de l'effet antifongique des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur la levure « <i>Candida albicans</i> »	56
IV.6. Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (Test in vivo)	58
IV.6.1. Test de toxicité des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	58
IV.6.2. Effet irritant de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur la peau de l'animal	59
Conclusion générale	62
Liste des références	

LISTE DES TABLEAUX

Tableau III.1 : Matières première utilisés pour la synthèse des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Tableau III.2 : Matériels utilisés pour la synthèse des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Tableau III.3 : Matériels utilisés pour la formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Tableau III.4 : Liste des souches microbiennes et levure

Tableau IV.1 : Résultats d'analyse par DLS

Tableau IV.2 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau IV.3 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur *l'Escherichia Coli*

Tableau IV.4 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

Tableau IV.5 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

Tableau IV.6 : Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

Tableau IV.7 : Cotation des réactions cutanées d'après l'OCDE

Tableau IV.8 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Tableau IV.9 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

LISTE DES FIGURES

Figure I.1 : L'échelle des dimensions du visible à l'invisible

Figure I.2 : Classification des nanomatériaux selon la norme ISO TS 80004-1

Figure I.3 : Etapes du procédé sol-gel

Figure I.4 : Représentation du marché des nanoparticules dans l'industrie cosmétique

Figure I.5 : Structures TiO_2 (a) rutile, (b) anatase, (c) brookite (Ti en gris et O en violet)

Figure II.1 : Morphologie microscopique des bactéries

Figure II.2 : Structure de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif

Figure II.3 : Bactérie *Staphylococcus aureus*

Figure II.4 : Bactérie *Bacillus subtilis* sporulant

Figure II.5 : Bactérie *Pseudomonas aeruginosa*

Figure II.6 : Bactérie *Escherichia coli*

Figure II.7 : Levure « *Candida albicans* »

Figure II.8 : Coupe de peau

Figure III.1 : Formation du gel d'hydroxyde de titane hydraté $\text{Ti}(\text{OH})_4$.

Figure III.2 : Formation du complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{+2}$

Figure III.3 : Solutions préparées pour l'étude de l'effet antibactérien et antifongique des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

Figure III.4 : Mesure de diamètre de zone d'inhibition

Figure III.5 : Administration de la dose à tester chez les souris

Figure III.6 : Application des deux pommades sur les rats

Figure IV.1 : Poudre d'Ag-TiO₂ (aj)

Figure IV.2 : Poudre d'Ag-TiO₂ (N)

Figure IV.3 : EDX-MEB de TiO₂ (NPs)

Figure IV.4 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Figure IV.5 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Figure IV.6 : DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Figure IV.7 : DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Figure IV.8 : Spectre IR des NPs de TiO₂ synthétisées

Figure IV.9 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Figure IV.10 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj,cal)

Figure IV.11 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Figure IV.12 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Figure IV.13 : Poudre des NPs de TiO₂

Figure IV.14 : Identification des NPs de TiO₂ par chauffage

Figure IV.15 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le
Pseudomonas aeruginosa

Figure IV.16 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

Figure IV.17 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

Figure IV.18 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

Figure IV.19 : Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

Figure IV.20 : Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Figure IV.21 : Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SYMBOLES

A°	Angström
ADN	Acide désoxyribonucléique
afssaps	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
Ag	Argent
Ag ⁺	Ion d'argent
AgNO ₃	Nitrate d'argent
Ag-TiO ₂	Argent-Dioxyde de titane
Ag-TiO ₂ (aj)	Nanocomposites d'Argent-Dioxyde de titane (synthétisés avec l'ajout de HNO ₃ (pH fortement acide))
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	Nanocomposites d'Argent-Dioxyde de titane (synthétisés avec l'ajout de HNO ₃ (pH fortement acide), poudre calcinée)
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	Nanocomposites d'Argent-Dioxyde de titane (synthétisés avec l'ajout de HNO ₃ (pH fortement acide), poudre calcinée)
Ag-TiO ₂ (cal)	Nanocomposites d'Argent-Dioxyde de titane (synthétisés sans l'ajout de HNO ₃ (pH faiblement acide), poudre calcinée)
Ag-TiO ₂ (N)	Nanocomposites d'Argent-Dioxyde de titane (synthétisés sans l'ajout de HNO ₃ (pH faiblement acide))
ATCC	American Type Culture Collection
ATR	Attenuated Total Reflectance
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CDTA	Centre des Technologies Avancées
CRD	Centre de Recherche et de Développement
CSSC	Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière

DRX	Diffraction des rayons X
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX-MEB	Spectrométrie à dispersion d'énergie-Microscope électronique à balayage
FDA	Food and Drugs Administration
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
HCl	Acide chlorhydrique
HNO ₃	Acide nitrique
IR	Infrarouge
ISO	International Organization for Standardization
MEB	Microscope électronique à balayage
MH	Mueller-Hinton gélosé
mPa.s	MilliPascal fois seconde
NH ₃	Ammoniaque
NH ₄ OH	Hydroxyde d'ammonium
NMRI	Naval Medical Research Institute
NPs	Nanoparticules
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Re</i>	Limite d'élasticité
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

Ti	Titane
Ti(OH) ₄	Oxyde de titane hydraté
TiCl ₄	Tétrachlorure de titane
TiO(H ₂ O ₂) ⁺²	Complexe Oxyde de titane-Peroxyde d'hydrogène
TiO ₂	Dioxyde de titane
TSA	Trypticase soja agar
UFC	Colony Forming Unit
UV	Ultra-Violet
UV-Vis	Ultraviolet-Visible
ZnO	Oxyde de Zinc
λ	Longueur d'onde

INTRODCUTION GÉNÉRALE

La nanotechnologie représente aujourd'hui un domaine scientifique et technique en plein essor [1]. À cause de sa taille et sa forme, la nanomatériau a des propriétés physiques, chimiques et biologiques différentes de celles des mêmes matériaux en vrac. Leur champ d'application est par conséquent très vaste. [2]

Les nanomatériaux sont actuellement utilisés dans de nombreux produits de consommation courante dont les vêtements, les produits cosmétiques et de bien-être corporel... [3]. L'or, le platine et le cuivre mais particulièrement l'argent qui a attiré une attention considérable en raison de son intérêt fondamental et technologique.

L'oxyde de titane à raison de ces excellentes propriétés avec une grande stabilité chimique et mécanique, a pris un grand intérêt de la part de la communauté scientifique. De ce fait, il est utilisé dans différents domaines d'applications tels que la photo-catalyse, les capteurs de gaz, les médicaments et les produits alimentaires. [2]

La fabrication des nanocomposites a pour principale motivation d'intégrer une ou plusieurs phases nanodimensionnelles discontinues dans une seule macrophase continue afin de générer des « propriétés synergiques », c'est-à-dire que les propriétés physico-chimiques de l'entité combinée sont différentes de celles de chaque matériau et, espérons-le, meilleures à celles-ci. [4]

En raison de leurs propriétés biocides remarquables par effet de taille sur les bactéries, les nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques envahissent de plus en plus les domaines de recherches scientifiques notamment le domaine médical.

La résistance multiple aux antibiotiques qui s'est développée au cours de ces dernières années et l'absence de mise sur le marché de nouvelles molécules antibiotiques ont limité le traitement d'un certain nombre de maladies infectieuses dont la nécessité de trouver des alternatives aux traitements antibiotiques actuels. [5]

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce présent travail est l'étude de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés par voie chimique « Sol-gel » afin de prouver l'effet de synergie de l'argent avec l'oxyde de titane « Métal-Oxyde métallique ».

Pour ce faire, le présent travail est divisé en plusieurs étapes, à savoir :

- Synthèse par voie « Sol-gel », des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- Caractérisation des nanoparticules de TiO_2 par contrôle physico-chimique et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés par différentes techniques d'analyses, à savoir : DLS, EDX-MEB, DRX et IR, afin de pouvoir démontrer leur composition chimique ainsi que leur taille des particules
- Elaboration d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés
- Etude comparative de l'effet antibactérien des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 sur différentes souches microbiennes à Gram positif et à Gram négatif et sur la levure « *Candidat albicans* », afin de démontrer l'effet de synergie
- Evaluation de la toxicité et de l'effet irritant des nanocomposites d'Ag- TiO_2 (Test in vivo), conformément au protocole décrit dans l'OCDE

Une conclusion générale présentant un résumé des résultats obtenus ainsi que les perspectives de ce modeste travail sont décrits à la fin de ce mémoire.

CHAPITRE I : LES NANOPARTICULES ET LES NANOMATERIAUX

I.1. Définition des nanoparticules

Le mot « Nano » est un mot grec synonyme de nain qui signifie extrêmement petit. [6]
 Pour définir la notion de nanoparticules, il aura fallu attendre la terminologie prénormative telle que définie par l'ISO publiée en 2008 à savoir :

- la définition nanométrique considère le domaine de dimension compris entre 1 et 100 nm,
- les nano-objets sont des matériaux présentant une, deux ou trois dimensions externes dans le domaine nanométrique. [7]

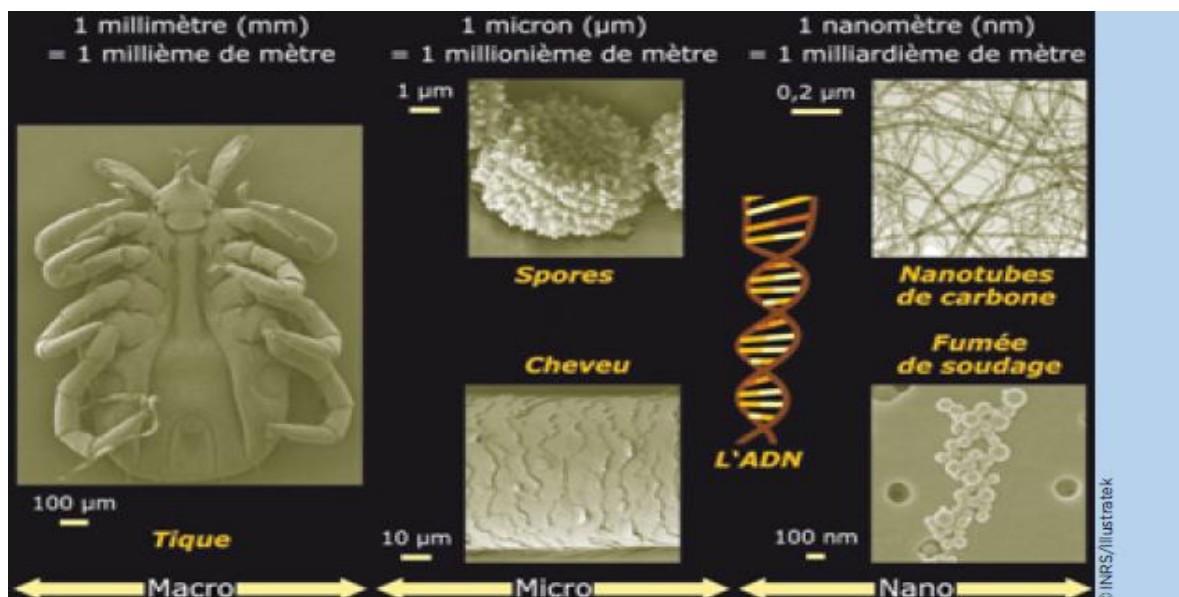


Figure I.1 : L'échelle des dimensions du visible à l'invisible [8]

I.2. Définition des nanomatériaux

Selon la Commission de l'Union Européenne, on entend par « nanomatériau » un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm. [9]

I.3. Type des nanomatériaux

Il existe deux grandes familles de nanomatériaux, à savoir :

I.3.1. Les nano-objets

Ils sont des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique c'est-à-dire approximativement entre 1 et 100 nm. Parmi les nano-objets, il est possible de distinguer trois catégories :

- **Les nanoparticules** : qui désignent des nano-objets dont les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique : nanoparticules d'oxyde de zinc, de fer et de cérium, d'alumine, de dioxyde de titane, de carbonate de calcium, ...etc ;
- **Les nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nanobâtonnets** : qui se rapportent à des nano-objets dont deux dimensions externes sont à l'échelle nanométrique et la troisième dimension significativement supérieure (nanotubes de carbone, nanofibres de polyester, nanotubes de bore, ...).
- **Les nano-feuillets, nano-plats ou nano-plaquettes** : qui définissent des nano-objets dont une dimension externe se situe à l'échelle nanométrique et les deux autres dimensions sont significativement supérieures (nano-feuillets d'argile, nano-plaquettes de séléniure de cadmium, etc.). [8]

I.3.2. Les matériaux nanostructurés

Ils possèdent une structure interne ou de surface à l'échelle nanométrique. Parmi les matériaux nanostructurés, il est possible de distinguer plusieurs familles parmi lesquelles :

- **Les agrégats et agglomérats de nano-objets** : les nano-objets peuvent se présenter soit sous forme individuelle (c'est-à-dire sous forme de particules primaires) ou soit sous forme d'agrégats ou d'agglomérats dont la taille est sensiblement supérieure à 100 nm.
- **Les matériaux nanoporeux** : ces matériaux possèdent des pores de taille nanométrique. Les aérogels de silice sont des matériaux nanoporeux qui présentent d'excellentes propriétés d'isolation thermique.
- **Les nanocomposites** : ces matériaux sont composés pour tout ou partie de nano-objets qui leur confèrent des propriétés améliorées ou spécifiques de la dimension

nanométrique. Les nano-objets sont incorporés dans une matrice ou sur une surface afin d'apporter une nouvelle fonctionnalité ou de modifier certaines propriétés mécaniques, magnétiques, thermiques, etc. Les polymères chargés de nanotubes de carbone utilisés dans le secteur des équipements sportifs, afin d'améliorer leur résistance mécanique et de diminuer leur poids, constituent un exemple de nanocomposites. [8]

Les nanocomposites sont des matériaux composés d'au moins deux constituants, dotés de propriétés physiques et chimiques différentes, qui restent séparés au niveau microscopique mais comprennent collectivement un seul matériau physique possédant une dimension de phase inférieure à 100 nm. [3]

Il existe également des nanomatériaux produits par l'homme de façon non intentionnelle, appelés parfois particules ultra-fines, issus de certains procédés thermiques et mécaniques tels que les fumées de soudage ou de projection thermique, les émissions de moteurs à combustion, etc. Enfin, des particules ultra-fines naturelles sont présentes dans notre environnement, à l'image des fumées volcaniques ou des virus. [8]

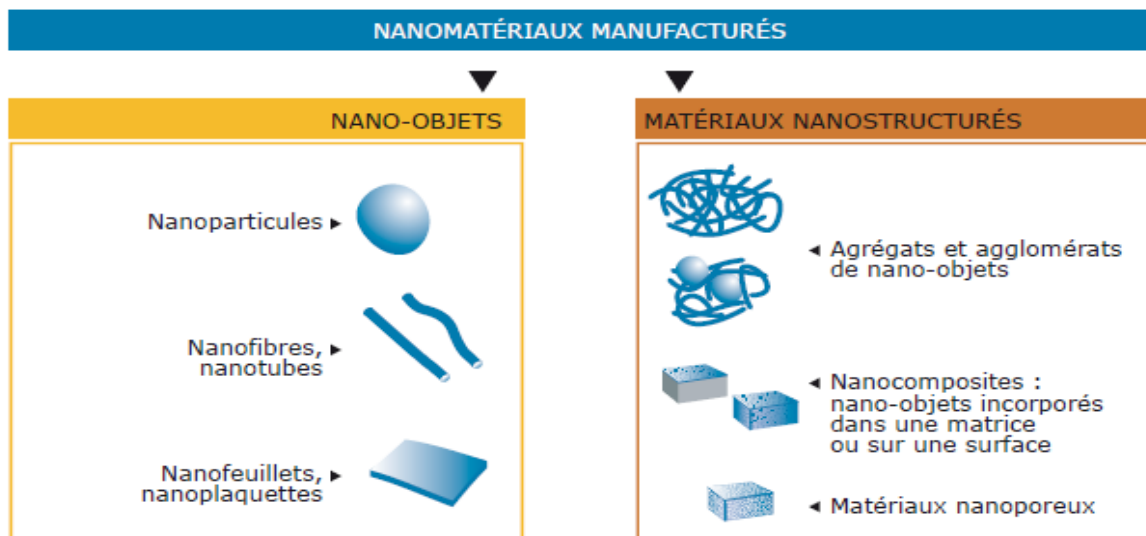


Figure I.2 : Classification des nanomatériaux selon la norme ISO TS 80004-1 [8]

I.4. Procédés de synthèse des nanoparticules

En fonction des propriétés physiques souhaitées, la taille, la forme et l'organisation des nano-objets sont des paramètres importants à contrôler. Plusieurs méthodes de synthèse sont décrites dans la littérature, telle que :

I.4.1. Approche « *top-down* »

L'approche appelée « *top-down* » ou « Approche descendante », issue de la microélectronique, consiste à miniaturiser les systèmes actuels en optimisant les technologies industrielles existantes. Les dispositifs ou les structures sont ainsi graduellement sous-dimensionnés ou fractionnés jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations (broyage). [3], [10]

I.4.2. Approche « *bottom-up* »

A l'inverse de l'approche « *top-down* », l'approche dite « *bottom-up* » ou « Approche ascendante », consiste à utiliser des phénomènes physico-chimiques à l'échelle atomique et moléculaire pour réaliser, de manière spontanée et en grande quantité, des nanostructures simples ou plus élaborées. Classiquement, on regroupe les nombreuses méthodes d'élaboration de nanostructures en deux catégories : les méthodes chimiques et les méthodes physiques. [10]

I.4.2.1. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques sont les plus anciennes et les plus simples à mettre en œuvre pour l'élaboration de nanomatériaux auto-organisés. [6]. On distingue :

- **Colloïdes en solution**

La synthèse de nanoparticules à partir de colloïdes en solution, plus précisément à partir de micelles inverses, est très souvent employée. Il s'agit de gouttelettes d'eau dispersées dans une huile et stabilisées par un tensioactif. La taille des micelles peut être contrôlée par le rapport molaire des concentrations en eau et tensioactif. Agitées de manière incessante par un mouvement brownien, les micelles entrent en collision, interagissent et échangent leur contenu, c.-à-d. leur cœur aqueux, pour finalement conduire à la précipitation de nanoparticules. [10]

- **Procédés *sol-gel***

La méthode sol-gel est connue depuis plus de 150 ans grâce aux travaux d'Ebelmen, qui a été le premier à décrire la synthèse de la silice à partir d'un alkoxyde de silicium. [11]

La méthode sol-gel permet l'élaboration d'une grande variété d'oxydes sous différentes configurations. Le principe de base du procédé sol-gel (correspondant à l'abréviation de solution-gélification), consiste à réaliser une solution stable (le sol dont la préparation peut être simplement la dispersion d'un solide insoluble ou l'addition d'un précurseur qui réagit avec le solvant) et d'initier des réactions d'hydrolyse et de condensation.

