

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITÉ DE BLIDA-1

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences Biologiques



Mémoire

En Vue de l'Obtention du Diplôme

Master En Sciences biologiques

Option : Microbiologie

Intitulé du mémoire

**Évaluation des activités antioxydantes et antimicrobiennes des
nanoparticules d'argent à base des extraits du citron**

Présenté par :

Mlle.BOULARAS Ayatelhouda

Mlle.BOUREGAA Nouha

Membres de jurys :

Présidente	Mme. HAMAIDI. F	Professeur	USDB-1
Examinatrice	Mme. LOUNACI. L	MCB	USDB-1
Promotrice	Mme.MOHAMED MAHMOUD. F	MCA	USDB-1
Co-promoteur	Mr. BENNOUI Sid Ahmed	Doctorant	USDB-1

Année universitaire

2024 /2025

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITÉ DE BLIDA-1

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences Biologiques



Mémoire

En Vue de l'Obtention du Diplôme

Master En Sciences biologiques

Option : Microbiologie

Intitulé du mémoire

**Évaluation des activités antioxydante et antimicrobienne des
nanoparticules d'argent à base des extraits du citron**

Présenté par :

Mlle. BOULARAS Ayatelhouda

Mlle. BOUREGAA Nouha

Membres de jurys :

Présidente	Mme. HAMAIDI. F	Professeur	USDB-1
Examinatrice	Mme. LOUNACI. L	MCB	USDB-1
Promotrice	Mme. MOHAMED MAHMOUD. F	MCA	USDB-1
Co-promoteur	Mr. BENNOUI Sid Ahmed	Doctorant	USDB-1

Année universitaire

2024 /2025

Remerciement

Tout au long de ce cycle universitaire, après de nombreux efforts et beaucoup de persévérance, nous avons eu la chance d'être entourés, soutenus et guidés par des personnes précieuses. À tous ceux qui nous ont accompagnés, aidés, encouragés et encadrés, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements.

Nous remercions avant tout le Bon Dieu, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la santé, la patience et la volonté nécessaires pour mener à bien ce travail.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Madame **HAMAIDI F**, Professeure à Université de Blida-1, Présidente du jury, pour l'honneur qu'elle nous a fait en acceptant d'évaluer ce mémoire, ainsi que pour l'intérêt et l'attention portés à notre travail.

Nos remerciements vont également à Madame **LOUNACI L**, Maîtresse de conférences à Université de Blida-1, pour ses remarques pertinentes et ses observations constructives qui ont grandement contribué à l'enrichissement de ce mémoire.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Madame **MOHAMED MAHMOUD.F** maîtresse de conférence à Université de Blida-1, pour sa rigueur scientifique, son encadrement attentif, sa disponibilité et la qualité de ses conseils tout au long de notre travail de recherche.

Nos remerciements s'adressent également à Monsieur **BENNOUI Sid Ahmed**, pour son appui constant, ses orientations méthodologiques et son accompagnement précieux lors des différentes étapes de ce mémoire.

Enfin, nous remercions l'ensemble des enseignants de **Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie** pour la qualité de leur enseignement, ainsi que toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de notre parcours académique.

Dédicace

"وآخر دعواهم ان الحمد لله رب العالمين "
الحمد لله الذي ما تم جهد ولا ختم سعي إلا بفضلله، الحمد لله على البلوغ ثم الحمد لله على التمام

وحسن الخاتم

وبعد بسم الله الرحمن الرحيم أهدي تخرجي

إلى كل من أضاء بعلمه عقل غيره

إلى النور الذي ينير لي درب النجاح ومن علمني الصمود مهما تبدلت الظروف أبي الغالي

إلى اليد الخفية والقلب الحنون وصاحبة الدعاء الصادق أُمي الغالية

ادامكم الله ملوكا في عرش قلبي

إلى من كانوا يضيئون لي الطريق ويساندوني إخوتي أحبكم حبا لو مرة على أرض قاحلة

لتفجرت منها ينابيع المحبة

وإلى من كان لي عوناً وسندا وموجها لكل خطوات لمن علمني أن الحياة تجارب مدربي

مدينة لك بكل أفعالك الجميلة

إلى رفيقة دربي ومن شاركتني الرحلة من تقاسمت معها لحظات الفرح والحزن بدأنها معا يدا بيد

واليوم وصلنا إلى نهاية الرحلة اسأل الله لك التوفيق والسداد

وفي الختام اسأل الله ان يجعل هذا العمل علما ينتفعه به وأن يتقبله عنده وأن يكون شفيعا لنا يوم يسأل العبد

عن عمره فيما أفناه وشبابه فيما أبلاه

بولعراس آيات الهدى

Dédicace

Avant tout, merci à Dieu, le très-haut, source de sagesse et de lumière, Qui m'a guidée, soutenue et accordé la force d'achever ce travail.

Je dédie ce travail avec tout mon amour et une gratitude profonde à toutes les âmes lumineuses qui ont croisé mon chemin et ont su, à leur manière, m'apporter un souffle d'encouragement, un regard de confiance, ou un simple mot qui m'a fait avancer.

À mes chers parents,

Pour votre amour inconditionnel, votre patience infinie et vos sacrifices silencieux.

Vous êtes la force discrète derrière chacun de mes pas.

C'est avec une immense fierté et du plus profond de mon cœur que je vous dédie l'aboutissement de mes efforts et l'accomplissement de ce parcours.

À mon pilier dans cette vie, à la source de ma foi et de mon courage, à ma chance précieuse, à ma victoire intime et à ma plus grande fierté.

Ce travail est le fruit de vos prières, de votre confiance inébranlable, et je vous en serai éternellement reconnaissante.