A un moment donné (en fonction de la concentration du sol, de son pH, de la température), les interactions entre les particules deviennent suffisamment fortes et conduisent à une rigidité globale de l'ensemble des particules solides dispersées dans le solvant. On a donc l'apparence d'un corps solide, en dépit de la grande quantité de liquide qui est encore présente ; ce type de matériau est appelé le gel et la transition de l'état de sol (liquide visqueux) à l'état de gel (solide élastique) porte le nom de point de gélification. Le temps nécessaire au "sol" pour se transformer en "gel" est appelé temps de gel (ou point de gel).

Ces gels dits " humides " sont ensuite transformés en matière sèche amorphe par évacuation des solvants (aérogel) ou par simple évaporation sous pression atmosphérique (xérogel).

Enfin, un traitement thermique adéquat faisant intervenir des phénomènes physiques et mécaniques, conduit à une densification à basse température, donnant ainsi un matériau de bonne qualité.

La méthode sol-gel permet également de synthétiser des films mésoporeux dont les pores peuvent servir de « moules » pour contrôler la taille, la forme mais également l'arrangement de nanoparticules métalliques ou semi-conductrices.

Sol-gel est l'un parmi les méthodes les plus prometteuses en raison de sa simplicité, de son rapport coût-efficacité et de sa capacité à produire des nanoparticules avec un rapport pureté et surface / volume élevé. [12], [13], [14], [15] ,[16]

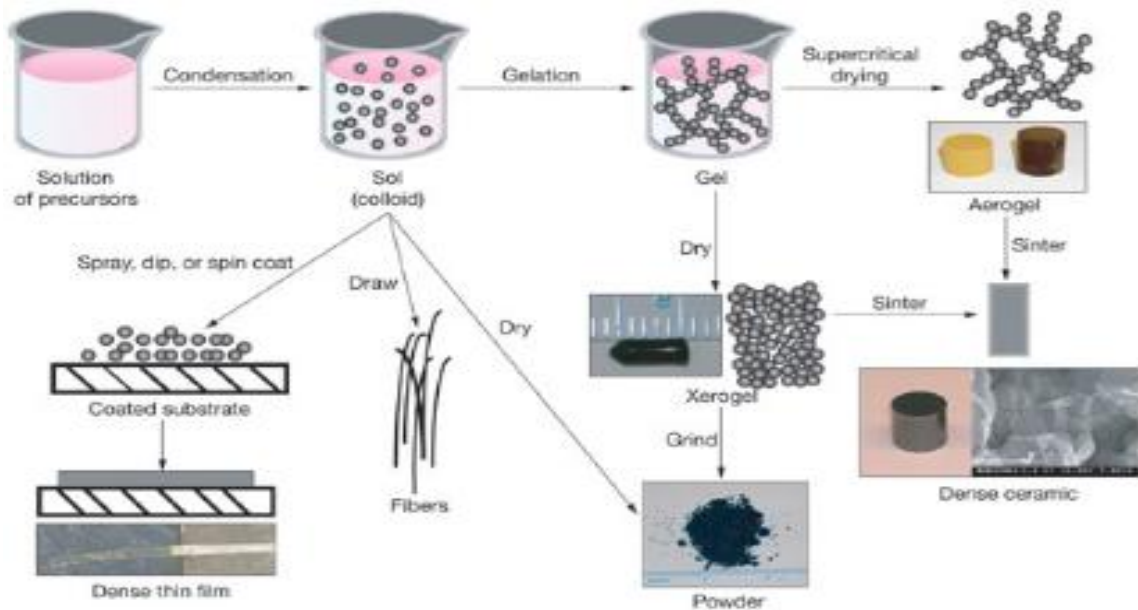


Figure I.3 : Etapes du procédé sol-gel

I.4.2.2. Méthodes physiques

Contrairement aux méthodes chimiques, les méthodes physiques offrent une plus grande variété de matrices hôtes et la possibilité de contrôler plus facilement la taille, la forme, la composition et l'environnement local des nanoparticules, indépendamment de la matrice. Cependant, elles nécessitent un appareillage plus lourd et ne permettent, la plupart du temps, que la synthèse de matériaux sous forme de films minces. [10]

- **Implantation ionique**

L'implantation ionique est une technique qui consiste à bombarder la surface d'une matrice à l'aide d'un faisceau d'ions de masse et d'énergie sélectionnées. Une fois les ions implantés dans la cible, la nucléation d'inclusions nanométriques (nanoparticules métalliques, nanostructures de carbone, bulles, cavités, . . .) peut s'opérer par diffusion : soit au cours de l'implantation elle-même, soit lors d'une phase de recuit (dans un four, sous une flamme ou par laser) [10], [17]

- **Pulvérisation et évaporation**

Ces procédés permettent d'obtenir des films minces homogènes en épaisseur, constitués de particules métalliques ou bimétalliques en matrice. Les nanomatériaux sont obtenus par le dépôt simultané ou alterné du matériau constituant la matrice et celui constituant les particules.

Plusieurs techniques couramment utilisées peuvent être évoquées comme la pulvérisation ionique, la pulvérisation magnétron, l'ablation par laser pulsé, l'évaporation thermique, l'épitaxie par jets moléculaires, . . . [10]

I.5. Propriétés des nanomatériaux

Les propriétés structurales des matériaux peuvent changer lorsque leur taille diminue. En effet, le rapport surface-sur-volume augmente et joue un rôle prédominant dans les propriétés mettant en jeu des échanges à l'interface entre l'objet considéré et son milieu environnant.

La taille nanométrique est également susceptible de modifier les propriétés électriques de certains matériaux semi-conducteurs présentant une activité photo-catalytique à l'instar du dioxyde de titane (TiO_2).

Cependant, quelle que soit leur origine, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques communes qui découlent notamment de leur dimension. Lorsque la taille diminue, la surface spécifique augmente, le nombre d'atomes en surface devenant plus important. Cela a pour conséquence une modification des propriétés optiques, électriques, magnétiques, physiques (abaissement de la température de fusion), catalytiques (réactivité accrue) du matériau sous forme nano-particulaire par comparaison au même matériau à l'échelle microscopique.

Les propriétés mécaniques des matériaux sont fortement modifiées lorsque la taille diminue. En particulier, la limite d'élasticité R_e des matériaux cristallins dépend fortement de la taille de grain : elle augmente lorsque la taille des cristaux diminue. [10], [18], [19] [20], [21]

I.6. Domaines d'applications des nanomatériaux

I.6.1. Application médical

Les propriétés exceptionnelles des nanoparticules permettent d'envisager des applications pointues en biomédecine (nano-médecine). L'élaboration de traitements plus sûrs et possibilité de ciblage thérapeutique en font des applications prometteuses en cancérologie ou dermatologie par exemple. De nombreux axes de recherche concernent les nanoparticules inorganiques appliquées au domaine médical. Une nouvelle génération de médicaments s'appuyant sur les progrès des nanotechnologies tente de cibler uniquement les organes et les tissus malades. C'est le principe de la vectorisation.

D'autres travaux visent l'élaboration de surfaces biocompatibles pour implants et dispositifs orthopédiques, vaccins composés d'adjuvant à base de nanoparticules, production d'agents antimicrobiens, et pour l'imagerie médicale (imagerie par résonance magnétique) par la mise au point de nanoparticules magnétiques comme agents de contraste. [21]

I.6.2. Application en dermo-cosmétique

L'industrie cosmétique tend sans cesse à améliorer les propriétés des produits cosmétiques : tenue, transparence, brillance et propriétés optiques. A cet effet, des études ciblent l'utilisation de nanoparticules en nano-dispersions et en microémulsions dans les formulations cosmétiques. Les industries cosmétiques utilisent les formes nanoparticulaires de leurs ingrédients afin d'améliorer la protection contre les ultra-violets, la pénétration cutanée, la tenue de leur produit, la couleur, l'éclat etc.

Les particules de dioxyde de titane (TiO_2) et d'oxyde de zinc (ZnO) sont utilisées depuis de nombreuses années dans les crèmes solaires en tant que filtres anti-UV. Ces particules ont la capacité d'absorber et de refléter les rayonnements UV conférant ainsi une photo-protection. Etant visibles, ces particules laissaient un film blanc sur la peau. La réduction de leur taille aux dimensions nanométriques a permis l'élaboration de crèmes solaires « invisibles » tout en conservant leur propriété photo-protectrice.

Il est admis que les plus grandes industries cosmétiques utilisent largement les nanoparticules dans leur formulation comme le démontre ce graphique. [21], [22]

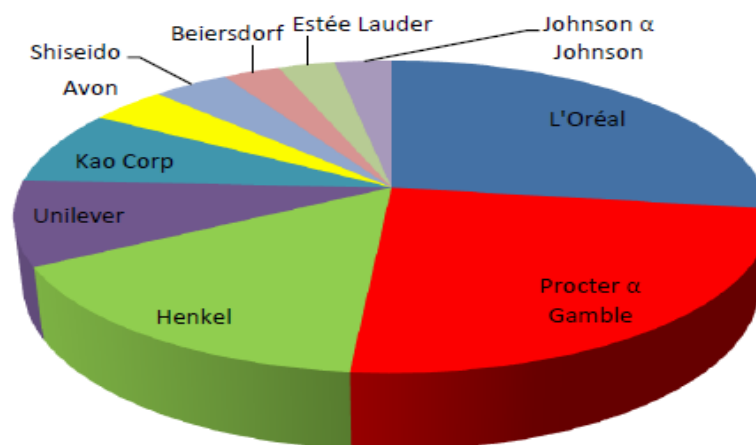


Figure I.4 : Représentation du marché des nanoparticules dans l'industrie cosmétique [21]

I.6.3. Application dans l'industrie agroalimentaire

L'industrie agroalimentaire a adopté les nanoparticules, sans toujours le déclarer clairement, car ils permettent une meilleure stabilité et une meilleure conservation des produits.

Les nanomatériaux sont utilisés dans les emballages pour permettre une meilleure conservation des produits, comme senseurs pour le suivi de leur durée de vie, dans le domaine des additifs alimentaires, des antiagglomérants par exemple dans le sel et le sucre, comme clarifiants des jus de fruits. Les nanoémulsions, utilisées par l'industrie agroalimentaire pour encapsuler, protéger et délivrer des additifs tels que des caroténoïdes, des phytostérols, des flavonoïdes et des vitamines liposolubles, sont également activement développées. [3]

De nombreux domaines d'activité utilisent déjà des nanoparticules pour améliorer leurs applications. Entre autres, l'industrie automobile, l'industrie chimique, l'industrie électronique, la recherche, l'habitation, ... [21]

I.7. Les nanoparticules d'Argent

Depuis près de 2700 ans, les Chinois utilisent en acupuncture des aiguilles en Argent, métal précieux dont dès l'origine, ils connaissaient, semble-t-il, les propriétés antiseptiques...sans pour autant les expliquer !

Par ailleurs, ce sont les Perses qui enseignèrent à Alexandre le Grand, roi de Macédoine, et cela il y a plus de 2300 ans, que l'Argent recouvrant l'intérieur des récipients, permettait de mieux conserver des liquides alimentaires comme l'eau ou le vin. De plus il était très efficace pour soigner les plaies susceptibles de s'infecter et l'Argent métal ne semblait pas dangereux pour la santé... au contraire de ses proches cousins, le Mercure et le Plomb.

Ravelin, savant français démontre au XIX^{ème} siècle que l'argent métal à l'état divisé, agit à dose extrêmement faible, comme un puissant bactéricide. Peu après, un médecin allemand Brenno Crede met en évidence que l'argent en solution colloïdale c'est-à-dire en suspension dans l'eau distillée, élimine à faible dose de très nombreuses bactéries tout en restant très peu toxique pour l'homme dans des conditions normales d'utilisation.

L'argent sous forme nano-particulaire semble aujourd'hui très prometteur en raison de ses propriétés biocides, de son action anti-inflammatoire, et des applications médicales qui en découlent. Les nanoparticules d'argent possèdent des propriétés très intéressantes

comparées à de nombreux antibiotiques, en raison de leur effet antibactérien. De plus, il n'y a pas de risque d'allergie, les phénomènes de résistance sont modérés et l'argent n'interfère pas avec les antibiotiques.

Parmi les applications industrielles des nanoparticules d'argent, on compte :

- L'incorporation de l'argent dans les vêtements et les chaussettes afin de neutraliser les odeurs,
- L'incorporation de l'argent dans les emballages alimentaires dans le but d'inhiber la prolifération de microorganismes et de garantir ainsi une meilleure conservation des aliments.
- L'intégration des nanoparticules d'argent dans certaines formulations des produits cosmétiques en raison de leurs propriétés antibactériennes.
- Greffage des nanoparticules d'argent sur des molécules thérapeutiques, a été proposé aussi, pour le traitement topique de maladie de peau comme le psoriasis. Récemment, les nanoparticules d'argent ont attiré l'attention en raison de leurs applications thérapeutiques, telles que leur rôle prometteur en tant qu'agents anticancéreux. Des résultats positifs ont été obtenus lors de l'intégration des NPS d'Ag dans les traitements du cancer [21, 23, 24, 25, 26]

I.8. Les nanoparticules de Dioxyde de titane

Le dioxyde de titane ou bien l'oxyde de titane est une substance métallique découverte en 1781 par WILLIAM Groger, c'est un composé d'oxygène et de titane qui a un aspect d'une terre blanche. C'est le pigment blanc le plus utilisé aujourd'hui, en raison de sa pureté, de sa stabilité.

Le TiO_2 existe en trois phases principales : anatase, brookite et rutile. La multitude de conditions expérimentales utilisées pour la synthèse des différentes phases de TiO_2 complique la compréhension de la formation de nanoparticules, ce qui rend difficile la comparaison des mécanismes.

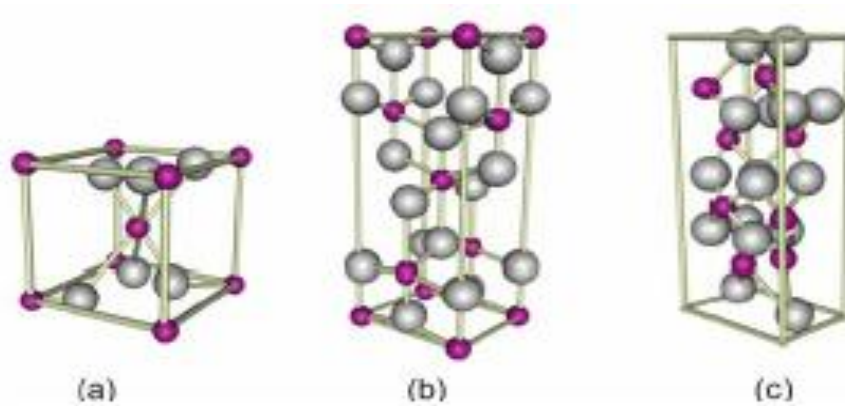


Figure I.5 : Structures TiO_2 (a) rutile, (b) anatase, (c) brookite (Ti on gris et O en violet)

Le TiO_2 a fait l'objet d'une attention considérable dans le domaine de la science des matériaux et a fait l'objet de recherches approfondies pour ses propriétés physiques et chimiques uniques. Les films de TiO_2 ont trouvé diverses applications, par exemple dans la photocatalyse et dans les cellules solaires photochimiques. En raison de sa capacité à tuer les micro-organismes lorsqu'il est irradié avec une lumière proche des ultraviolets, le TiO_2 a également été appliqué dans des traitements environnementaux tels que la purification de l'eau et de l'air, la désinfection de l'eau et la stérilisation.

Les nanomatériaux de dioxyde de titane sont utilisés dans une vaste gamme d'applications, telles que la catalyse (photo), les séparations, les capteurs, les peintures et les cellules solaires à colorant. La réduction de leur taille aux dimensions nanométriques a permis l'élaboration de crèmes solaires « invisibles » tout en conservant leur propriété photoprotectrice. Les propriétés matérielles des nanoparticules de TiO_2 dépendent de la structure cristalline, de la taille des nanoparticules et de la morphologie et dépendent donc fortement de la méthode de synthèse. [27], [28], [29], [30], [31], [32]

CHAPITRE II : ETAT DES CONNAISSANCES BIOLOGIQUES ET TOXICOLOGIQUES DES NANOPARTICULES D'Ag et de TiO₂

II.1. Les microorganismes

D'après son étymologie, le mot micro-organisme signifie « petit organisme ». En effet, les micro-organismes sont de minuscules organismes vivants invisibles à l'œil nu et présents presque partout sur terre.

Le terme de micro-organisme englobe à la fois les bactéries, certains champignons (moisissures, levures) mais aussi les virus (pour certains biologistes). [33]

II.2. Les bactéries

Les bactéries sont des micro-organismes vivants procaryotes (sans noyau) unicellulaires simples. Elles ont été découvertes à la fin du 17^{ème} siècle par Anthoni Van Leeuwenhoek, naturaliste hollandais. Leur génome est constitué d'ADN circulaire (un seul chromosome et éventuellement des plasmides). Leur taille est comprise entre 0,1 et 10 micromètres et leur morphologie est très diversifiée. Ainsi, leur cellules peuvent être rondes (coques), allongées (bacilles, bâtonnets), intermédiaires (cocobacilles) ou encore spiralées. [33], [34]

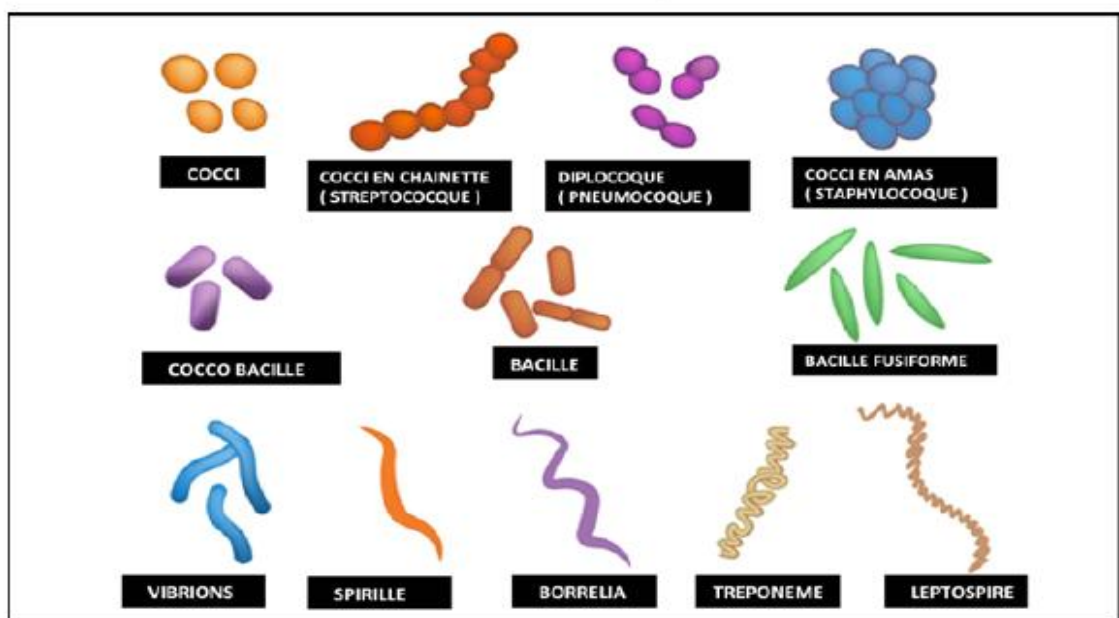


Figure II.1 : Morphologie microscopique des bactéries [34]

II.3. Classification des principales bactéries d'intérêt médical

Les bactéries peuvent être classées et donc identifiées en fonction de plusieurs paramètres :

- Morphologie microscopique : coque, bacille, isolés, groupés en deux, en chaînette, en amas ...
- Morphologie macroscopique : taille, forme, couleur des colonies sur culture
- Température de croissance
- Besoins respiratoires : aérobie, anaérobie strict, aéro anaérobie, facultatif, micro aéroophile
- Mobilité
- Présence de spores
- Besoins nutritionnels : nécessité de substances particulières
- Résultats de la coloration de gram : gram positif et gram négatif

De la structure de la paroi bactérienne dépend l'appartenance des bactéries au groupe des bactéries à Gram positif ou à Gram négatif. Les deux groupes possèdent en commun un constituant essentiel, spécifique au monde bactérien, le peptidoglycane. Ce constituant confère à la bactérie sa forme et sa rigidité qui lui permet de résister à la pression osmotique intra cytoplasmique. [34]

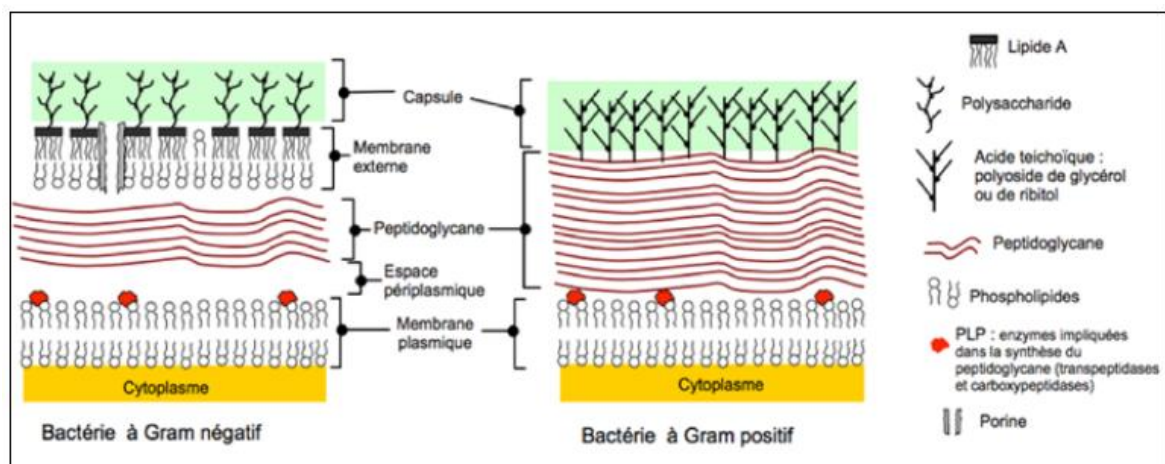


Figure II.2 : Structure de la paroi bactérienne des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif [34]

On citera les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif suivantes, les plus examiner en domaine pharmaceutique.

II.3.1. Bactéries à gram positif

II.3.1.1. *Staphylococcus*

Les *Staphylocoques* sont des cocci à Gram positif très résistants dans le milieu extérieur. Le genre *Staphylococcus aureus*, immobile regroupé en amas, possède un potentiel de pathogénicité important, impliqué dans les infections communautaires et nosocomiales.

L'homme en est le principal réservoir, qu'il soit malade ou porteur sain hébergeant des *Staphylocoques* au niveau des fosses nasales, de l'intestin, de la peau ou de ses annexes glandulaires (aisselle, périnée). Les *Staphylocoques* contaminent également les surfaces, l'air et l'eau. La transmission est avant tout interhumaine directe et manu portée. [34]

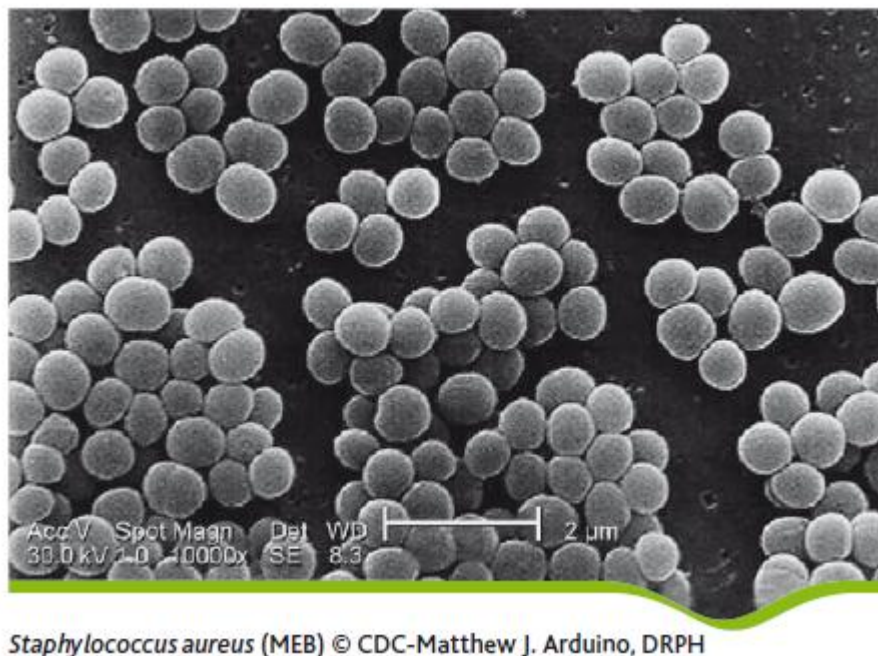


Figure II.3 : Bactérie *Staphylococcus aureus* [35]

II.3.1.2. *Bacillus*

Le genre *Bacillus* est un genre très hétérogène et comprend au moins 36 espèces dont le groupe *Bacillus cereus* formé par plusieurs espèces. Les *Bacillus* sont des bacilles à Gram positif réguliers mais qui peuvent paraître courbés, taille variable selon les espèces, souvent en chaîne. La plupart sont des saprophytes du sol, de l'eau, de l'air et des plantes.

Habitat : Homme et animaux, colonisation à partir de l'environnement (terre, végétaux, eaux).

Cutanée : par contact direct avec les animaux malades

Digestive, due à l'ingestion de viande contaminée

Aérienne, par inhalation de spores provenant de poussières de laine, peaux et poils. [34]

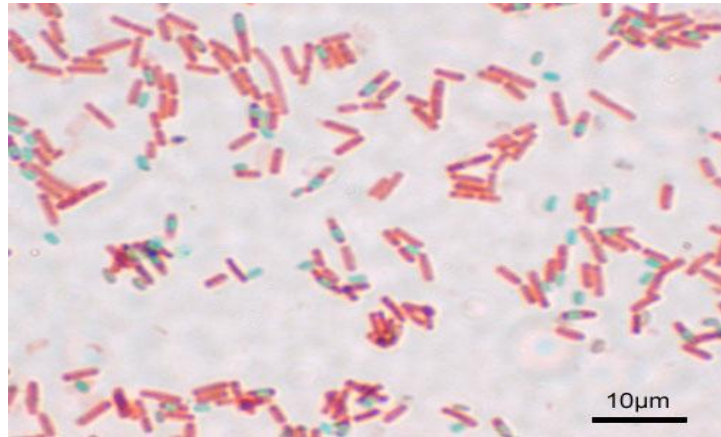


Figure II.4 : Bactérie *Bacillus subtilis* sporulant [36]

II.3.2. Bactéries à gram négatif

II.3.2.1. *Pseudomonas*

Pseudomonas est un bacille à Gram négatif non fermentant, aérobic strict dont la principale espèce représentant du genre est *P.aeruginosa*. C'est un pathogène opportuniste responsable fréquemment d'infections nosocomiales.

Bactérie ubiquiste : eaux (douce, salées, et milieux humides), denrées alimentaires, lavabos, ... Ces bactéries sont à l'origine d'infections nosocomiales d'origine exogène (infection manu portées, infections sur matériel implanté) et d'origine endogène (flore cutanée, digestive) chez les patients le plus souvent immunodéprimés. [34]

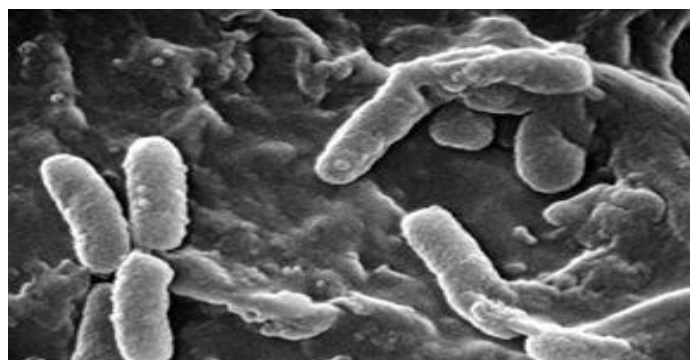


Figure II.5 : Bactérie *Pseudomonas aeruginosa* [37]

II.3.2.2. *Escherichia*

Les enterobactéries appartiennent à une grande famille qui regroupe des bacilles à Gram négatif. Cette famille comporte plusieurs genres, espèces (31 genres et plus de 140 espèces). Parmi tous les genres et espèces décrits, une vingtaine est impliquée en pathologie humaine : *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*...

Le nom d'entérobactérie a été donné parce que ces bactéries sont en général des hôtes normaux ou pathologiques du tube digestif de l'homme et des animaux. L'environnement (sols, eaux, végétaux) peut être contaminé par la matière fécale et constitue une source de contamination indirecte.

L'*Escherichia coli*, bacille à coloration bipolaire, occupe une place importante en pathologie infectieuse communautaire et nosocomiale. [34]

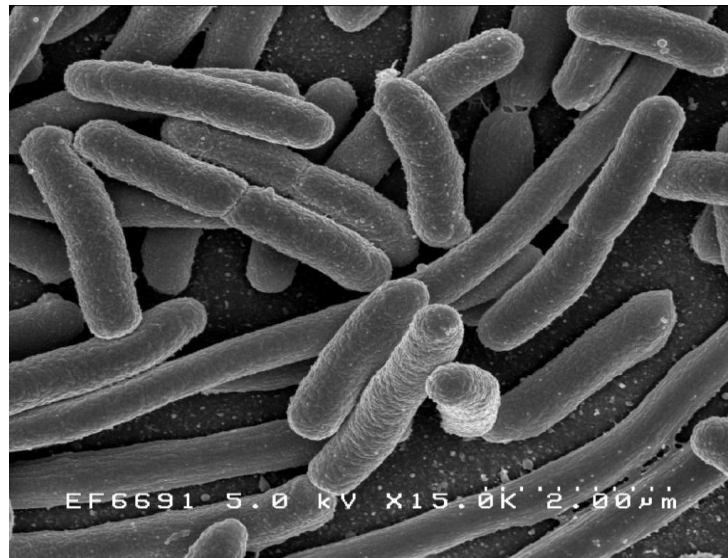


Figure II.6 : Bactérie *Escherichia coli* [38]

II.4. Levure « *Candida albicans* »

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes. Cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver in vitro et in vivo et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans*. [39]

C. albicans peut causer deux types d'infections chez l'homme : les infections superficielles, telles que la candidose orale ou vaginale, et les infections systémiques mettant la vie en danger [40].

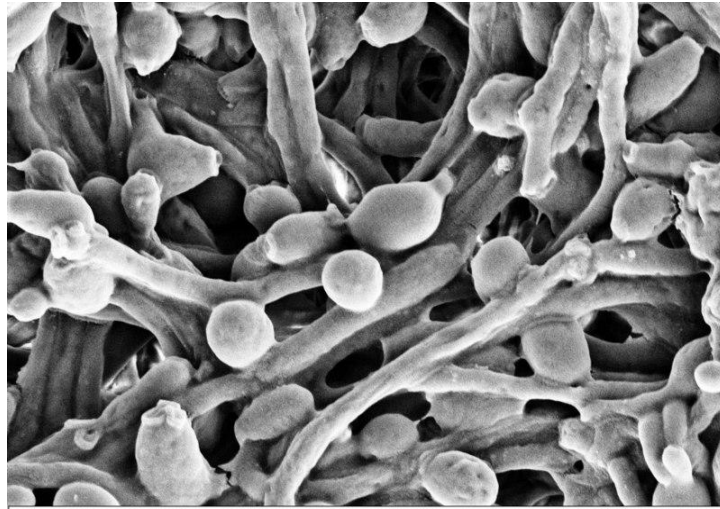
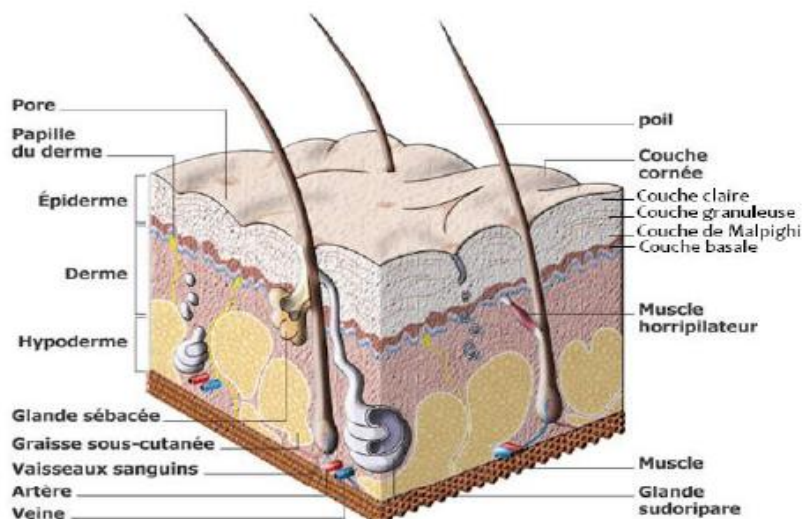


Figure II.7 : Levure « *Candida albicans* » [41]

II.5. Germes présents sur la peau

La peau est un tissu complexe qui sert de barrière défensive contre les multiples agressions extérieures. Celle-ci est constituée de trois couches anatomiques : L'épiderme, le derme et l'hypoderme.



Une coupe de peau (http://arts-plastiques.ac-rouen.fr/rue_evreux/seconde_peau/seconde_peau.html)

Figure II.8 : Coupe de peau [33]

Les germes présents sur la peau sont classés en deux groupes : la flore résidante et la flore transitoire.

- La flore résidante est constituée de micro-organismes ancrés de façon permanente au niveau des couches superficielles de la peau. Cette flore bactérienne varie qualitativement et quantitativement d'un site à un autre chez un même individu ainsi que d'un individu à un autre. Elle se renouvelle régulièrement et est rarement à l'origine d'infections. Elle est composée de bactéries aérobies, surtout de cocci à Gram positif (*Staphylococcus epidermidis*, corynébactéries, principalement *Propionibacterium acnes*, *Micrococcus species*).
- La flore transitoire (ou commensale) est composée le plus souvent de bactéries saprophytes, issues de l'environnement (eau, plantes...) et parfois de bactéries pathogènes provenant de la flore commensale des patients soignés. Sa composition varie au cours de la journée en fonction des activités et des contacts auxquels la peau a été soumise. Cette flore est la principale cause d'infections croisées. Elle est constituée par des bactéries à Gram négatif (*Entérobactéries*, *Pseudomonas...*) et des bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* et *Candida albicans*). [33], [42]

II.6. Effet antimicrobien

Le terme "agent antimicrobien" désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris les antibiotiques et autres agents antibactériens, antiviraux, antifongiques et antiparasitaires. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections. [43]

Le mode d'action de agents antimicrobien sur les bactéries, peuvent être :

- Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries
- Bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries. [44]

II.7. Effet antibactérien des nanoparticules d'argent « Quelques travaux scientifiques »

L'apparition et la propagation de la résistance antimicrobienne sont devenues un problème majeur de santé publique, tant au sein de la Communauté que dans le reste du monde. L'utilisation excessive et abusive d'agents antimicrobiens a favorisé la prolifération d'organismes résistants.

Cette résistance dite "antimicrobienne" peut s'étendre à d'autres populations microbiennes. Les maladies infectieuses qui sont devenues résistantes au traitement antimicrobien type présentent une menace pour la santé humaine et animale. [43]

Ci-dessous quelques travaux scientifiques prouvant l'effet antibactérien des nanoparticules.

- **Sondi et Salopek (2004)**

Ils ont démontré l'activité bactéricide de nanoparticules d'argent en suspension (diamètre : 12 ± 4 nm) sur *E. coli* en milieu gélosé, pour des concentrations de l'ordre de 10 à 50 mg/L. En utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), ils ont observé que les cellules d'*Escherichia coli* étaient endommagées (formation de « trous » dans la membrane externe). Ces altérations entraînent une augmentation de la perméabilité, conduisant à la libération des constituants cellulaires, et, par suite, à la mort de la cellule. [45]

- **Gibbins et Werner (2005)**

Selon Gibbins et Werner (2005), l'argent ionique est actif pour une courte période, de l'ordre de quelques jours, alors que les nanoparticules d'argent peuvent libérer des ions jusqu'à 100-200 jours en fonction de leur quantité et de la nature de la matrice. Les ions Ag^+ sont progressivement libérés par oxydation de la surface des particules métalliques lors de l'exposition à l'air ou à un milieu humide, puis dissolution de l'oxyde d'argent dans le milieu environnant. En raison de leur aire spécifique élevée, le potentiel de relargage d'ions Ag^+ par les nanoparticules est important. Par conséquent, les nanoparticules d'argent sont plus réactives que l'argent massif. Le relargage d'ions Ag^+ contribue donc à l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent. [46], [47]

- **Kim et al. (2007)**

Ils ont étudié l'activité antimicrobienne de nanoparticules d'argent (diamètre~ 10 nm) sur *E. coli*, *S. aureus* et sur une souche de levure, en milieu gélosé (méthode du disque

d'inhibition). Les auteurs suggèrent que l'action antimicrobienne des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules. Les résultats obtenus sur les trois microorganismes testés montrent que *E. coli* est plus sensible que la levure. [48]

II.8. Pénétration cutanée des NPs de TiO₂

D'après le rapport de l'agence française de sécurité sanitaires des produits de santé « afssaps », adopté par la Commission de cosmétologie du 15 mars 2011 :

L'application majeure du TiO₂ et du ZnO dans le domaine de la cosmétique concerne leur utilisation en tant que filtre des rayons ultra-violet (ou filtres UV) inorganiques. Considérant l'utilisation des nanomatériaux de TiO₂ et de ZnO dans les produits cosmétiques et en particulier dans les produits de protection solaire, produits d'application topique, la question d'une possible absorption cutanée engendrant leur distribution dans des organes cibles *via* la circulation sanguine, se pose fortement. Ainsi, dans ce contexte, une revue des études disponibles a été réalisée.