À ma sœur Yasmine, alliée précieuse dans cette aventure. Ton aide concrète, ta bienveillance et ton implication ont fait toute la différence.

À mon frère Mahdi, mon bras droit, mon repère solide dans les tempêtes silencieuses.

À ma belle-sœur Sara, une deuxième sœur, une âme douce, attentive et toujours présente. Bien que loin par la distance, vous avez été si proches par le cœur.

Vos mots d'encouragement et la fierté exprimée m'ont réchauffé l'âme et porté dans les moments d'incertitude.

À ma nièce Assia-lina, Petite étoile joyeuse, ton sourire innocent est une douce promesse d'espoir.

À ma binôme Ayat, Pour sa précieuse collaboration, sa rigueur, et la belle complicité partagée tout au long de cette aventure. Merci d'avoir été une partenaire digne et un soutien fidèle.

À moi-même, Pour avoir cru, persévéré, parfois douté mais jamais abandonné. Pour les efforts silencieux, les nuits blanches, les moments de solitude. Ce mémoire est aussi la célébration d'un chemin parcouru avec courage et passion.

Cette dédicace est aussi une promesse : continuer de rêver, de lutter et d'apprendre.

NOUHA BOUREGAA

Résumé

Face à la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens, ce travail s'inscrit dans une approche de synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs) en utilisant différents extraits de trois citron « *Citrus limon* » notamment le jus, les écorces, les graines, ainsi que les feuilles traitées par micro-ondes et chauffage conventionnel ont été utilisés comme agents réducteurs et stabilisants dans le processus de biosynthèse. L'influence de plusieurs paramètres réactionnels (pH, température, temps de réaction, concentration en nitrate d'argent) a été étudiée en vue d'optimiser les conditions de formation des AgNPs.

Les nanoparticules obtenues ont été caractérisées par spectroscopie UV-Visible, diffusion dynamique de la lumière (DLS), potentiel zêta et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), révélant des tailles, une stabilité colloïdale et une monodispersité variables selon le type d'extrait utilisé. Les extraits de feuilles et d'écorces ont montré une meilleure homogénéité et stabilité.

L'évaluation des activités biologiques a mis en évidence une activité antioxydante globalement faible à modérée, avec un maximum d'inhibition (52,03 %) observé pour les AgNPs issues des feuilles traitées par micro-ondes. L'activité antibactérienne a été importante, notamment pour les AgNPs obtenues à partir des feuilles chauffées à la plaque (AgNPs-FPc) et des graines, avec des CMI très faibles, allant jusqu'à 0,291 ppm contre *Escherichia coli*. Les AgNPs se sont également révélées actives contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Klebsiella pneumoniae*. Enfin, l'activité antifongique s'est montrée sélective, avec une forte inhibition de *Candida albicans* mais une absence totale d'effet sur *Aspergillus niger*.

Ces résultats confirment l'efficacité des extraits de citron comme alternative écologique et prometteuse pour la production de nanoparticules d'argent aux propriétés antimicrobiennes. Ils ouvrent la voie à des applications potentielles dans les domaines de la médecine humaine, vétérinaire et de l'agroalimentaire.

Mots-clés

Activité antioxydante, Activité antimicrobienne, *Citrus limon*, Extraits végétaux, Nanoparticules d'argent, Synthèse verte.

Abstract

In response to the growing threat of antimicrobial resistance, this work adopts a green synthesis approach to produce silver nanoparticles (AgNPs) using various extracts of *Citrus limon*, including juice, peels, seeds, and leaves treated by microwave and conventional heating, as reducing and stabilizing agents in the biosynthesis process. The influence of several reaction parameters (pH, temperature, reaction time, and silver nitrate concentration) was studied to optimize the conditions for AgNP formation.

The synthesized nanoparticles were characterized by UV–Visible spectroscopy, dynamic light scattering (DLS), zeta potential analysis, and Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), revealing varying sizes, colloidal stability, and monodispersity depending on the type of extract used. Leaf and peel extracts showed better homogeneity and stability.

Biological activity assessment revealed generally low to moderate antioxidant activity, with a maximum inhibition of 52.03% observed for AgNPs derived from microwave-treated leaves. Antibacterial activity was significant, particularly for AgNPs obtained from hot-plate-treated leaves (AgNPs-FPc) and seeds, with very low MICs reaching 0.291 ppm against *Escherichia coli*. The AgNPs were also active against *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella pneumoniae*. Finally, antifungal activity was selective, showing strong inhibition of *Candida albicans* but no effect on *Aspergillus niger*.

These findings confirm the effectiveness of lemon extracts as an eco-friendly and promising alternative for the production of silver nanoparticles with antimicrobial properties. They open the way for potential applications in human and veterinary medicine as well as in the agri-food sector.

Keywords

Antioxidant activity, Antimicrobial activity, *Citrus limon*, Plant extracts, Silver nanoparticles, Green synthesis.

ملخص

في مواجهة التهديد المتزايد لمقاومة الميكروبات، يندرج هذا العمل في إطار نهج التخليق الأخضر لجسيمات الفضة النانوية (AgNPs)، باستخدام مستخلصات مختلفة من الليمون *Citrus limon*، بما في ذلك العصير، القشور، البذور، وكذلك الأوراق المعالجة بالتسخين الميكروويفي والتسخين التقليدي، كعوامل اختزال وتثبيت في عملية التخليق الحيوي. تمت دراسة تأثير عدة عوامل تفاعلية (الرقم الهيدروجيني، درجة الحرارة، زمن التفاعل، وتركيز نترات الفضة) بهدف تحسين شروط تكوين AgNPs. تم توصيف الجسيمات النانوية المنتجة باستخدام تقنية التحليل الطيفي فوق البنفسجي-المرئي، وتشتت الضوء الديناميكي (DLS)، وتحليل الجهد الكهربائي (الزيتا)، والتحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء بتحويل فورييه (FTIR)، وكشفت النتائج عن اختلاف في الحجم، والثبات الغرواني، والتوزيع الأحادي حسب نوع المستخلص النباتي المستخدم. وقد أظهرت مستخلصات الأوراق والقشور تجانساً وثباتاً أفضل.