Les résultats d'un grand nombre d'études de pénétration cutanée *in vitro* et *ex vivo* sur peau animale et humaine rapportées, indiquent une présence des NPs de TiO₂ limitée aux couches supérieures de la peau (*stratum corneum* et *infundibulum* pilosébacé). Néanmoins, ces études ont été réalisées sur des temps courts (72 heures maximum), avec des particules non caractérisées selon les connaissances actuelles en termes de taille, forme cristalline, enrobage, etc. De plus, certaines études n'utilisent pas de protocoles standardisés et validés selon les recommandations du Comité scientifique pour la sécurité des consommateurs (CSSC) ou l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE).

Une étude de la FDA (*Food and Drug Administration* ; Sadrieh *et al.*, 2010) reste à ce jour l'étude pertinente retenue par l'Afssaps pour l'analyse de la pénétration cutanée des NPs de TiO₂. En effet, cette étude :

- Est menée *in vivo* ;
- Met en jeu l'évaluation de la pénétration cutanée de NPs de TiO₂ représentatives de celles commercialisées pour les produits cosmétiques ;
- Est menée sur le mini-porc, espèce qui constitue un modèle approprié pour l'extrapolation des résultats à l'homme en raison des fortes similarités de la peau entre ces deux espèces en termes de perméabilité et de structure cutanées ;

- Est menée sur une durée relativement longue avec des applications répétées (application de produits 4 fois par jour, 5 jours par semaine durant 22 jours) comparativement aux autres études issues de la littérature scientifique qui se déroulent sur des temps courts (maximum 72 heures).

Cependant, les résultats obtenus ne permettent pas de conclure de façon définitive à une absence d'absorption systémique chez le mini-porc du fait de la présence de NPs de TiO₂ non enrobées et de particules de TiO₂ submicroniques (300-500 nm) dans les ganglions inguinaux. Il est néanmoins important de rappeler que les NPs de TiO₂ utilisées dans les produits cosmétiques, sont généralement enrobées. [49]

CHAPITRE III. MATERIELS ET METHODES

III.1. Introduction

Les matériels et les méthodes utilisés seront présentés dans ce chapitre. Plusieurs étapes ont été réalisées à savoir :

- ✓ Synthèse des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- ✓ Caractérisation des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 par différentes techniques d'analyses, à savoir : DLS, EDX-MEB, DRX et IR.
- ✓ Contrôle physico-chimique des NPs de TiO_2
- ✓ Formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- ✓ Etude de l'effet antibactérien des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- ✓ Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag- TiO_2 (Test in vivo)

III.2. Synthèse des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

III.2.1. Matières premières

Tableau III.1 : Matières première utilisés pour la synthèse des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 [50], [51], [52], [53], [54], [55], [56], [57], [58].

	Formule chimique	Masse moléculaire	Solubilité	Densité	Teneur
Acide chlorhydrique (PANREAC, Espagne)	HCl	36,46	Miscible à l'eau	1,18	35,0% (m/m) à 39,0% (m/m)
Tétrachlorure de titane (SIGMA-ALDRICH, Allemagne)	TiCl_4	189,68	soluble dans l'eau froide et l'alcool	1,73	

Ammoniaque (Solution concentrée) (VWR PROLABO, France)	NH ₄ OH	35,05	miscible dans l'eau et l'éthanol à 96%	0.892 à 0.910	25,0% (m/m) à 30,0% (m/m)
Peroxyde d'hydrogène (Solution concentrée) (VWR PROLABO, France)	H ₂ O ₂	34,01			29,0% (m/m) à 31,0% (m/m)
Nitrate d'argent (SIGMA-ALDRICH, France)	AgNO ₃	169,9	très soluble dans l'eau, dans l'éthanol à 96%		
Acide nitrique (VWR PROLABO, France)	HNO ₃	63,0	miscible à l'eau	environ 1,41	

III.2.2. Matériels

Tableau III.2 : Matériels utilisés pour la synthèse des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Désignation	Marque
Balance analytique	METTLER TOLEDO
Agitateur magnétique	STUART

pH mètre	METTLER TOLEDO, SevenMulti
Étuve de séchage	MEMMERT
Four à moufle	Nabertherm
Hotte Sorbonne	Exosafe

III.2.3. Protocole de synthèse des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

III.2.3.1. Protocole de synthèse des NPs de TiO_2

60 ml de solution aqueuse de HCl 0,5 M a été placée dans un bécher de 300 ml, X g de TiCl_4 a ensuite été ajoutée goutte à goutte sous agitation magnétique. Le bécher a été maintenu par la suite dans un bain de glace pour maintenir la température à $\sim 0^\circ\text{C}$. Au bout de 30 minutes, une solution aqueuse 1 M de NH_4OH a été ajoutée pour obtenir une solution de $\text{pH} = 8,0$. La couleur du gel devient immédiatement ivoire, indiquant la formation du gel « Oxyde de titane hydraté $\text{Ti}(\text{OH})_4$ ». Après 30 minutes, le gel a été séparé et lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée jusqu'à disparition des ions de chlorures dans le filtrat (en appliquant le test limite des chlorures cité ci-dessous).



Figure III.1 : Formation du gel d'hydroxyde de titane hydraté $\text{Ti}(\text{OH})_4$.

Une quantité spécifiée du gel obtenu a été dispersée dans 50 ml d'eau distillée sous agitation magnétique pendant 30 minutes. Après l'ajout de la solution de H_2O_2 à 30%, la solution devient progressivement orange limpide, indiquant la formation du complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{+2}$.

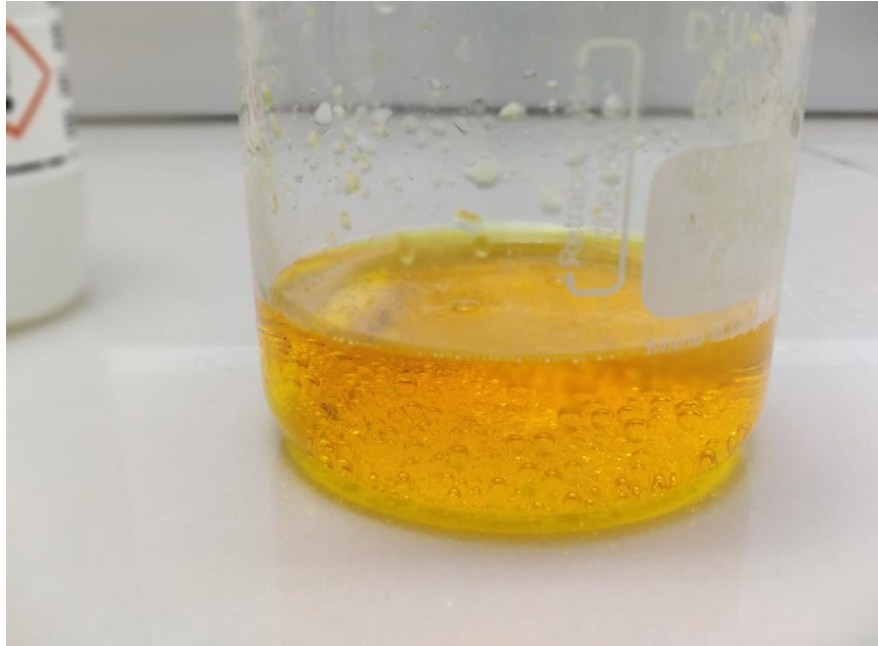


Figure III.2 : Formation du complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{+2}$

Ajouter au mélange une quantité de la solution de HNO_3 1 M et le laisser sous agitation pendant 3 heures. La solution a été chauffée à 90°C .

La poudre obtenue a été laissée se refroidir dans un dessiccateur puis elle a été conservée dans un flacon ambré.

III.2.3.2. Protocole de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Pour la synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂, la même procédure appliquée pour la synthèse des NPs de TiO₂ a été utilisée mais avec addition de la solution de nitrate d'argent immédiatement après l'ajout de la solution de H₂O₂ à 30%. Le complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{+2}$ s'est décomposé lentement pendant les 8 heures de chauffage à 90°C , ce qui a entraîné la formation de la solution d'Ag-TiO₂. [28]

La solution a été mise à 100°C . La poudre obtenue a été laissée se refroidir dans un dessiccateur puis elle a été conservée dans un flacon ambré.

La poudre qui a été calcinée, elle a été mise dans le four à moufle pendant 01 heure.

Test limite des chlorures

Dissolvez 2 ml de la solution à examiner. Acidifiez par l'acide nitrique dilué. Ajoutez 0,4ml de solution de nitrate d'argent (42,5g/L). Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité blanc cailleboté. Centrifugez et lavez 3 fois avec 1 ml d'eau distillée. Effectuez

cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le liquide surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 ml d'eau distillée et ajoutez 1,5 ml de la solution concentrée d'ammoniaque. Le précipité se dissout facilement à l'exception d'éventuelles particules importantes qui se dissolvent lentement. [59]

III.3. Caractérisation des nanoparticules de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

III.3.1. Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière est la technique la plus couramment employée dans l'analyse des nanoparticules pour la détermination de la taille de ces dernières.

III.3.1.1. Principe de mesure

Les petites particules en suspension sont soumises à un mouvement thermique aléatoire appelé mouvement Brownien. Ce mouvement aléatoire est modélisé par la relation de Stokes-Einstein, qui est donnée ci-dessous dans sa forme la plus couramment employée dans l'analyse granulométrique :

$$D_h = \frac{k_B T}{3 \pi \eta D_t} \quad (\text{III.1})$$

- D_h représente le diamètre hydrodynamique (La taille des particules)
- D_t est le coefficient de diffusion transversal (qui est mesuré par diffusion dynamique de la lumière)
- k_B est la constante de Boltzmann (connue)
- T est la température thermodynamique (qui est contrôlée)
- η est la viscosité dynamique (connue) [60]

III.3.1.2. Mode opératoire

Dans une fiole de 20ml, dissoudre 10 mg de l'échantillon à examiner (TiO₂ ou Ag-TiO₂) avec de l'eau distillée, puis compléter jusqu'au trait de jauge avec le même solvant. La solution obtenue est portée au bain à ultrasons pendant 30 minutes.

Prélever une quantité avec une seringue et on l'injecte dans la cellule en quartz de l'appareil DLS.

Toutes les mesures ont été effectuées en triple à 25 °C.

L'appareil utilisé pour déterminer la taille des particules des échantillons synthétisés est de marque Horiba NANO PARTICALE ANALYZER SZ-100.

L'analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de Génie chimique du département de Génie des Procédés de l'université de BLIDA.

III.3.2. Microanalyse « EDX-MEB »

III.3.2.1. Principe

Cette technique microanalytique est l'une des rares méthodes dites « non destructives » capables de renseigner à la fois sur la morphologie et la composition des échantillons. L'analyse individuelle des particules par MEB-EDS permet de caractériser la phase particulaire de manière complémentaire à d'autres techniques, puisqu'elle a la particularité de fournir des informations uniques sur les particules observées, à la fois du point de vue de leur morphologie et de leur composition chimique élémentaire, et ce généralement à partir de 0,1 μm . [61]

III.3.2.2. Mode opératoire

Les échantillons synthétisés ont été déposés dans le porte-échantillon de l'équipement et analysés sans traitement particulier.

L'appareil utilisé est de type QUANTA 650 FEI, Allemagne.

L'analyse a été réalisée au niveau du Laboratoire de Physique Fondamentale et Appliquée de l'université de BLIDA.

III.3.3. Diffraction des rayons-X (DRX)

III.3.3.1. Principe

Chaque phase cristalline présente dans une substance donnée produit une « image » de diffraction X caractéristique. De telles images, appelées diffractogrammes (ou encore diagrammes ou spectres de diffraction), sont obtenues à partir de poudres cristallines

présentant une orientation aléatoire, composées de cristallites ou fragments cristallins de taille finie. Le diffractogramme d'une poudre fournit essentiellement trois types d'informations : la position angulaire des raies de diffraction, l'intensité des raies de diffraction et la forme des raies de diffraction.

L'étude de la position angulaire et de l'intensité des raies de diffraction peut servir à des applications telles que l'analyse qualitative des phases (par exemple, identification des phases cristallines) et l'analyse quantitative des phases d'un matériau cristallin. Une estimation des fractions amorphe et cristalline, élucidation et affinement des structures cristallines, détermination de la pureté cristallographique des phases cristallines, caractérisation de la texture cristallographique, ... peut également être effectuée. [62]

III.3.3.2. Mode opératoire

Les échantillons synthétisés ont été déposés dans le porte-échantillon de l'équipement et analysés sans traitement particulier. Le rayonnement utilisé est $K\alpha$ du cuivre à la longueur d'onde λ de 1,5406 Å. Le balayage a été fait dans le domaine $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$.

L'équipement utilisé pour la détermination de la structure des échantillons est le diffractomètre à rayon X de marque BRUKER AXS D8 ADVANCE.

L'analyse a été réalisée au niveau du Centre des Technologies Avancées CDTA.

III.3.4. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

III.3.4.1 Principe

La spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge est une technique d'analyse qui consiste à soumettre un échantillon à un rayonnement infrarouge. Les molécules organiques soumises à ce rayonnement absorbent ces radiations en modifiant leurs énergies de vibration. Suivant les types de liaisons et de fonctions chimiques présentes dans le milieu, un spectre infrarouge caractéristique de l'échantillon ou de sa surface analysée est obtenu. [63]

L'appareil utilisé est de marque PERKIN ELMER, Spectrum two.

III.3.4.2. Mode opératoire

Les échantillons synthétisés ont été déposés dans le porte-échantillon de l'équipement et analysés sans traitement particulier en utilisant le mode ATR de l'équipement IR utilisé.

III.4. Contrôle physico-chimique des nanoparticules de TiO₂

Le contrôle physico-chimique a été réalisé conformément à la monographie de Dioxyde de titane décrite dans la pharmacopée Européenne, Tome III, 9^{ème} édition.

III.4.1. Aspect de la poudre de TiO₂ synthétisée

On procède à l'observation visuelle de la poudre de TiO₂ synthétisée. La poudre doit être blanche ou sensiblement blanche.

III.4.2. Solubilité

Conformément à la pharmacopée Européenne 9^{ème} édition le dioxyde de titane est pratiquement insoluble dans l'eau. Le dioxyde de titane ne se dissout pas dans les acides minéraux dilués, mais se dissout lentement à chaud dans l'acide sulfurique concentré.

- Préparation de l'acide chlorhydrique dilué : on prélève 20 g d'acide chlorhydrique concentré et on complète à 100 ml avec de l'eau distillée.

III.4.3. Identification

Fortement chauffé, le dioxyde de titane présente une coloration jaune pâle qui disparaît par refroidissement.

III.5. Formulation de la pommade

Le but de cette partie est de formuler une pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et ce afin de pouvoir évaluer l'effet irritant de cette dernière (Test in vivo).

III.5.1. Matières premières

Huile de paraffine [64]

- Définition : mélange purifié d'hydrocarbures saturés liquides obtenus à partir du pétrole.
- Aspect : liquide huileux, incolore, transparent, ne présentant pas de fluorescence à la lumière du jour.
- Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96%, miscible aux hydrocarbures.
- Densité : 0,827 à 0,890

- Viscosité : 110 à 230 mPa.s

Vaseline blanche [65]

- Définition : La vaseline blanche est un mélange purifié d'hydrocarbures semi-solides obtenus à partir de pétrole et entièrement ou presque entièrement décoloré. Elle peut contenir un antioxydant approprié.
- Aspect : masse blanche ou sensiblement blanche, translucide, de consistance onctueuse, légèrement fluorescente à la lumière du jour à l'état fondu.
- Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 % et dans le glycérol.

III.5.2. Matériels

Tableau III.3 : Matériels utilisés pour la formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Désignation	Marque
Balance analytique	METTLER TOLEDO
Agitateur magnétique	TACUSSEL

III.5.3. Mode opératoire

On introduit 5,5g de l'huile de paraffine dans un bécher. On rajoute, progressivement tout en agitant, 1,0g des nanocomposites d'Ag-TiO₂, puis 43,5g de la vaseline liquide. On continue l'agitation jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène sous forme de pommade.

Deux produits ont été formulés, le premier « Pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ » et le deuxième « Pommade à base nanocomposites calcinés d'Ag-TiO₂ ».

III.6. Etude de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Le but de cette étude est l'évaluation et la comparaison de l'effet antibactérien et antifongique des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂. Pour ce faire, nous avons adopté la méthode de diffusion sur milieu gélosé, appelée également la méthode de l'antibiogramme standard.

Cette technique est basée sur l'évaluation de la zone d'inhibition en mesurant le diamètre des disques en papier buvard stérile de 9 mm, imprégnés des échantillons à tester.

Les tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de microbiologie du CRD SAIDAL (Alger).

III.6.1. Choix des souches microbiennes

- **Bactéries et levures**

Les bactéries utilisées sont des bactéries pathogènes, appartenant à deux catégories : Gram positive et Gram négative.

Tableau III.4 : Liste des souches microbiennes et levure

Souches		Famille	ATCC
Gram négative	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	9027
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	8739
Gram Positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>staphylocoques</i>	6538
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	6633
Levure	<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	10231

Les souches de référence testées sont des lots d'ATCC, elles sont entretenues par repiquage sur gélose favorable à leur croissance.

- **Milieux de culture :**
 - Mueller-Hinton gélosé (MH)
 - Milieu TSA (Trypticase soja agar)
 - Milieu Sabouraud

III.6.2. Mode opératoire

Les essais ont été réalisés dans des conditions régulièrement vérifiées par des prélèvements adéquats effectués dans la zone de travail et par des contrôles appropriés.

Tout le matériel utilisé a été stérilisé dans l'étuve à 180°C pendant 1 h 30.

Revivification des souches

A partir du milieu de conservation, chaque souche microbienne est revivifiée dans 5 ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour la levure.

A partir de chaque bouillon, on ensemence une boîte de Pétri de 90 mm de diamètre contenant de la gélose Trypticase Soja Agar pour les bactéries que l'on incube à 37°C pendant 18 à 24 heures et le Sabouraud pour la levure que l'on incube à 25°C pendant 48 heures.

Préparation de la première couche du milieu

- liquéfier le milieu Mueller-Hinton et Sabouraud dans un bain marie à une température de 95°C.
- Verser aseptiquement une première couche dans les boîtes de Pétri identifiées à raison de 15 ml à 20 ml par boîte.
- laisser le milieu se refroidir et se solidifier sur la paillasse.

Préparation de l'inoculum

- A partir d'une culture jeune de 18 heures pour les bactéries et 48 heures pour la levure, on réalise des suspensions en prélevant plusieurs colonies bien isolées qu'on dépose dans 5ml d'eau physiologique stérile puis on agite.
- On réalise une première lecture de la densité de la suspension à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Vis à une longueur d'onde de 620 nm en estimant l'absorbance qui doit être comprise entre 0,2 à 0,3 pour les bactéries, et entre 2 à 3 pour la levure, ce qui correspond à une concentration de 10^7 à 10^8 UFC/ml.

NB : Si la concentration calculée de la première lecture n'est pas comprise dans l'intervalle cité ci-dessus, on procède à la dilution de la suspension avec de l'eau physiologique, dans le cas où le résultat obtenu est supérieur à la concentration préconisée ou à l'ajout de colonies à la suspension, dans le cas où le résultat obtenu est inférieur à la concentration préconisée.

Préparation de la deuxième couche

- Plonger un écouvillon stérile dans la suspension microbienne
- Essorer l'écouvillon dans la paroi du tube
- Ensemencer toute la surface du milieu, 3 passages à orientation décalée de 60° pour la boîte de Pétri et l'écouvillon, en réalisant des stries serrés ;
- Passer l'écouvillon sur le bord de la gélose afin que toute la surface soitensemencée.

Préparation des échantillons de TiO_2 et AgTiO_2

Des solutions de TiO_2 (commercialisé), des NPs de TiO_2 et des 04 échantillons des différents nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés ont été préparées avec l'eau distillée, dont les concentrations sont les suivantes : 1mg/ml, 2mg/ml, 4mg/ml et 6mg/ml, ce qui correspond aux quantités suivantes : 50 μg , 100 μg , 200 μg et 300 μg .



Figure III.3 : Solutions préparées pour l'étude de l'effet antibactérien et antifongique des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

Dépôt des disques et incubation

- Imbiber chaque disque absorbant stérile avec 50 μl de la solution à tester.
- Déposer les disques sur la gélose préalablementensemencée par les souches de référence.
- Laisser les boîtes de Pétri pendant 30min sur paillasse pour diffuser sur le milieu gélosé.

- Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et à 25°C pendant 48 heures pour la levure.

III.6.3. Lecture des résultats

Mesurer le diamètre des zones claires autour des disques (zones d'inhibitions) à l'aide d'un pied à coulisse.

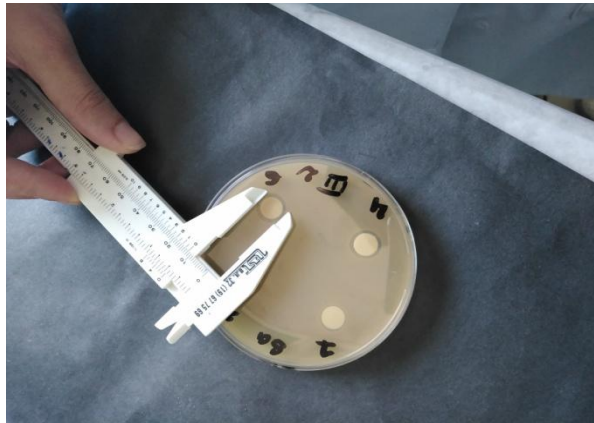


Figure III.4 : Mesure de diamètre de zone d'inhibition

III.7. Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (Test in vivo)

III.7.1. Test de toxicité

Le principe de cet essai est qu'avec un processus séquentiel, utilisant un nombre minimum d'animaux par étape, des informations sur la toxicité aiguë de la substance sont obtenues qui sont suffisantes pour les besoins de classification. Une dose déterminée de la substance est administrée par voie orale à un groupe d'animaux. La substance est testée dans un processus séquentiel dans lequel trois animaux d'un seul sexe (normalement des femelles) sont utilisés à chaque étape. L'absence ou la manifestation de mortalité liée à la substance dans un groupe ayant reçu une dose à une étape donnée détermine l'étape suivante, c'est-à-dire :

- Arrêt de l'essai,
- Administration de la même dose à trois animaux supplémentaires,
- Administration de la dose immédiatement supérieure ou inférieure à trois animaux supplémentaires. [66]

III.7.1.1 Mode opératoire

Le test a été réalisé sur deux doses de la matière « nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) », dont les solutions sont préparées comme suit :

- Solution (1) : 200 mg des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) dans 5 ml de l'eau distillée.
- Solution (2) : 400 mg des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) dans 5 ml de l'eau distillée.

Les solutions sont administrées en une seule dose en utilisant une sonde gastrique ou toute autre canule pour intubation appropriée. Une quantité de 0,5 ml de la solution a été administrée.

Les souris de type Naval Medical Research Institute (NMRI) sont mises à jeun avant l'administration de la substance, on supprime la nourriture mais pas l'eau pendant 3 à 4 heures.

Le test est réalisé sur 06 souris NMRI, dont leur poids est compris entre 17 à 20 g, et qui ont été séparées dans deux cages de 03 souris chacune. Le premier groupe de 03 souris a reçu la dose de 200mg/5ml, et le deuxième groupe a reçu la dose de 400mg/5ml. [66]

Le test de toxicité a été réalisé au niveau du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL (Alger).



Figure III.5 : Administration de la dose à tester chez les souris

III.7.1.2. Observations

Les souris doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une

attention particulière s'impose pendant les premières 4 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance, à l'exception des animaux qui sont morts au cours de l'étude ou qui sont retirés de l'étude et tués avec humanité pour des raisons de protection des animaux. [66]

III.7.2. Effet irritant sur la peau de l'animal

III.7.2.1. Principe de l'essai in vivo

Une seule dose du produit chimique testé est appliquée sur la peau de l'animal choisi pour l'expérience, les zones non traitées de la peau de l'animal servant de témoin. L'expérimentateur observe et note selon une échelle de valeurs le degré d'irritation ou de corrosion à intervalles déterminés, et le décrit de façon plus détaillée afin de fournir une évaluation complète des effets. La durée de l'étude doit être suffisante pour permettre d'évaluer la réversibilité des effets observés.

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit chimique testé. [67]

III.7.2.2. Préparation des animaux

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondu à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés.

III.7.2.3. Mode opératoire

Conformément à ligne directrice de l'OCDE 404, les deux produits testés sont : la « Pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) » et la « Pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) ». Elles ont été appliquées sur une petite zone de la peau (environ 6 cm²) et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. La quantité appliquée sur la plage à tester est de 0,5 g du produit. [67]

L'effet d'irritation a été contrôlé sur 03 rats de type Wistar pour chaque produit formulé : sur la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et la pommade à base des nanocomposites calcinés d'Ag-TiO₂.

Les tests ont été réalisés au niveau du laboratoire de pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL (Alger).

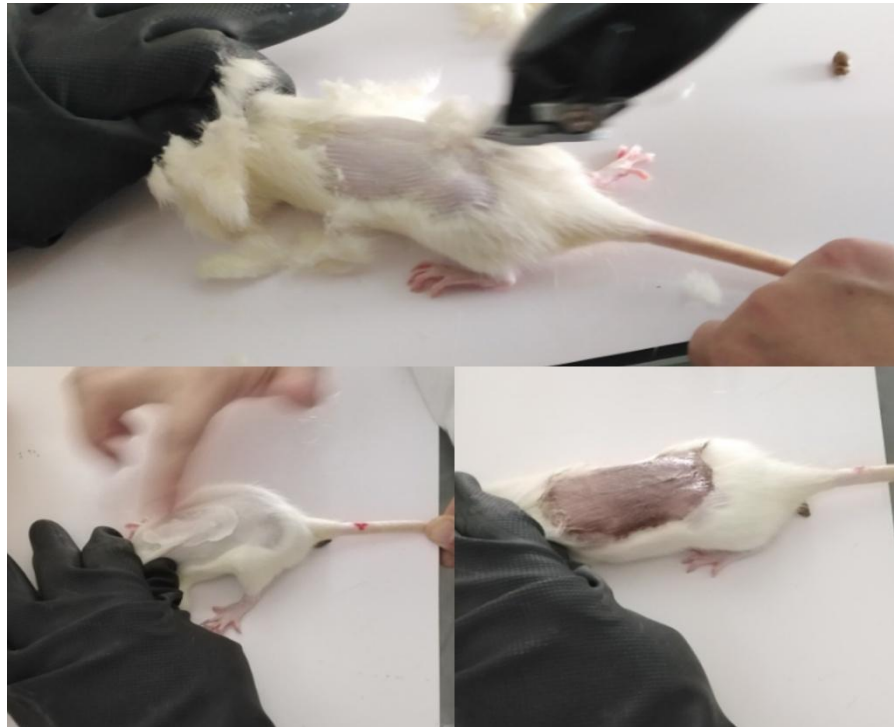


Figure III.6 : Application des deux pommades sur les rats

III.7.2.4. Essai d'irritation cutanée initial et confirmatoire (*in vivo*)

Le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction. Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du

troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

Si l'essai initial ne révèle aucun effet corrosif, il convient de confirmer la réaction irritante ou négative sur deux animaux supplémentaires, traités chacun avec un timbre maintenu durant quatre heures. Si l'essai initial produit un effet irritant, l'essai confirmatoire peut être conduit en mode séquentiel ou par l'exposition simultanée de deux animaux supplémentaires. Au cas exceptionnel où l'essai initial ne serait pas pratiqué, deux ou trois animaux peuvent être traités au moyen d'un seul timbre appliqué durant quatre heures. Si l'on utilise deux animaux et qu'ils expriment la même réaction, il n'est pas nécessaire de poursuivre l'essai. Dans le cas contraire, le troisième animal est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques. [67]

III.7.2.5. Période d'observation

La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là. [67]

III.7.2.6. Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau mentionné dans la ligne directrice OCDE 404 et qui sera décrit dans le chapitre « Partie Expérimentale ». Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels que le dégraissage de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. [67]

CHAPITRE IV : RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

IV.1. Introduction

Dans ce chapitre, les résultats d'analyse des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés seront présentés selon l'ordre suivant :

- ✓ Synthèse et caractérisation des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- ✓ Contrôle physico-chimique des NPs de TiO_2
- ✓ Etude de l'effet antibactérien des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2
- ✓ Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag- TiO_2 et de la pommade à base des nanocomposites d'Ag- TiO_2 (Test in vivo)

IV.2. Synthèse des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

Plusieurs essais de synthèse des nanocomposites d'Ag- TiO_2 ont été réalisés (15 essais) et ce afin de pouvoir bien maîtriser le procédé de synthèse, en tenant compte des données rapportées dans la littérature concernant l'influence du pH et de la température sur la forme et la phase de TiO_2 et donc sur les nanocomposites Ag- TiO_2 [68] [69]

Après une synthèse des résultats obtenus, 04 échantillons des nanocomposites d'Ag- TiO_2 ont été retenus pour exploitation dans le présent chapitre :

- Ag- TiO_2 (aj) : Nanocomposites d'Ag- TiO_2 (avec l'ajout de HNO_3 (pH fortement acide))
- Ag- TiO_2 (aj, cal) : Nanocomposites d'Ag- TiO_2 (avec l'ajout de HNO_3 (pH fortement acide), poudre calcinée)
- Ag- TiO_2 (N) : Nanocomposites d'Ag- TiO_2 (sans l'ajout de HNO_3 (pH faiblement acide))
- Ag- TiO_2 (cal) : Nanocomposites d'Ag- TiO_2 (sans l'ajout de HNO_3 (pH faiblement acide), poudre calcinée)

En ce qui concerne les NPs de TiO_2 synthétisées, elles ont été caractérisées puis contrôlées selon la monographie de la Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition.

Aspect des nanocomposites synthétisés d'Ag-TiO₂

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés à un pH fortement acide se présentent sous forme d'une poudre fine jaunâtre.

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés à un pH faiblement acide se présentent sous forme d'une poudre fine de couleur jaune, comme la présente les figures ci-dessous.



Figure IV.1 : Poudre d'Ag-TiO₂ (aj)

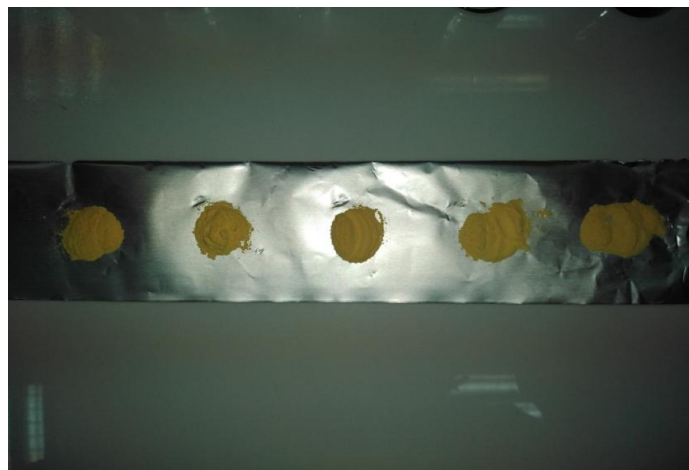


Figure IV.2 : Poudre d'Ag-TiO₂ (N)

IV.3. Caractérisation des nanoparticules de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

IV.3.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

Un volume a été prélevé des différentes solutions préparées et transvaser dans la cellule en quartz de l'appareil DLS et ce afin de pouvoir déterminer la taille des particules des échantillons à tester.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV.1 : Résultats d'analyse par DLS

	Taille des particules (nm)		
	TiO ₂ (NPs)	Ag-TiO ₂ (aj)	Ag-TiO ₂ (N)
Mesure 1	54,7	67,4	68,4
Mesure 2	56,7	68,3	71,6
Mesure 3	60,8	65,5	74,9
Taille moyenne (nm)	57,4	67,1	71,6

Discussion

Vu les résultats obtenus par DLS, on peut confirmer que les différents échantillons synthétisés ont une taille d'ordre nanométrique.

IV.3.2. Analyse par EDX-MEB

Les résultats d'analyse des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ par EDX-MEB sont présentés dans les figures ci-dessous.

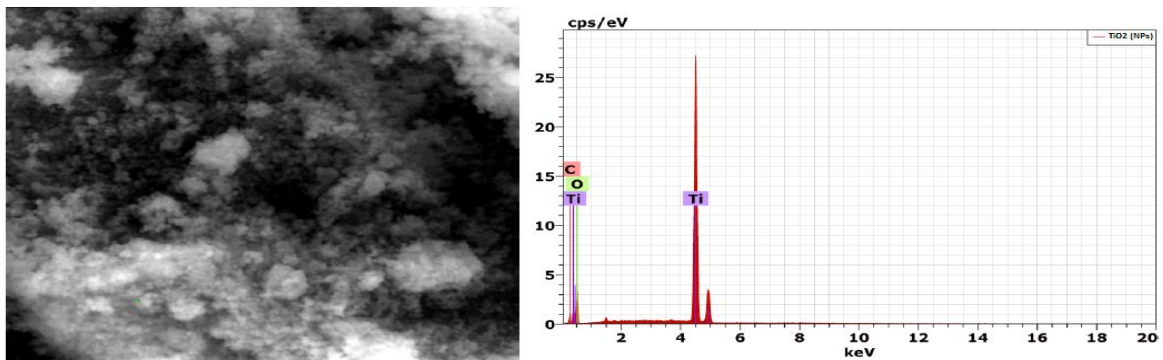


Figure IV.3 : EDX-MEB de TiO₂ (NPs)

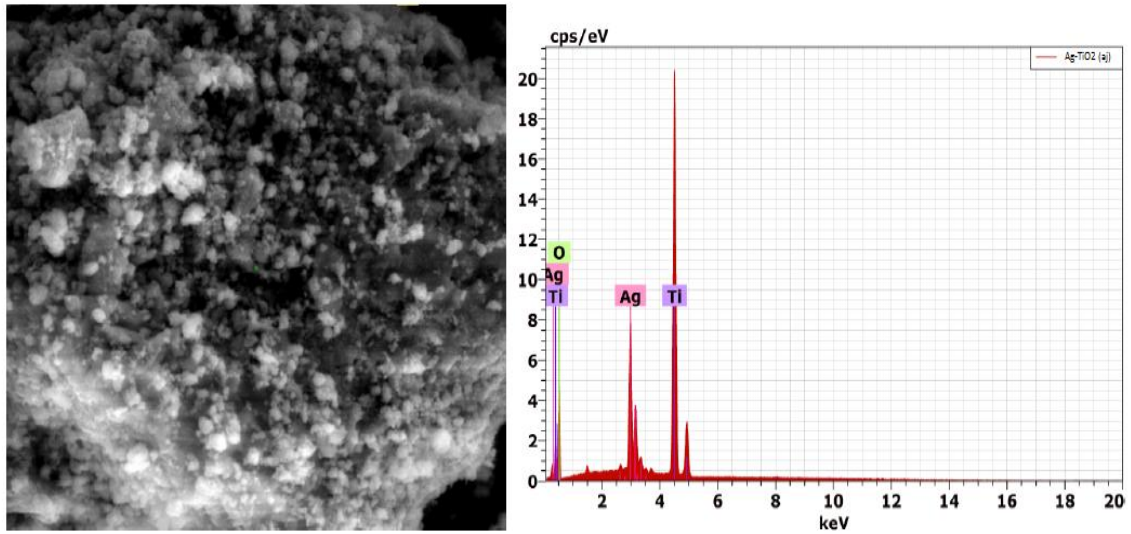


Figure IV.4 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

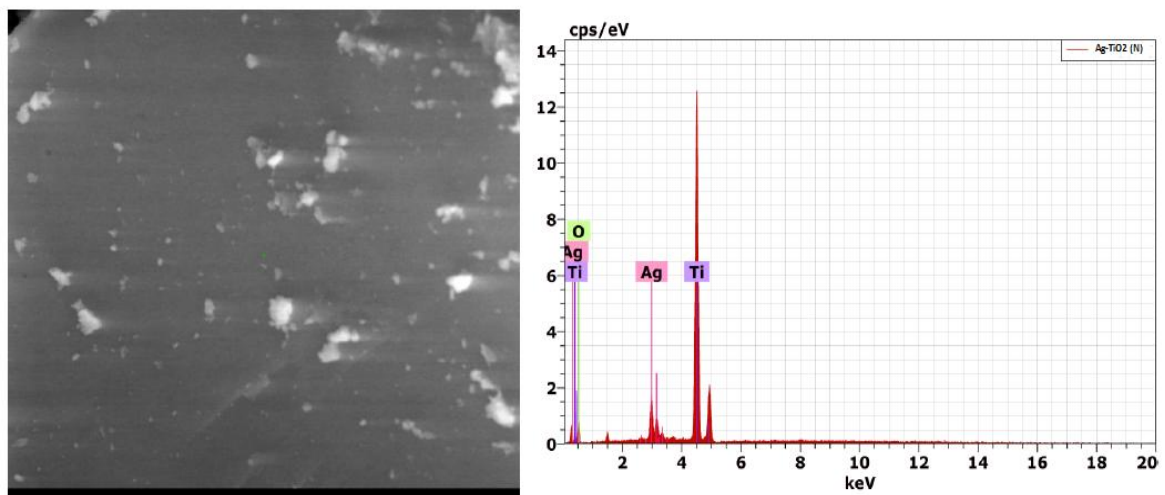


Figure IV.5 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Discussion

La figure IV.3 présente les pics dû aux éléments Ti et O, ce qui nous permet de supposer qu'il s'agit de TiO₂. Les signaux de carbone qui ont apparus dans les spectres EDX ont été attribués au revêtement de carbone sur la grille de l'appareil.