أظهر تقييم الأنشطة البيولوجية نشاطاً مضاداً للأكسدة يتراوح بين الضعيف والمتوسط، مع أقصى نسبة تثبيط بلغت 52.03% للجسيمات النانوية المستخلصة من أوراق عولجت بالميكروويف. أما النشاط المضاد للبكتيريا فقد كان ملحوظاً، خاصةً لجسيمات AgNPs المستخلصة من الأوراق المعالجة بالتسخين على اللوحة الساخنة (AgNPs-FPC) ومن البذور، حيث سُجلت أقل تركيزات مثبطة (MICs) وصلت إلى 0.291 جزء في المليون ضد *Escherichia coli*. كما أظهرت الجسيمات نشاطاً ضد *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus* و *Klebsiella pneumoniae*. وأخيراً، أظهر النشاط المضاد للفطريات انتقائية، حيث تم تثبيط *Candida albicans* بقوة، في حين لم يُلاحظ أي تأثير على *Aspergillus niger*.

تؤكد هذه النتائج فعالية مستخلصات الليمون كبديل بيئي واعد لإنتاج جسيمات الفضة النانوية ذات الخصائص المضادة للميكروبات، مما يفتح آفاقاً لاستخدامات محتملة في مجالات الطب البشري والبيطري والصناعات الغذائية.

الكلمات المفتاحية:

جسيمات الفضة النانوية – التخليق الأخضر ، *Citrus limon* ، المستخلصات النباتية ، النشاط المضاد للأكسدة ، النشاط المضاد للميكروبات

Liste des tableaux

N°	Titre
Tableau I	Différence entre les nanoparticules d'argent et l'argent colloïdal
Tableau II	Tableau représentatif de matériels biologiques utilisés
Tableau III	Récapitulatif des résultats d'optimisation du pH pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron
Tableau IV	Récapitulatif des résultats d'optimisation de température pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron
Tableau V	Récapitulatif des résultats d'optimisation du temps pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron
Tableau VI	Récapitulatif des résultats d'optimisation de la concentration pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron
Tableau VII	Pourcentages d'inhibition (PI%) en fonction de la concentration des AgNPs synthétisées à partir des extraits de citron, selon deux méthodes de calcul : sans correction de couleur (AgNPs I) et avec correction (AgNPs II).
Tableau VIII	Diamètres des zones d'inhibition (mm) des AgNPs issus des extraits de citron
Tableau IX	Récapitulatif des diamètres des zones d'inhibition (mm) des AgNPs issus des extraits de citron.
Tableau X	Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules d'argent (AgNPs) issus des extraits végétaux exprimées en (ppm) par méthode de microplaque
Tableau XI	Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence

Liste des figures

N°	Titre
Figure 01	Mécanisme possible pour la synthèse verte des AgNPs.
Figure 02	Mécanismes antibactériens des nanoparticules d'argent au niveau membranaire et intracellulaire.
Figure 03	Étapes de préparation du jus de citron
Figure 04	Étapes de préparation des extraits de feuilles de citron
Figure 05	Étapes de préparation de l'extrait d'écorces de citron
Figure 06	Étapes de préparation de l'extrait des graines de citron
Figure 07	Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différents pH.
Figure 08	Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différents pH
Figure 09	Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures.
Figure 10	Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures.
Figure 11	Observation visuelle des AgNPs biosynthétisées par des extraits de citron a différents temps de réaction.
Figure 12	Analyse spectroscopie UV-Visible des AgNPs biosynthétisées a différents temps de réaction.
Figure 13	Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes concentrations.
Figure 14	Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures.
Figure 15	Résultats de l'analyse de potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées à base des extraits végétaux de citron
Figure 16	Résultat de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des nanoparticules d'argent synthétisées à base des extraits végétaux de citron
Figure 17	L'analyse de diffusion dynamique des nanoparticules d'argent des extraits de citron.

Figure 18	Évaluation de l'activité antioxydante par test DPPH. (A) Acide ascorbique (AA) + DPPH (témoin positif), (B) Dilutions AgNPs FMo, (C) AgNPs FMo + éthanol (contrôle solvant), (D) AgNPs FMo + DPPH. N.C = DPPH (contrôle négatif).
Figure 19	Courbes de pourcentage d'inhibition (PI%) du DPPH. (A) Acide ascorbique (témoin positif), (B) AgNPs FMo (types I et II). Les graphiques de gauche montrent PI% en fonction de la concentration (ppm), ceux de droite PI% vs absorbance.
Figure 20	Évaluation de l'activité antioxydante de quatre formulations d'AgNPs. Pour chaque type, trois séries sont présentées : (1) dilutions aqueuses (contrôle de couleur), (2) Dilutions dans l'éthanol (contrôle solvant), et (3) Mélanges réactionnels avec DPPH.
Figure 21	Évaluation de l'efficacité :Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues du jus de citron.
Figure 22	Évaluation de l'efficacité :Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des graines de citron.
Figure 23	Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des écorces de citron.
Figure 24	Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des feuilles traitées par plaque chauffante et par micro-ondes.
Figure 25	Évaluation de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent sur Candida albicans.
Figure 26	Évaluation de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent sur Aspergillus niger.
Figure 27	Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice par méthode de microplaque sur les souches .
Figure 28	Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence.

Liste des abréviations

AgNPs : Nanoparticules d'argent

NPs : Nanoparticules

AgNO₃ : Nitrate d'argent

DLS : Diffusion dynamique de la lumière

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

UV-Visible Spectroscopie Ultraviolet-visible

GNB : Bactéries Gram-négatives

GPB : Bactéries Gram-positives

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

Gr-Ag-NPs : Nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'extraits de feuilles de goyave

GO-Ag : Nanocomposites à base de graphène

F-AgNPs : Nanoparticules d'argent dérivées d'extraits fongiques

CMI : Concentration inhibitrices minimales

NYT : Nystatine

CHX : Chlorhexidine

HBV : Virus de l'hépatite B

PPRV : Virus de la peste des petits ruminants

HSV : Virus de l'herpès simplex

Cr : Chromate

pHi : Potentiel d'hydrogène initial

Ppm : Particule par millions

µg/disque : Microgramme par disque d'antibiotique

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

E. Coli : *Escherichia coli*

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

C. albicans : *Candida albicans*

A. Niger : *Aspergillus niger*

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique	
I.1. Les nanoparticules (NPs).....	2
I.2. Nanoparticules d'argent (AgNPs)	2
I.2.1. Différence entre nanoparticules d'argent et l'argent colloïdal	2
I.3. Synthèse de nanoparticules d'argent (AgNPs).....	4
I.3.1 méthodes physico-chimiques.....	4
I.3.2 méthodes biologiques.....	4
I.4. Influence des paramètres physico-chimiques sur la forme et la taille des nanoparticules d'argent ..	6
I.4.1. Température.....	6
I.4.2. pH	6
I.4.3. Temps de réaction	6
I.4.4. Concentration de précurseur d'argent (AgNO ₃).....	6
I.5. Techniques de caractérisation de nanoparticules d'argent (AgNPs).....	7
I.5.1. Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	7
I.5.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	7
I.5.3. Spectroscopie Ultraviolet –visible (UV-Vis).....	7
I.5.4. Analyse du potentiel zêta	7
I.6. Activités biologiques des nanoparticules d'argent	8
I.6.1. Activité antivirale	8
I.6.2. Activité antibactérienne	8
I.6.3. Activité antifongique.....	8
I.6.4. Activité anti-inflammatoire	9
I.6.5. Activité anticancéreuse	9
I.6.6. Activité antioxydante	11
I.7. Application de nanoparticules d'argent	12
I.7.1. Application médicale	12

I.7.2. Application pharmaceutique.....	12
I.7.3. Application cosmétiques	12
I.7.4. Applications électroniques	12
I.7.5. Application textile	12
I.7.6. Application environnementale	12
I.7.7. Application dans l'alimentation et agriculture	12

Chapitre II : matériel et méthodes

II.1. Matériel.....	13
II.1.1. Matériel de laboratoire et réactifs.....	13
II.1.2. Matériel biologique	13
II.2. Méthodes.....	14
II.2.1. Préparation des extraits végétaux.....	14
II.2.1.1. Préparation du jus de citron.....	15
II.2.1.2. Préparation des extraits de feuilles de citron.....	15
II.2.1.3. Préparation des extraits de écorces de citron	17
II.2.1.4. Préparation des extraits de grains de citron.....	18
II.2.2. Synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	19
II.2.2.1. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents pH.....	19
II.2.2.2. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes températures.....	19
II.2.2.3. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes concentrations.....	19
II.2.2.4. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents temps de réaction	20
II.2.3. Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	20
II.2.3.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible (UV-Vis).....	20
II.2.3.2. Analyse du potentiel zêta.....	21
II.2.3.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	21
II.2.3.4. La diffusion de la lumière dynamique (DLS).....	21
II.2.4. Évaluation des propriétés biologiques des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	21
II.2.4.1. Activité antioxydante	21

II.2.4.2. Activité antimicrobienne	22
II.2.4.2.1. Méthode de diffusion sur disque.....	22
III.2.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	23
Chapitre III : Résultats et discussions	
III.1. Synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	24
III.1.1. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents pH.....	24
III.1.2. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes températures	29
III.1.3. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents temps de réaction.....	33
III.1.4. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes concentrations d'AgNO ₃	37
III.2. Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	41
III.2.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible (UV-Vis).....	41
III.2.2. Analyse du potentiel zêta.....	41
III.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	43
III.2.4. La diffusion de la lumière dynamique (DLS).....	45
III.3. Évaluation des propriétés biologiques des nanoparticules d'argent (AgNPs).....	46
III.3.1. Activité antioxydante	46
III.3.2. Activité antibactérienne	50
III.3.2.1. Méthode de diffusion sur disque.....	50
III.3.3. Activité antifongique	55
III.3.3.1. Méthode de diffusion sur disque.....	55
III.3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	59
III.3.5. Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence	63
Conclusion.....	68
Annexe	69
Références bibliographiques	81

Introduction 🎓

Introduction

Les nanotechnologies représentent aujourd'hui un champ de recherche en pleine expansion, avec de nombreuses applications dans les domaines de la santé, de l'environnement, de l'agroalimentaire et de la microbiologie. Parmi les nanomatériaux les plus prometteurs, les nanoparticules d'argent (AgNPs) se distinguent par leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et antifongiques largement reconnues (Almatroudi, 2020). Ces propriétés exceptionnelles sont en grande partie attribuées à leur taille nanométrique (1 à 100 nm), leur surface spécifique élevée, et leur capacité à interagir efficacement avec les membranes cellulaires des micro-organismes (Siddiqi *et al.*, 2018).