Les figures IV.4 et IV.5 correspondant aux échantillons « Ag-TiO₂ (aj) » et « Ag-TiO₂ (N) » respectivement, confirment que les seuls éléments présents sont : Ag, Ti et O. De ce fait, on peut conclure qu'il s'agit bien des nanocomposites d'Ag-TiO₂.

Les images obtenues par le MEB ne sont pas exploitables, car les échantillons synthétisés se présentent sous forme de nanoparticules, dans ce cas l'analyse par microscope à transmission est recommandée afin de pouvoir étudier bien la morphologie et la taille des nanoparticules synthétisés.

Les petits points lumineux qui ont apparu dans l'image du MEB « Figure IV.5 » confirment la présence des nanoparticules d'argent. [28]

IV.3.3. Diffraction des rayons X (DRX)

L'analyse par DRX a été réalisée sur deux échantillons synthétisés, à savoir : Ag-TiO₂ (N) et Ag-TiO₂ (cal).

Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures ci-dessous.

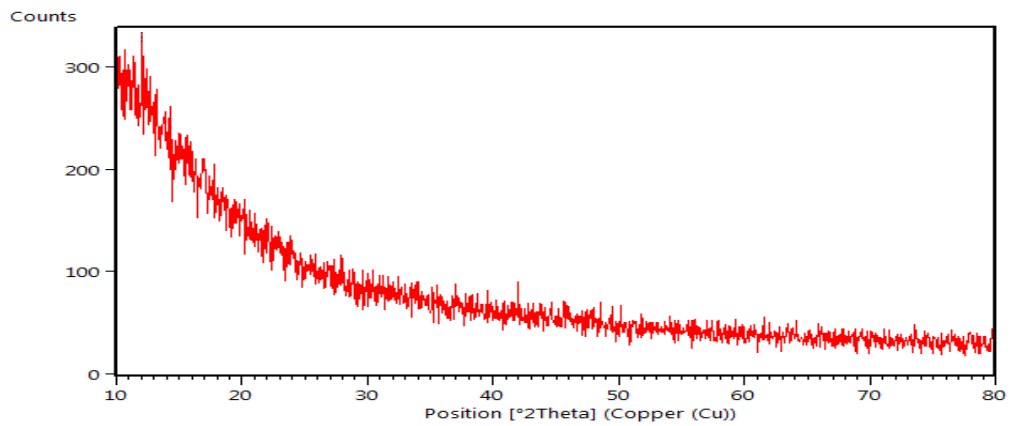


Figure IV.6 : DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

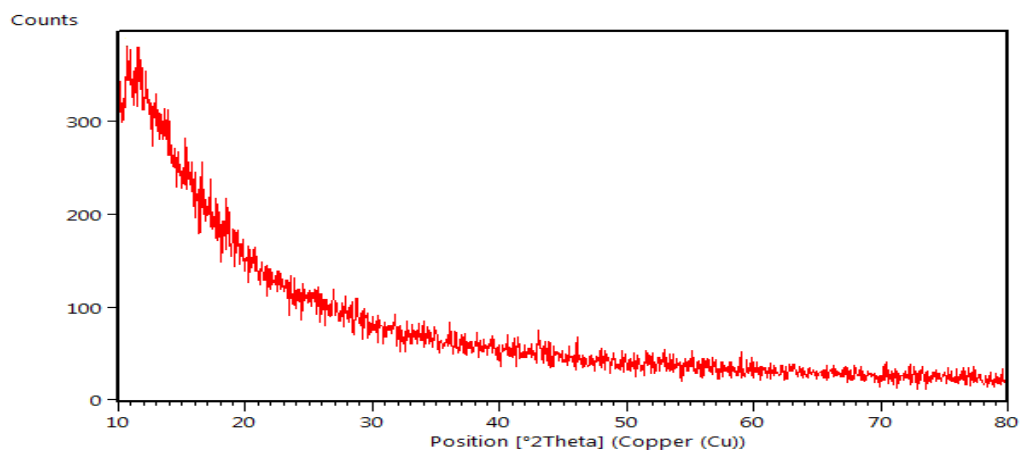


Figure IV.7 : DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Discussion

Les deux diffractogrammes obtenus ne présentent aucun pic dans le domaine $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$. Donc, on peut conclure que les poudres d'Ag-TiO₂ synthétisées se présentent sous forme amorphe. Dans la littérature, on trouve que le TiO₂ se présente sous au moins 03 formes polymorphes, à savoir : brookite, anatase et rutile. La présence de TiO₂ sous forme amorphe dépend des conditions opératoires de synthèse notamment : pH et température. [69]

Cependant, afin de pouvoir confirmer que les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés sont de forme amorphe d'autres analyses doivent être réalisées.

IV.3.4. Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

IV.3.4.1. Spectre IR des NPs de TiO₂

Le spectre IR de TiO₂ (NPs) est illustré dans la figure ci-dessous.

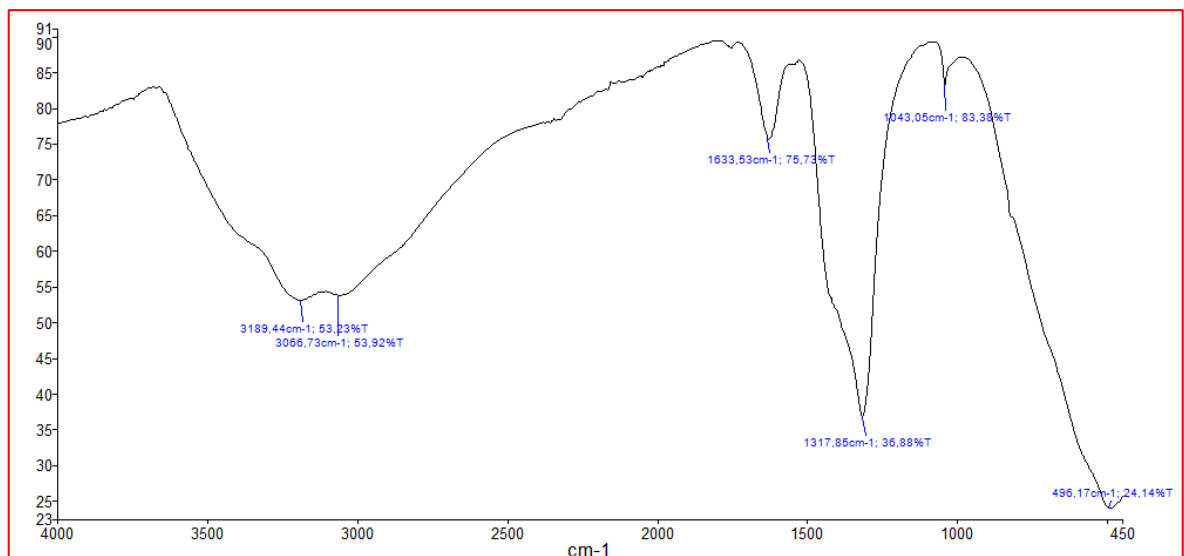


Figure IV.8 : Spectre IR des NPs de TiO₂ synthétisées

Discussion

Le spectre IR des NPs de TiO₂ présente une bande intense à 496cm^{-1} (mode de vibration en flexion Ti – O) qui confirme la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » qui correspond aux oxydes métalliques.

Les bandes typiques d'eau qui ont apparus sous forme d'une bande large et forte à environ 3200cm^{-1} (mode de vibration d'élongation) et à 1600 cm^{-1} (mode de vibration de

déformation (cisaillement) indiquent que la température de séchage de 100°C n'a pas éliminée complètement la quantité d'eau utilisée lors de la synthèse des NPs de TiO₂. Les bandes autour de 1000cm⁻¹ et 1300 cm⁻¹ peuvent être associées à la vibration de groupes résiduels. [69] [70] [71] [72]

IV.3.4.2. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) est illustré dans la figure ci-dessous.

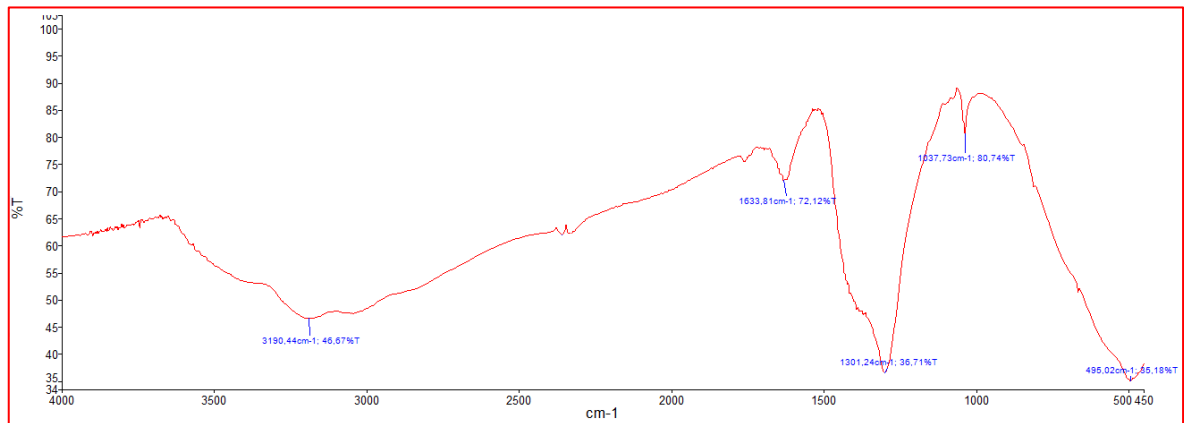


Figure IV.9 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Discussion

Le spectre IR des des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) présente aussi la bande intense de 496cm⁻¹ (mode de vibration en flexion Ti – O) qui confirme la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » correspond aux oxydes métalliques.

Les bandes typiques d'eau apparaissent sous forme d'une bande large et forte à environ 3200cm⁻¹ (mode de vibration d'élongation) et à 1600 cm⁻¹ (mode de vibration de déformation (cisaillement) indiquant que la température de séchage de 100°C n'a pas éliminée complètement la quantité d'eau utilisée lors de la synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂.

Les bandes autour de 1000cm⁻¹ et 1300 cm⁻¹ peuvent être dû à la vibration de groupes résiduels. [69] [70] [71] [72]

IV.3.4.3. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj,cal)

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) est illustré dans la figure ci-dessous.

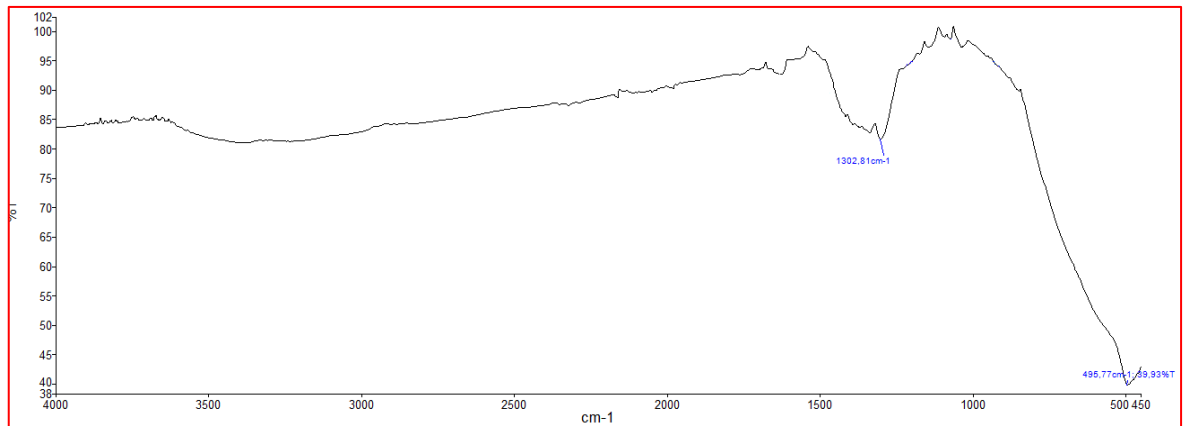


Figure IV.10 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj,cal)

Discussion

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) présente la bande de 496cm⁻¹ qui correspond au mode de vibration en flexion Ti – O indiquant la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » qui correspond aux oxydes métalliques. [69] [70]

A l'effet de la calcination, on remarque l'absence des bandes de 3200cm⁻¹ et 1600cm⁻¹ (dû à l'eau) et celle de 1000cm⁻¹ avec une faible bande à 1300 cm⁻¹ qui correspond à la vibration de groupes résiduels. [73]

IV.3.4.4. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N) est illustré dans la figure ci-dessous.

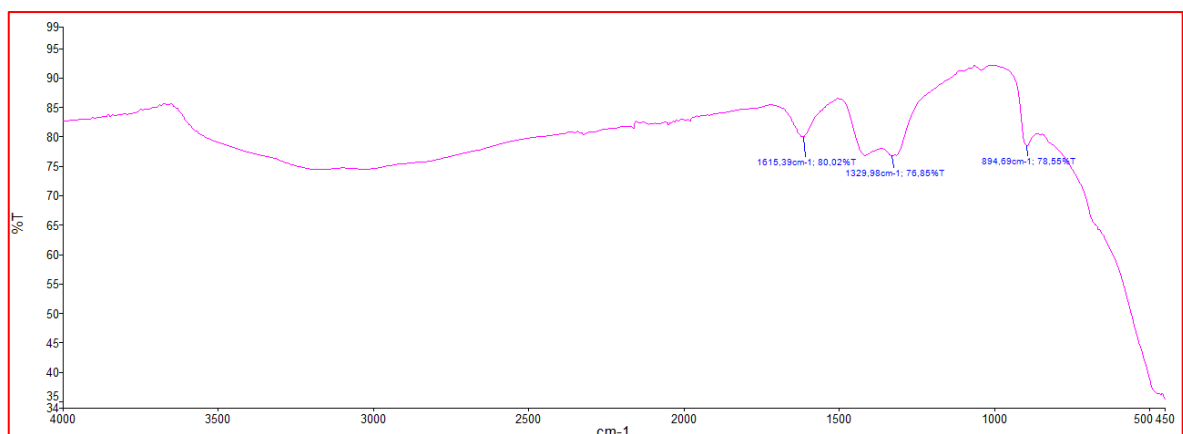


Figure IV.11 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Discussion

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N) présente la bande intense de 496cm⁻¹ (mode de vibration en flexion Ti-O) qui confirme la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » correspond aux oxydes métalliques.

Présence d'une bande à 1600 cm⁻¹ correspondant au mode de vibration de déformation (cisaillement) de la molécule d'eau.

La bande à 1300 cm⁻¹ peut être associée à la vibration de groupes résiduels. [69] [70] [71] [72]

IV.3.4.5. Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal) est illustré dans la figure ci-dessous.

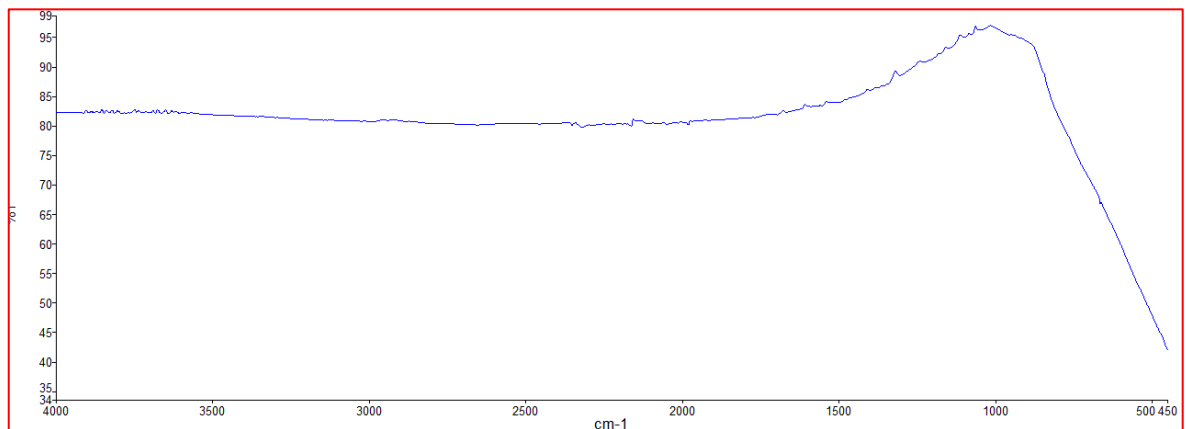


Figure IV.12 : Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Discussion

Le spectre IR des nanocomposites calcinés d'Ag-TiO₂ (cal) ne présente que la bande de 496cm⁻¹ (mode de vibration en flexion Ti-O) correspond à la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » et donc indiquant la présence d'un oxyde métallique.

La calcination a éliminé complètement l'eau et les résidus des réactifs utilisés lors de la synthèse. [73]

Conclusion

Tous les spectres IR des différents échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et des NPs de TiO₂ synthétisés présentent la bande à 496 cm⁻¹ indiquant la formation de la liaison

« Métal-Oxygène » correspondant à la présence d'un oxyde métallique, dans notre cas c'est le Dioxyde de titane « TiO_2 ». La calcination des poudres a permis l'élimination complète de l'eau et des résidus des réactifs utilisés dans la synthèse des échantillons.

IV.4. Contrôle physico-chimique des NPs de TiO_2

IV.4.1. Aspect

Comme illustré dans la Figure IV.13, les NPs de TiO_2 se présentent sous forme d'une poudre blanche à sensiblement blanche. Et donc, l'aspect est conforme à la spécification décrite dans la 9^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne.