Avant même l'avènement des antibiotiques modernes, l'argent était déjà utilisé pour ses propriétés désinfectantes, cicatrisantes et conservatrices dans le traitement des infections bactériennes (Keerawella & Chamara, 2019).

Toutefois, les méthodes classiques de synthèse des AgNPs impliquent souvent des agents chimiques toxiques, coûteux, et peu compatibles avec les applications biomédicales ou environnementales (Iravani, 2011). Face à ces limites, la synthèse verte apparaît comme une alternative durable, fondée sur l'utilisation d'extraits de plantes riches en composés bioactifs (Ahmed *et al.*, 2016).

Ces extraits jouent le rôle à la fois d'agents réducteurs et stabilisants, permettant la formation de nanoparticules de manière écologique et non toxique.

Dans ce contexte, le citron (*Citrus limon*), plante médicinale largement cultivée en Algérie, constitue une source naturelle intéressante pour la synthèse verte des AgNPs. Ses différentes parties (jus, feuilles, écorces et graines) renferment une grande variété de métabolites secondaires tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les limonoïdes et les huiles essentielles, connus pour leurs effets antioxydants et antimicrobiens (Boudries *et al.*, 2020 ; Mezni *et al.*, 2016).

L'exploitation de ces extraits, y compris les résidus végétaux comme les écorces et les graines, s'inscrit dans une approche de valorisation des ressources locales et de développement durable.

Ce travail vise à évaluer les activités biologiques (antioxydante, antibactérienne et antifongique) des nanoparticules d'argent biosynthétisées à partir des extraits de différentes parties du citron. Il s'agit d'étudier la relation entre les paramètres de synthèse (pH, température, concentration, temps) et les propriétés physico-chimiques et biologiques des AgNPs obtenues.

Comment valoriser les extraits naturels issus des différentes parties du citron (*Citrus limon*) pour la synthèse verte de nanoparticules d'argent, et dans quelle mesure ces nanoparticules présentent-elles des activités biologiques efficaces, notamment antioxydante, antibactérienne et antifongique, face aux agents pathogènes résistants ?

Chapitre I :
Synthèse bibliographique 🎓

I. Synthèse bibliographique

I.1. Les nanoparticules (NPs)

Les nanoparticules (NPs), mesurant entre 1 et 100 nm, présentent des propriétés physico-chimiques remarquables qui les rendent souvent supérieures aux matériaux conventionnels. Grâce à leur grande surface spécifique, elles sont adaptées à de nombreuses applications.

Leurs caractéristiques optiques, mécaniques, magnétiques, électriques ou chimiques dépendent fortement de leur taille, forme et méthode de synthèse. Par exemple, leur comportement optique est marqué par une résonance de plasmon de surface localisée (local surface plasmon resonance) (LSPR), tandis que leur composition influence leur stabilité, réactivité ou toxicité.

Selon leur nature, les NPs sont classées en trois types : inorganiques (ex. : Ag, Au, TiO₂), organiques (ex. : liposomes) et à base de carbone (ex. : graphène, nanotubes). Parmi elles, les nanoparticules d'argent, de type inorganique métallique, sont particulièrement étudiées pour leurs propriétés uniques et leurs nombreuses applications, notamment en biotechnologie, en électronique et dans l'environnement (Dhaka et *al.*, 2023).

I.2. Nanoparticules d'argent

L'argent est un métal de transition connu depuis l'Antiquité pour ses propriétés antimicrobiennes, cicatrisantes et conservatrices, longtemps utilisé avant l'avènement des antibiotiques modernes (Keerawelle & Chamara, 2019). De masse atomique 107,87 g/mol, il est solide à température ambiante, possède une densité de 10,5, un point de fusion de 960 °C, et se distingue par sa ductilité, sa malléabilité et sa conductivité thermique et électrique (Chauvel, 2018).

Avec l'essor de la nanotechnologie, l'argent a retrouvé un intérêt majeur sous forme de nanoparticules (AgNPs), dont la taille nanométrique (1–100 nm) leur confère une efficacité accrue contre les micro-organismes grâce à leur capacité à pénétrer les cellules et perturber leur fonctionnement (Janardana Reddy, 2015).

I.2.1. Différence entre nanoparticules d'argent et l'argent colloïdal :

La différence entre les nanoparticules d'argent et l'argent colloïdal réside principalement dans leur forme et leur nature. (Tableau I)

Tableau I : Différence entre les nanoparticules d'argent et l'argent colloïdal

	Les nanoparticules d'argent	Argent colloïdal
Définition	Les nanoparticules d'argent sont des particules d'argent dont la taille est strictement réduite. Elles sont souvent stabilisées par des agents de surface et se présentent généralement sous forme de poudre fine. (Zhang et <i>al.</i> , 2016 ; Marambio-Jones & Hoek, 2010)	L'argent colloïdal est une suspension de particules d'argent dans un liquide, contenant à la fois des particules d'argent métallique et des ions d'argent. (Marambio-Jones & Hoek, 2010)
Taille	Leur taille est strictement inférieure à 100 nm, ce qui leur confère des propriétés uniques. (Zhang et <i>al.</i> , 2016)	Ces particules ont des tailles de 1 à 100 nm, mais peuvent parfois atteindre des tailles plus grandes allant jusqu'à 1000 nm en fonction de la méthode de préparation. (Sondi & Salopek-Sondi, 2004)
Composition chimique	Elles sont principalement composées d'argent métallique (Ag^0) avec des traces d'ions d'argent (Ag^+) à leur surface (Zhang et <i>al.</i> , 2016)	Il contient à la fois des particules d'argent métallique (Ag^0) et des ions d'argent (Ag^+) en solution. (Marambio-Jones & Hoek, 2010).
Stabilité	Elle nécessite des agents stabilisants pour empêcher leur agrégation (Zhang et <i>al.</i> , 2016) (plus stable due à leur faible mobilité moléculaire et à leur structure cristalline ordonnée, qui empêche l'agglomération et la dégradation) (El-Naggar et <i>al.</i> , 2020)	La stabilité dépend de la taille des particules et la présence des ions d'argent tendance d'agrégation. (Marambio-Jones & Hoek, 2010)

I.3. Synthèse de nanoparticules d'argent (AgNPs)

Il existe diverses méthodes pour produire des nanoparticules, telles que des techniques physiques, chimiques, électrochimique et biologiques. Ces méthodes utilisent des produits chimiques organiques ou inorganiques ainsi que des organismes vivants pour la synthèse.

I.3.1 méthodes physico-chimiques

Les méthodes physiques incluent des techniques comme l'évaporation-condensation, la décomposition thermique, la décharge à arc et la pulvérisation dans un liquide. Elles permettent d'obtenir des AgNPs bien dispersées, avec une taille variante entre 3,5 et 21,5 nm. Bien qu'efficaces pour maîtriser la taille et la dispersion des particules, ces méthodes nécessitent des équipements spécifiques et coûteux. (Tran *et al.*, 2018).

Les méthodes chimiques sont largement utilisées pour la synthèse des nanoparticules d'argent (AgNPs) en raison de leur simplicité. Elles reposent sur l'utilisation d'un sel d'argent, d'un agent réducteur et d'un stabilisant. La taille et la morphologie des nanoparticules dépendent fortement des étapes de nucléation et de croissance, régulées par des paramètres tels que la température, le pH, la concentration du précurseur et le temps de réaction. (Tran *et al.*, 2018).

La synthèse électrochimique repose sur la réduction des ions Ag^+ en Ag^0 sous l'effet d'un champ électrique. Elle permet un contrôle précis de la taille et de la forme des AgNPs par ajustement de la densité de courant et des conditions de réaction. L'ajout d'agents stabilisants assure leur dispersion et stabilité. Cette méthode présente l'avantage d'un bon contrôle des paramètres opératoires et d'un faible impact environnemental. (Xu *et al.*, 2020)

I.3.2. Méthodes biologiques

En alternative à ces méthodes la synthèse verte est souvent préférée car elle est à la fois écologique et économique, ne nécessitant ni températures élevées ni produits chimiques toxiques (Almatroudi, 2020). L'utilisation d'organismes biologiques tels que les bactéries, les champignons, les algues et les plantes représente une approche novatrice et respectueuse de l'environnement pour la production de nanoparticules d'argent (AgNPs) à l'échelle nanométrique. Ces AgNPs biosynthétisées sont considérées comme « eco-friendly » puisqu'elles sont obtenues sans recourir à des agents réducteurs ou stabilisateurs toxiques (Chauvel, 2018).

Parmi les approches biologiques, les micro-organismes offrent un potentiel remarquable.

Les bactéries, qu'elles soient Gram-positives ou Gram-négatives, peuvent synthétiser des AgNPs par des mécanismes intracellulaires ou extracellulaires. Dans le premier cas, les ions métalliques sont internalisés puis réduits par des enzymes intracellulaires ; dans le second, des enzymes telles que la nitrate réductase agissent à l'extérieur de la cellule. À ce titre, la bactérie *Pseudomonas stutzeri* fut la première identifiée comme capable de produire des AgNPs d'environ 200 nm (Sang & Jun, 2019 ; Galatage et *al.*, 2021)

De la même manière, les champignons constituent d'excellents candidats pour la production de nanoparticules d'argent. Leur capacité à bioaccumuler et tolérer les métaux, leur forte affinité pour l'absorption intracellulaire ainsi que leur manipulation aisée en laboratoire en font des outils puissants pour la nanotechnologie. Ils permettent de produire des matériaux innovants, tant pour la biomédecine que pour l'industrie (Muhammad et *al.*, 2016).

Les algues, quant à elles, sont de plus en plus utilisées dans la synthèse écologique des AgNPs en raison de leur richesse en composés bioactifs — tels que les métabolites secondaires, protéines ou pigments — qui favorisent la production des nanoparticules. Leur croissance rapide, leur facilité de récolte et leur capacité à hyperaccumuler les métaux en font des plateformes biosynthétiques prometteuses. La grande diversité des espèces d'algues, incluant les algues bleu-vert, brunes, vertes et rouges, offre un vaste champ d'exploration pour la production de nanoparticules (Galatage et *al.*, 2021).

Enfin, les plantes occupent une place centrale dans la synthèse verte des nanoparticules. Comme les autres méthodes biologiques, elles présentent des avantages majeurs par rapport aux approches chimiques et physiques : elles ne requièrent ni haute température, ni énergie excessive, ni agents toxiques, ce qui les rend à la fois rentables et écologiquement durables (Muhammad et *al.*, 2016). Grâce à leur large spectre de métabolites secondaires bioactifs notamment les polyphénols, flavonoïdes, terpénoïdes, acides aminés, protéines et enzymes les plantes permettent une synthèse rapide des AgNPs. Ces composés jouent un double rôle : ils réduisent les ions métalliques en nanoparticules tout en assurant leur stabilisation, évitant ainsi leur agrégation (Chauvel, 2018) (Figure 01)

Le citron (*Citrus limon*), agrume de la famille des Rutaceae originaire du sud-est asiatique, est largement exploité pour ses applications alimentaires, médicinales et biotechnologiques (Hussain et *al.*, 2014 ; Li et *al.*, 2020). Il se distingue par sa richesse en composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les acides phénoliques, les limonoïdes, la vitamine C, ainsi que les huiles essentielles. Ces métabolites secondaires, présents dans le jus, les feuilles, l'écorce et les graines, confèrent au citron des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Ramful et *al.*, 2011 ; Vardi et *al.*, 2015 ; Tucker et L.A.T., 2015 ; Soh et

Lee, 2018). Cette composition biochimique variée justifie l'intérêt croissant porté à Citrus limon dans le cadre de la synthèse verte des nanoparticules d'argent et de leurs applications biomédicales.