Figure IV.13 : Poudre des NPs de TiO_2

IV.4.2. Solubilité

Le test de solubilité a été réalisé conformément au protocole décrit dans la 9^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne.

Les NPs de TiO_2 sont pratiquement insolubles dans l'eau distillée. Le TiO_2 ne se dissout pas dans l'acide chlorhydrique dilué, mais se dissout lentement à chaud dans l'acide sulfurique concentré. Ce qui répond aux spécifications de la 9^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne.

IV.4.3. Identification

Fortement chauffé sur une plaque chauffante, les NPs de TiO_2 présentent une coloration jaune pâle qui disparaît après refroidissement, et ce conformément aux spécifications de la 9^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne.

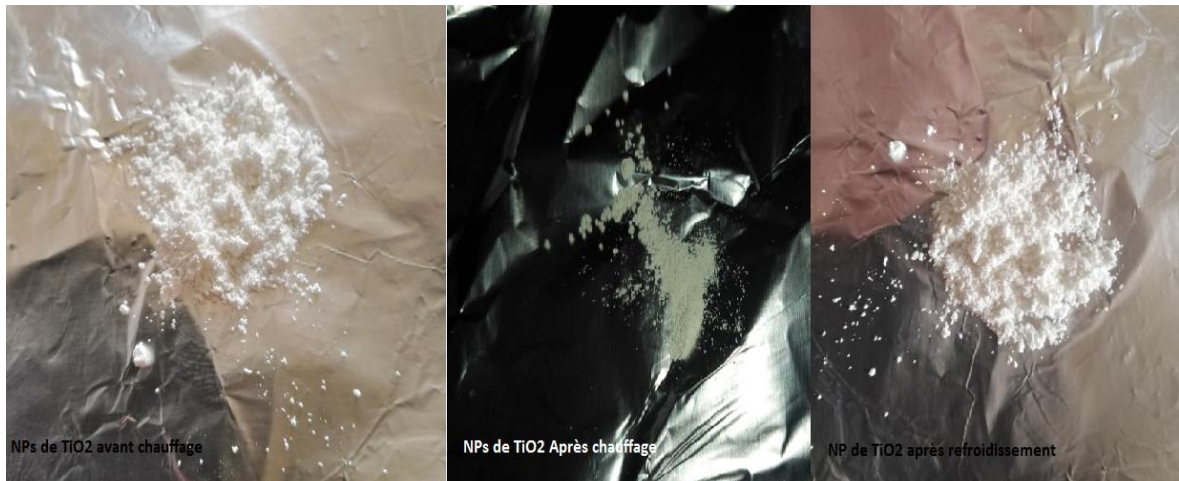


Figure IV.14 : Identification des NPs de TiO_2 par chauffage

IV.5. Etude de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag- TiO_2

Une étude comparative de l'effet antibactérien et antifongique a été réalisée entre un échantillon commercialisé de TiO_2 et dont la taille des particules est d'ordre micrométrique et les NPs de TiO_2 synthétisées. Le but de cette étude est de vérifier aussi l'amélioration de l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag- TiO_2 par rapport aux NPs de TiO_2 (Effet de synergie). Les échantillons objet de cette étude sont :

- TiO_2 : Produit commercialisé.
- TiO_2 (NPs) : Les nanoparticules de TiO_2 synthétisées.
- Ag- TiO_2 (aj) : Les nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisées à un pH fortement acide
- Ag- TiO_2 (aj, cal) : Les nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisées à un pH fortement acide et calcinée.
- Ag- TiO_2 (N) : Les nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisées à un pH faiblement acide

- Ag-TiO₂ (cal) : Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisées à un pH faiblement acide et calcinée.

IV.5.1. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau IV.2 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

Echantillons \ Quantité (µg)	50	100	200	300
TiO ₂	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
TiO ₂ (NPs)	10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (aj)	11 13*	12 14*	13 16*	14,5 17*
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	≤ 9	≤ 9	11*	12*
Ag-TiO ₂ (N)	10	11 12*	11 13*	11,5 15*
Ag-TiO ₂ (cal)	11*	12*	13*	Non réalisé

*Présence d'un effet bactériostatique

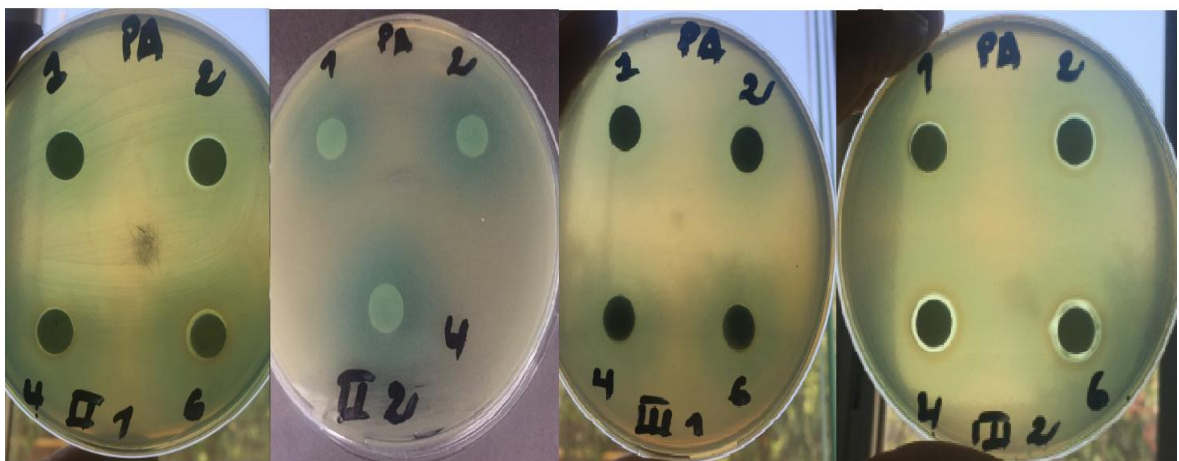


Figure IV.15 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

Discussion

Le TiO₂ (commercialisé) ne présente aucune activité antibactérienne sur la souche « Gram négative » le « *Pseudomonas aeruginosa* », tandis que les NPs de TiO₂ présentent une activité même si elle est faible.

Les 04 échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ présentent un effet antibactérien plus important qu'à celui obtenu avec le TiO₂ (NPs), cet effet s'améliore quand en augmente la concentration des nanocomposites.

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj), synthétisés à un pH fortement acide présentent l'effet bactériostatique et bactéricide le plus important. Ceci confirme l'influence du pH et de la température sur la qualité des nanocomposites à synthétiser, de plus l'amélioration de l'effet antibactérien prouve l'effet de synergie des nanocomposites Ag-TiO₂.

IV.5.2. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau IV.3 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

Echantillons	Quantité (µg)			
	50	100	200	300
TiO ₂	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
TiO ₂ (NPs)	11	13	11	11
Ag-TiO ₂ (aj)	12*	11	12,5	13
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	12*	13*	13,5*	15*
Ag-TiO ₂ (N)	10	10	11	11 14*
Ag-TiO ₂ (cal)	10	11	15	Non réalisé

*Présence d'un effet bactériostatique

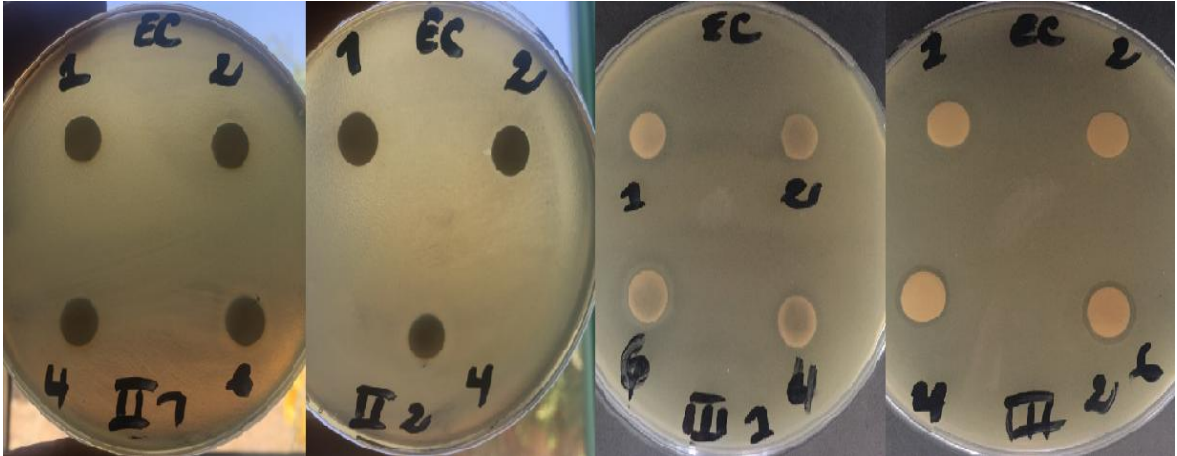


Figure IV.16 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

Discussion

Les NPs de TiO₂ présentent une activité antibactérienne sur l'*Escherichia Coli* par rapport au TiO₂ (commercialisé) qui ne présente aucune activité antibactérienne sur cette bactérie.

Les 04 échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ présentent un effet antibactérien meilleur que celui obtenu avec le TiO₂ (NPs).

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) synthétisés à un pH fortement acide présentent l'effet bactéricide le plus important tandis que les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) synthétisés à un pH fortement acide et calcinés présentent le meilleur effet bactériostatique. Ce qui confirme aussi l'influence du pH et de la température sur la qualité des nanocomposites à synthétiser.

IV.5.3. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau IV.4 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

Echantillons \ Quantité (µg)	50	100	200	300
TiO ₂	Non réalisé	Non réalisé	≤ 9	≤ 9
TiO ₂ (NPs)	Non réalisé	Non réalisé	11	11

Ag-TiO ₂ (aj)	11	12,5	13	14
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
Ag-TiO ₂ (N)	10	10,5	12	13
Ag-TiO ₂ (cal)	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9

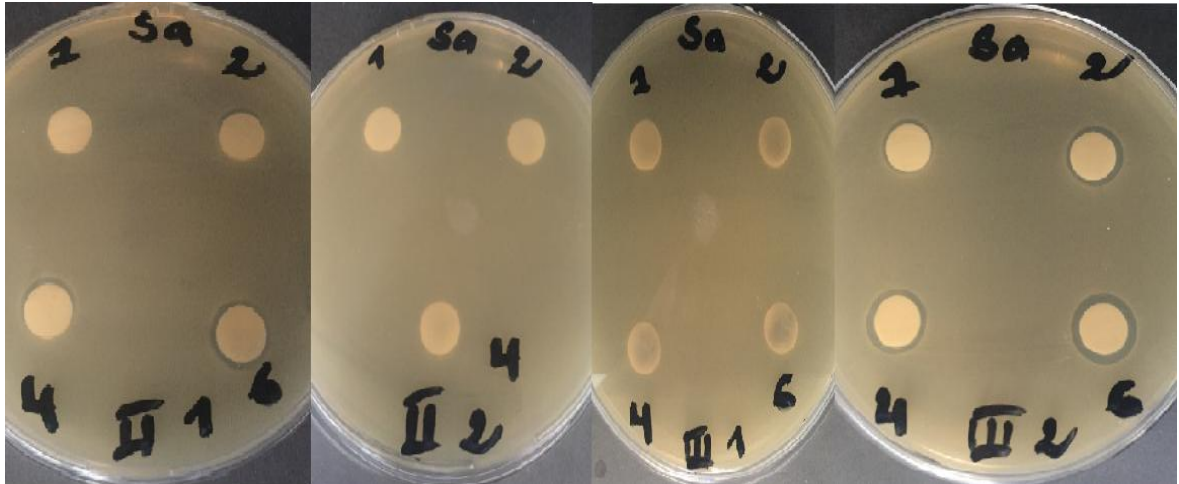


Figure IV.17 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

Discussion

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) synthétisés à un pH fortement acide présentent un effet bactéricide meilleur que celui obtenu avec les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N) synthétisés à un pH faiblement acide. Cependant, les deux échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ calcinés ne présentent aucun effet antibactérien sur la bactérie *Staphylococcus aureus*.

Les nanocomposites d'AgTiO₂ (aj) et d'Ag-TiO₂ (N) présentent une relation proportionnelle entre la concentration et le diamètre de la zone d'inhibition.

IV.5.4. Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau IV.5 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

Echantillons	Quantité (µg)			
	50	100	200	300
TiO ₂	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
TiO ₂ (NPs)	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
Ag-TiO ₂ (aj)	12	12,5	13	14
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	10*	12	/	13*
Ag-TiO ₂ (N)	≤ 9	≤ 9	12*	12
Ag-TiO ₂ (cal)	≤ 9	≤ 9	13*	Non réalisé

*Effet bactériostatique

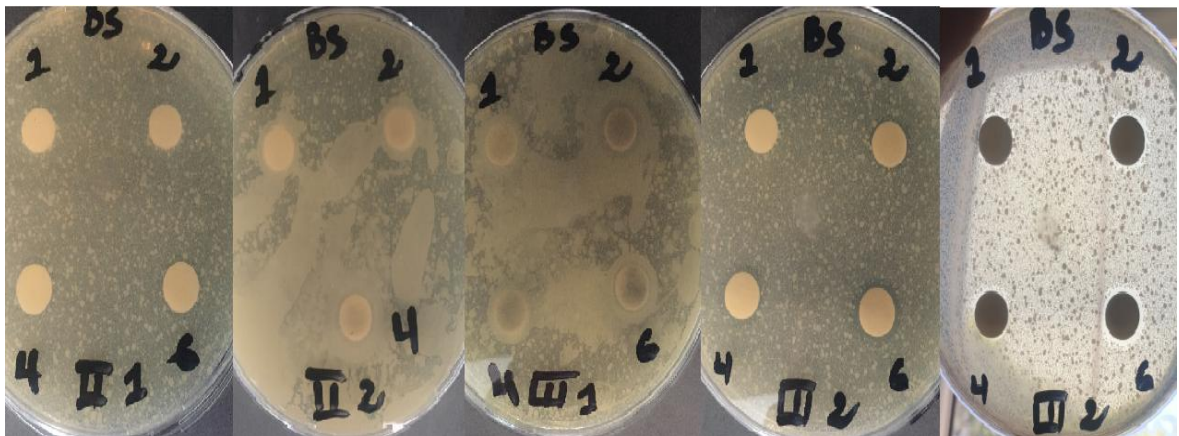


Figure IV.18 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

Discussion

Vu les résultats obtenus, le TiO₂ (NPs) synthétisé et le TiO₂ (commercialisé) ne présentent aucun effet antibactérien sur la bactérie « Gram positive » le *Bacillus subtilis*.

Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) synthétisés à un pH fortement acide présentent un effet bactéricide meilleur que celui obtenu avec les autres échantillons synthétisés des nanocomposites d'Ag-TiO₂.

IV.5.5. Étude comparative de l'effet antifongique des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur la levure « *Candida albicans* »

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau et la figure ci-dessous.

Tableau IV.6 : Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

Echantillons	Quantité (µg)			
	50	100	200	300
TiO ₂	10	10	10	10
TiO ₂ (NPs)	10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (aj)	10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (aj, cal)	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
Ag-TiO ₂ (N)	10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (cal)	10	10	10	10

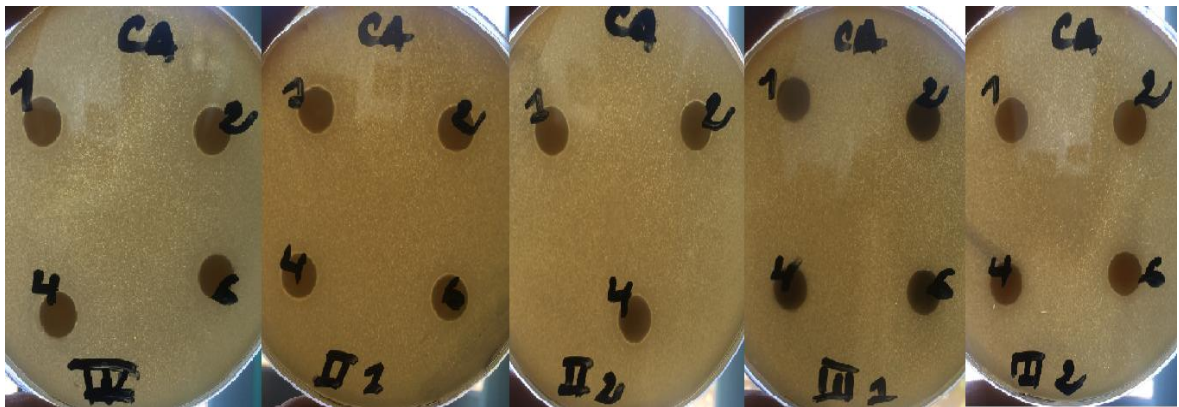


Figure IV.19 : Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

Discussion

Vu les résultats obtenus, les différents échantillons tester présentent un effet antifongique faible sur la levure « *Candida albicans* ».

Conclusion

Pour les quatre souches bactériennes, les différents échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés présentent un effet bactéricide et bactériostatique plus importants que celui obtenu avec les nanoparticules de TiO₂. Ce qui confirme l'effet de synergie d'Ag-

TiO₂ et le mécanisme d'action des nanoparticules d'argent, décrit dans la littérature. [74]
[75]

Les 04 échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (notamment les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj), synthétisés à un pH fortement acide) présentent un effet antibactérien important sur les bactéries « Gram négative », surtout contre le *Pseudomonas aeruginosa* qui est un pathogène nosocomial majeur, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation. L'augmentation actuelle de l'incidence des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* et les phénomènes épidémiques locaux qui en résultent sont particulièrement inquiétants, car ces souches cumulent constamment plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (efflux, imperméabilité, modification du site d'action ou inactivation enzymatique). [76]

IV.6. Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (Test in vivo)

IV.6.1. Test de toxicité des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Vu l'effet antibactérien des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj), l'évaluation de la toxicité a été réalisée sur deux doses de cet échantillon, à savoir : 20mg/0,5ml et 40mg/0,5ml. Le suivi a été assuré du moment de l'administration des solutions jusqu'au 14^{ème} jour.

Discussion

Après l'administration des deux doses aux deux groupes différents de souris NMRI, aucun des signes suivants n'a été enregistré pendant la période de suivi :

- Modification de la peau
- Activité somato-motrice
- Tremblement
- Convulsion
- Salivation
- Léthargie
- Coma
- Mortalité

Donc, on peut conclure que les deux doses administrées des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) ne sont pas toxiques.

IV.6.2. Effet irritant de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur la peau de l'animal

En raison de l'effet antibactérien significatif prouvé avec les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) (calcinés ou non calcinés), ces deux échantillons ont été utilisés comme substances actives pour la formulation d'une pommade afin de pouvoir évaluer son effet irritant, conformément au protocole décrit dans l'OCDE 404.