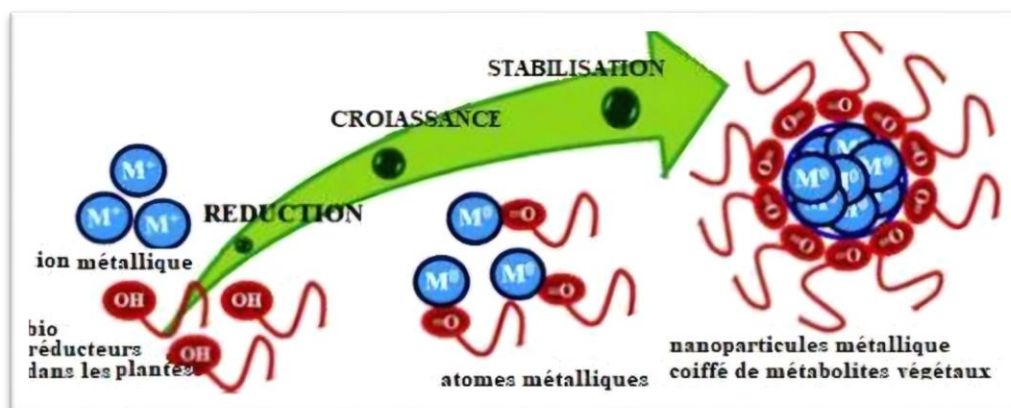


Figure 01 : Mécanisme possible pour la synthèse verte des AgNPs. (Nasrollahzadeh. M et *al.*, 2019)

I.4 Influence des paramètres physico-chimiques sur la forme et la taille des nanoparticules d'argent :

La forme, la taille et la morphologie des nanoparticules sont influencées par divers facteurs physico-chimiques intervenant lors de leur synthèse. Parmi les paramètres les plus déterminants dans la formation des nanoparticules d'argent d'origine végétale figurent la température, le pH, le temps de réaction et la concentration du précurseur d'argent.

I.4.1. Température

La température influence la forme et la taille des nanoparticules : des températures élevées favorisent les formes sphériques, tandis que des températures plus basses conduisent à des structures triangulaires. La synthèse est accélérée entre 30 et 90 °C, mais la plage optimale pour la synthèse biogénique se situe entre 25 et 37 °C. (Almatroudi, 2020)

I.4.2. pH

Le pH du milieu réactionnel détermine la taille et la forme des nanoparticules. Un environnement basique améliore leur stabilité, tandis qu'un pH acide ou trop élevé (Au-delà de 11) peut provoquer leur agglomération. (Almatroudi, 2020)

I.4.3. Temps de réaction

Temps de réaction plus court favorise la formation de nanoparticules de formes variées et augmente leur concentration, visible par une absorbance accrue. Les conditions de croissance ajustent la taille, la forme et les propriétés optiques des nanoparticules, produisant des structures sphériques, triangulaires, hexagonales ou rectangulaires (Almatroudi, 2020).

I.4.4. Concentration de précurseur d'argent

La concentration en AgNO_3 influence la taille, la dispersion et la stabilité des nanoparticules d'argent. À faible concentration, les AgNPs sont plus petites et homogènes, tandis qu'une concentration élevée favorise la croissance rapide et l'agrégation. Cela modifie également leurs propriétés optiques, notamment le pic SPR (Ajitha et *al.* (2013), He et *al.* (2019) et Iravani (2011)).

I.5 Techniques de caractérisation de nanoparticules d'argent (AgNPs)

Les techniques de caractérisation des nanoparticules d'argent : Diffusion dynamique de la lumière (DLS), Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), Spectroscopie Ultraviolet-visible et Analyse du potentiel zêta permettent d'obtenir des informations cruciales sur leur taille, leur forme, leur composition, leur charge de surface et leur stabilité.

I.5.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

La diffusion dynamique de la lumière (DLS) permet une mesure rapide et non destructive de la taille hydrodynamique et de la distribution des AgNPs en suspension. Elle repose sur l'analyse des fluctuations d'intensité lumineuse causées par le mouvement brownien des particules. Cette méthode est aussi utilisée pour évaluer leur stabilité colloïdale en détectant leur agrégation dans le temps. Cela est crucial car l'agrégation peut altérer leurs propriétés fonctionnelles (Zhang et *al.*, 2016).

I.5.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est une technique non invasive et polyvalente, idéale pour identifier les biomolécules impliquées dans la réduction de l' AgNO_3 en argent. Elle repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge par les liaisons chimiques de l'échantillon. Le spectre obtenu agit comme une empreinte moléculaire unique. Cette analyse permet de révéler la composition et la structure des agents réducteurs et stabilisants (Rajeshkumar & Bharath, 2017).

I.5.3 Spectroscopie Ultraviolet-visible

La spectroscopie UV-Visible est une méthode fiable et couramment utilisée pour la caractérisation des AgNPs. Elle permet de suivre leur formation et leur stabilité en mesurant l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. L'interaction de la lumière avec les électrons de surface induit une résonance plasmonique (SPR), générant un pic d'absorption spécifique. Ce pic reflète la taille, la forme et la dispersion des nanoparticules (Zhang et *al.*, 2016).