Tableau IV.7 : Cotation des réactions cutanées d'après l'OCDE [67]

Formation d'érythème et d'escarre	
Pas d'érythème	0
Érythème très léger (à peine perceptible)	1
Érythème bien défini	2
Érythème modéré à grave	3
Érythème grave (rouge violacé) à formation d'escarre empêchant la cotation de l'érythème	4
Formation d'œdème	
Pas d'œdème	0
Œdème très léger (à peine perceptible)	1
Œdème léger (pourtour de la zone œdémateuse bien délimité par une enflure nette)	2
Œdème modéré (enflure d'environ 1 mm)	3
Œdème grave (enflure de plus de 1 mm s'étendant au-delà de l'aire exposée)	4

Les tableaux suivants représentent les résultats obtenus sur 14 jours de suivi, selon le système de cotations des réactions cutanées décrit dans l'OCDE 404.

Tableau IV.8 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Race	Rats type Wistar								
Temps	T ₀	3 min	1 h	2 h	4 h	24 h	48 h	72 h	14 jrs

Formation d'érythème et d'escarre									
Cotation	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Formation d'œdème									
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Figure IV.20 : Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Discussion

A l'application de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) on constate l'apparition d'érythème bien défini qui disparaît après 3 minutes.

Aucune irritation ni formation d'érythème, d'escarre ou d'œdème n'est observée après 3 minutes de l'application de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) et ce pendant toute la période de suivi (14 jours).

Tableau IV.9 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

Race	Rats type Wistar								
Temps	T ₀	3 min	1 h	2 h	4 h	24 h	48 h	72 h	14 jrs

Formation d'érythème et d'escarre									
Cotation	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Formation d'œdème									
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Figure IV.21 : Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

Discussion

Présence d'érythème bien défini qui disparaît après 3 minutes de l'application de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal). Après 3 minutes de l'application de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal), aucune irritation, ni formation d'érythème, d'escarre ou d'œdème n'est observée et ce pendant les 14 jours de suivi.

Conclusion

L'évaluation macroscopique cutanée montre qu'aucune irritation ni formation d'érythème, d'escarre ou d'œdème n'est enregistrée pendant les 14 jours de suivi après l'application des pommades à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) et à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal).

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les nanocomposites présentent une voie d'avenir en raison de l'amélioration des performances des matériaux. L'effet antibactérien des matériaux ainsi que leurs propriétés structurales, physiques, chimiques, optiques, catalytiques, mécaniques ou électriques qui peuvent changer à l'effet de leurs taille, ouvrent des nouveaux horizons dans le domaine pharmaceutique, biomédical, cosmétique et alimentaire, ...etc.

L'objectif de ce travail était de synthétiser des nanocomposites d'Ag-TiO₂ par une voie chimique qui est le procédé « Sol-gel » et ce dans le but de prouver leur effet antibactérien ainsi que leur l'effet de synergie.

Les quatre échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ qui ont été synthétisés à différents pH et températures ont été retenus pour exploitation. La caractérisation par EDX-MEB, DLS et IR nous a confirmé la composition chimique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ ainsi que leur taille nanométrique qui été de 60 à 70nm.

L'étude de l'effet antibactérien des échantillons synthétisés nous a permis de prouver l'effet de synergie des nanocomposites d'Ag-TiO₂ par rapport au NPs de TiO₂ qui ont été synthétisés par le même procédé. C'est l'un des axes les plus visés dans ce travail.

L'effet bactéricide et bactériostatique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ a été constaté sur les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. L'effet antibactérien le plus important a été enregistré sur les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) synthétisés à un pH fortement acide contre les bactéries à Gram négatif, notamment le *Pseudomonas aeruginosa*.

Pour la sécurité des patients, des tests in vivo sur animal ont été réalisés conformément aux protocoles de l'OCDE. Le premier test est le « Test de toxicité » qui a été réalisé sur les nanocomposites d'AgTiO₂ (aj) à deux doses différentes, ce test a démontré l'absence des signes de toxicité indiqués dans l'OCDE. Le deuxième test est le test « Effet irritant » qui a été réalisé sur une pommade élaborée à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) synthétisés, dont l'évaluation macroscopique a démontré qu'aucune irritation ni formation d'érythème, d'escarre ou d'œdème n'a été enregistrée pendant une période de suivi de 14 jours.

Ce modeste travail est une initiation à la recherche dans le domaine des nanocomposites. En perspective, d'autres tests doivent être réalisés afin de pouvoir valoriser les résultats

obtenus, à savoir : la validation des conditions opératoires du procédé de synthèse utilisé, la confirmation de la structure cristalline ou amorphe des nanocomposites synthétisés et le développement d'un produit à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et ce dans le but de pouvoir mettre en évidence d'autres effets et propriétés des nanocomposites d'Ag-TiO₂.

Sur le plan économique, la synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂ a été réalisée à partir d'un procédé de chimie douce « Sol-gel » qui ne nécessite pas des installations complexes.

Sur le plan social, tenant compte de l'effet antibactérien prouvé sur les bactéries à Gram négatif, notamment, le *Pseudomonas aeruginosa*, qui est un pathogène responsable d'infections nosocomiales, des infections aiguës ou chroniques, parfois grave et mortelle, un patient bien protégé contre les microorganismes pathogènes en diminuant le temps de guérison, constitue un soulagement pour le patient lui-même et pour son entourage.

Liste des références

- [1] Belfennache D., « Elaboration et étude de nanoparticules Au/TiO₂ et Ag/TiO₂ », Mémoire de magister en physique, Université Mentouri, Constantine
- [2] Ait Braham J., YAICI S., « Élaboration des couches minces de TiO₂, TiO₂ dopé Ag, et nanocomposites Ag/TiO₂ par voie sol-gel. Caractérisations structurales et optiques », Master en physique, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, (2016)
- [3] Marano, F., & Guadagnini, R., « Les nanoparticules dans l'alimentation : quels risques pour le consommateur ? Cahiers de Nutrition et de Diététique », 48(3), P. 142–150, (2013).
- [4] Yan X., Guo, Z., « Introduction to Nanocomposites. Multifunctional Nanocomposites for Energy and Environmental Applications », P. 1-5, (2018)
- [5] Bourlioux P., « De quelles alternatives notre arsenal thérapeutique anti-infectieux dispose-t-il face aux bactéries multi-résistantes ? », Annales Pharmaceutiques Françaises 71, 150-158, (2013)
- [6] Rai M., Yadav A., Gade A., « Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials », Biotechnology Advances, 27(1), P. 76–83, (2009)
- [7] Eric Gaffet, « Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. Comment implémenter un développement sûr ». Comptes Rendus Physique, 12(7), P. 648-658, (2011)
- [8] Myriam Ricaud, Olivier Witschger, « Les nanomatériaux, définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention », Institut national de recherche et de sécurité pour la prévention des accidents du travail et des maladies professionnelles (INRS), P. 3-48, (2012)
- [9] Journal officiel de l'Union Européenne, « Recommandation de la commission du 18 octobre 2011 relative à la définition des nanomatériaux (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) », L 275/40, (2011)

- [10] David Lantiat, « Morphologie et auto-organisation de nanoparticules métalliques dispersées dans des matrices diélectriques : influence sur les propriétés optiques. Matière Condensée ». Université de Poitiers, (2008).
- [11] Wael H., « Elaboration par voie sol-gel et étude microstructurale de gels et de couches minces de SnO₂ », thèse de doctorat, Chapitre I, Université de Limoges, France (2009)
- [12] Alouache F., « Elaboration et caractérisation des aérogels monolithiques de ZnO : Ag/SiO₂ par voie sol-gel », Mémoire de master, Chapitre II, Université A. MIRA de Bejaia, (2014)
- [13] C. Renard, C. Ricolleau, E. Fort, S. Besson, T. Gacoin, and J.-P. Boilot, « Coupled technique to produce two-dimensional superlattices of nanoparticles ». *Appl. Phys. Lett.* 80, P. 300-302 (2002)
- [14] J. Arbiol, E. Rossinyol, A. Cabot, F. Peiró, A. Cornet, J. R. Morante, F. Chen, and M. Liu, « Noble metal nanostructures synthesized inside mesoporous nanotemplate pores », *Electro. Sol. State Lett.* 7, P.17–19 (2004)
- [15] S. Besson, « Organized mesoporous silica films: synthesis, characterization of the structure and application to the growth of nanoparticles », thèse de Doctorat, Ecole Polytechnique (2002)
- [16] Jeevanandam, J., Chan, Y. S., & Danquah, M. K., « Calcination-Dependent Morphology Transformation of Sol-Gel- Synthesized MgO Nanoparticles », *ChemistrySelect*, 2(32), 10393-10404, (2017)
- [17] R. A. Wood, P. D. Townsend, N. D. Skelland, D. E. Hole, J. Barton, and C. N. Afonso, « Annealing of ion implanted silver colloids in glass ». *J. Appl. Phys.* 74, 5754–5756, (1993)
- [18] Buzea C, Pacheco II, Robbie K., « Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity», *Biointerphases* ; 2(4):MR17–R71, (2007)
- [19] Preining O., « The physical nature of very, very small particles and its impact on their behavior », *J. Aerosol Sci.* 1998; 5(6):481–4495, (1998).

[20] Conseil des académies canadiennes. Comité d'experts sur les nanotechnologies, « Petit et différent : perspective scientifique sur les défis réglementaires du monde nanométrique », P. 152, (2008).

[21] Marie-Anne Guitou, « Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO₂ », Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01011269, (2014)

[22] Silpa Raj, Shoma Jose, Sumod U. S., Sabitha M, « Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges », Pharm Bioall Sci 2012; 4:186-93, (2012)

[23] Karla Chaloupka, Yogeshkumar Malam and Alexander M. Seifalian, « Nanosilver as a new generation of nanoproduit in biomedical applications », Trends in Biotechnology, November 2010, Vol. 28, No. 11, P. 580-588, (2010)

[24] Chimie Association Toxicologie, « Nanoargent-une-nouvelle-carrière pour l'argent », document ATC, (janvier 2011)

[25] Chadhry Q, Scotter M, Blackburn J, Ross B, Boxalt A, Castle L, Aitken R, Watkins R, « Applications and implications of nanotechnologies for the food sector ». Food Addit. Contam, 25 (3) : 241–258, (2008).

[26] Wei, L., Lu, J., Xu, H., Patel, A., Chen, Z.-S., Chen, G., « Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications », Drug Discovery Today (2014)

[27] Maurice Bernard, Cours de chimie minérale 2^{ième} édition .DUNOD, (2005).

[28] Reyes-Coronado, D., Rodríguez-Gattorno, G., Espinosa-Pesqueira, M. E., Cab, C., de Coss, R., & Oskam, G., « Phase-pure TiO₂ nanoparticles : anatase, brookite and rutile », Nanotechnology, 19(14), 145605, (2008)

[29] A. Khataee, G. A. Mansoori, « Nanostructured titanium dioxide materials, properties, preparation and applications », World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, (1997)

[30] Australian Government, « A review of the scientific literature on the safety of nanoparticulate titanium dioxide or zinc oxide in sunscreens », Departement of health and ageing, Therapeutics Good Administration, P. 1-32, (July 2009)

- [31] J. Muscat, V. Swamy, N. M. Harrison, « First-principles calculations of the phase stability », *PHYSICAL REVIEW B*, Vol. 65, 224112, (2002)
- [32] N. Cotolan, M. Rak, M. Bele, A. C˘or, L. Muresan, I. Miloˇsev, « Sol-gel synthesis, characterization and properties of TiO₂ and Ag-TiO₂ coatings on titanium substrate », *Surface & Coatings Technology*, (2016)
- [33] Burtin Hélène, Cheruel Anthony, Collu Emilie, Dudognon Emilia, Moureau Clément, Schmitt Caroline, Pace Hélène, Plessis Manon, « Sécurité sanitaire des aliments », partie 1 et partie 7, Université de Lorraine, (2014)
- [34] Bouskraoui M., Zouhair S., Sora N., Benaouda A., Zerouali K., Mahmoud M., « Le guide pratique des bactéries pathogènes », Société Maroccaine d'Infectiologie Pédiatrique et de Vaccinologie, (2017)
- [35] Agence nationale de sécurité sanitaire alimentation, environnement, travail, (anses), « *Staphylococcus aureus* et entérotoxines staphylococciques », Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments, (Septembre 2011).
- [36] https://fr.wikipedia.org/wiki/Bacillus_subtilis
- [37] https://fr.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa
- [38] https://fr.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli
- [39] Lagane Céline, « Rôle de l'IL-13 et des ligands de ppar-  dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans*. Implication de ppar-  », Université de TOULOUSE III – PAUL SABATIER, (2007).
- [40] François L. Mayer, Duncan Wilson, Bernhard Hube, « *Candida albicans* pathogenicity mechanisms », *Virulence*, 4:2, 119-128, (2013)
- [41] https://fr.wikipedia.org/wiki/Candida_albicans
- [42] Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris, « Hygiène des mains Guide de bonnes pratiques », P.12, 3^{ me} édition, (2001)

- [43] Commission Européenne, « Proposition de la Commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne », Ip/01/885, Bruxelles, (Juin 2001)
- [44] Boussaa K., Izeraren L., « Etude de l'activité antibactérienne des extraits de *Rhamnus alaternus* L. », Mémoire de Master, Université Abderrahmane Mira de Bejaia, (2016)
- [45] I. Sondi, B. Salopek-Sondi, J., « Silver nanoparticles as antimicrobial agent : a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria », *Journal of Colloid and Interface Science* 275, P. 177–182, (2004)
- [46] Issam Mtimet « Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent », Autre. INSA de Rouen, 2011. Français. INNT: 2011ISAM0019 (2012)
- [47] Sukdeb Pal, Yu Kyung Tak and Joon Myong Song, « Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle ? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli* », *Applied and environmental microbiology* Vol. 73 No.6, P. 1712-1720, (2007)
- [48] Jun Sung Kim, Eunye Kuk, Kyeong Nam Yu, Jong-Ho Kim, Sung Jin Park, Hu Jang Lee, So Hyun Kim, Young Kyung Park, Yong Ho Park, Cheol-Yong Hwang, Yong Kwon Kim, Yoon-Sik Lee, Dae Hong Jeong, Myung-Haing Cho, « Antimicrobial effects of silver nanoparticles », *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 3 (2007) 95– 101, (2007)
- [49] Agence française de sécurité sanitaires des produits de santé (afssaps), « Etat des connaissances relatif aux nanoparticules de dioxyde de titane et d'oxyde de zinc dans les produits cosmétiques en termes de pénétration cutanée, de génotoxicité et de cancérogenèse », (Mars 2011)
- [50] Handbook of pharmaceutical excipients 6th Ed, P.308, (2009)
- [51] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME II, « Chlorhydrique (acide) concentré », P.2199, (2017)
- [52] SIGMA ALDRICH, Fiche de Sécurité, « Titanium tetrachloride », (2016)
- [53] Budavari, S. (ed). The Merck Index, « An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals ». Whitehouse Station, NJ : Merckand Co., Inc, P.1618, (1996)

- [54] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME II, « Ammoniaque (Solution concentrée d') », P.1852, (2017)
- [55] SIGMA ALDRICH, Fiche de Sécurité, « Ammonium Hydroxide solution », (2016)
- [56] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME II, « Hydrogène (Peroxyde d'), solution de, à 30 pour cent », P.2899, (2017)
- [57] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME II, « Argent (Nitrate d') », P.1889, (2017)
- [58] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME III, « Nitrique (Acide) », P.3386, (2017)
- [59] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME I, « 2.3.1. Réactions d'identité des ions et des groupes fonctionnels, CHLORURES », P.134, (2017)
- [60] <http://www.horiba.com/fr/scientific/products/particlecharacterization/technology/dynamic-light-scattering/>
- [61] Marie Choël, « Analyse quantitative des particules atmosphériques par microscopie électronique à balayage couplée à la spectrométrie d'émission X ». Océan, Atmosphère. Université du Littoral Côte d'Opale, Français. fftel-00011532, (2005)
- [62] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME I, « 2.9.33. Caractérisation des solides cristallins et partiellement cristallins par diffraction X sur poudre », P.381, (2017)
- [63] <https://www.lrccp.com/fr/qui-sommes-nous/moyens-dessais/item/spectrophotometrie-infrarouge-irtf>
- [64] Pharmacopée Européenne 9^{ème} Ed, TOME III, « Paraffine liquide », P.3495, (2017)
- [65] Pharmacopée européenne 9^{ème} Ed TOME III, « Vaseline blanche », P.4163, (2017)
- [66] Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE 423. « Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë ». P. 2-4. (Décembre 2001)
- [67] Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. OCDE 404. « Effet irritant/corrosif aigu sur la peau », P.2-4, (Juillet 2015)

- [68] C. J. Brinker et G.W. Scherer, « Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel processing » Academic Press, (1990)
- [69] Mónica Andrea Vargas, Jorge E. Rodríguez-Páez, « Amorphous TiO₂ nanoparticles: Synthesis and antibacterial capacity », *Journal of Non-Crystalline Solids* 459, 192–205, (2017)
- [70] H. Rosi and S. Kalyanasundaram, « Synthesis, characterization, structural and optical properties of titanium-dioxide nanoparticles using *Glycosmis cochinchinensis* Leaf extract and its photocatalytic evaluation and antimicrobial properties », *World News of Natural Sciences* 17, P. 7-9, (2018)
- [71] Nagaveni, K., et al., « Synthesis and Structure of Nanocrystalline TiO₂ with Lower Band Gap Showing High Photocatalytic Activity », *Langmuir*, Vol.20, No. 7, P. 2900-2907, (2004)
- [72] Haw-Yeu Chuang and Dong-Hwang Chen, « Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO₂ and NiAg@TiO₂ nanoparticles », *Nanotechnology* 20, 105704 (10pp), (2009)
- [73] E. G. Mornani, P. mosayebian, D. Dorrnian, K. Behzad, « Effect of calcination temperature on the size and optical properties of synthesized ZnO nanoparticles », *Journal of Ovonic Research*, Vol. 12, No. 2, P. 75-80, (2016)
- [74] E.T. Hwang, J.H. Lee, Y.J. Chae, Y.S. Kim, B.C. Kim, B.I. Sang, M.B. Gu, « Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria », *Small* 4, P. 746-750, (2008)
- [75] M.Y. Lan, C.P. Liu, H.H. Huang, S.W. Lee, « Both enhanced biocompatibility and antibacterial activity in Ag-decorated TiO₂ nanotubes », *PLoS One* 8, P. 6-7, (2013)
- [76] François Barbier et Michel Wolff, « Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, Vers l'impasse thérapeutique ? », *MEDECINE/SCIENCES, M/S* n° 11, vol. 26, P. 960, (Novembre 2010)