I.5.4. Analyse du potentiel zêta

Le potentiel zêta mesure la différence de potentiel électrique entre la surface d'une nanoparticule et son environnement. Il est crucial pour évaluer la stabilité colloïdale des suspensions. Des valeurs élevées (au-delà de ± 30 mV) indiquent une bonne dispersion grâce à

la répulsion électrostatique entre particules. En revanche, un faible potentiel zêta favorise l'agglomération et diminue la stabilité (Lasmi et *al.*, 2024).

I.6. Activités biologiques des nanoparticules d'argent

Les AgNPs présentent un large éventail d'actions biologiques, notamment antivirales, anticancéreuses, anti-inflammatoires, antibactériennes, antifongiques et antioxydantes. Leur capacité à inhiber la croissance microbienne, à atténuer le stress oxydatif et à cibler les cellules cancéreuses leur confère un fort potentiel pour des applications biomédicales variées.

I.6.1. Activité anti-inflammatoire

Selon J. Marcos et *al.* (2024), l'action anti-inflammatoire des AgNPs s'explique par leur liaison et pénétration dans les membranes cellulaires enflammées. La libération d'ions argent (Ag^+) et la production de radicaux libres (ROS) qui en résultent inhibent la voie NF- κ B, diminuant la production de cytokines pro-inflammatoires et favorisant l'apoptose des cellules inflammatoires. (J. Marcos et *al.*, 2024).

I.6.2. Activité anticancéreuse

Les AgNPs possèdent une activité anticancéreuse via l'induction d'une apoptose et la sensibilisation des cellules cancéreuses aux agents chimiothérapeutiques (Zhang et *al.*, 2016). Elles libèrent des ions Ag^+ qui génèrent des ROS (espèces réactives de l'oxygène), causant des dommages aux mitochondries, aux protéines, à l'ADN/ARN, et bloquant la réplication et la synthèse protéique. Les AgNPs activent aussi l'autophagie. (Galatage et *al.*, 2021).

I.6.3. Activité antioxydante

Les nanoparticules d'argent ont montré un potentiel antioxydant en raison de leur capacité à neutraliser les radicaux libres dans les cellules. Une étude a montré que les AgNPs avaient la capacité de réduire l'activité des radicaux libres, ce qui peut être bénéfique pour la protection cellulaire contre le stress oxydatif (Faris et *al.*, 2021).

Les AgNPs peuvent interagir avec les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et moduler les processus redox dans les cellules. Les propriétés de surface uniques des AgNPs leur permettent de jouer un rôle dans l'atténuation des dommages oxydatifs. Ces particules métalliques influencent l'expression des gènes associés à la réponse au stress oxydatif, ce qui peut également expliquer leur action antioxydante (Wu et *al.*, 2018).

Des études *in vitro* ont révélé que les AgNPs peuvent inhiber la production de radicaux libres et prévenir les dommages au niveau cellulaire, réduisant ainsi le stress oxydatif dans les modèles de cellules humaines. Par exemple, les AgNPs ont montré une réduction significative de l'inhibition de la production de radicaux superoxydes et de la peroxydation lipidique (Zhang et *al.*, 2016).

I.6.4. Activité antivirale

Les nanoparticules d'argent présentent une activité antivirale notable contre plusieurs virus (VIH, HBV, H3N2, HSV-1/2, PPRV). Elles agissent en bloquant l'entrée virale, en inhibant la réplication, en réduisant la charge virale, et en améliorant la survie chez l'animal. Leur efficacité dépend principalement de leur taille et de leur potentiel zêta. (Zhang et *al.*, 2016).

I.6.5. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des AgNPs dépend de leur taille et de leur forme, les particules plus petites étant généralement plus efficaces.

Les AgNPs exercent leur action antimicrobienne à travers plusieurs mécanismes interconnectés, ciblant principalement la paroi cellulaire et la membrane plasmique des bactéries. S'accumulant sur la paroi cellulaire des bactéries, provoquant la formation de "pits" (trous) (Lanone & Boczkowski, 2010) (Figure 02)

Ces interactions entraînent des dommages physiques provoquant une dépoliarisation membranaire, augmentation de la perméabilité, déséquilibre osmotique causé par la fuite d'ions K^+ et de composés intracellulaires et un arrêt de la respiration cellulaire. Ces atteintes à la membrane facilitent à leur tour l'entrée d'une grande quantité d'AgNPs et d'autres composés extracellulaires cytotoxiques, y compris les antibiotiques qui étaient incapables de passer à travers ou rejetés par la membrane semi-perméable. (Bruna T et *al.*, 2018).

Chez les bactéries Gram-négatives, les AgNPs interagissent avec la couche de peptidoglycane en perturbant le transport cellulaire, le potentiel membranaire et l'équilibre osmotique. Cette interaction, due à la charge négative du peptidoglycane, attire les AgNPs et peut affecter des processus intracellulaires vitaux comme la production d'ATP, la réplication de l'ADN et l'expression des gènes.

Le contact direct entre les AgNPs et les bactéries à GNB et à GPB induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Qui déclenchent une cascade d'événements cellulaires, parmi lesquels la formation de pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs) et l'activation de récepteurs spécifiques, entraînant des dommages cellulaires importants.

L'oxydation des acides aminés par les ROS altère la structure et la fonction des protéines, y compris celles des enzymes et des ribosomes bactériens. Par ailleurs, les ions argent (Ag^+) peuvent se lier aux ribosomes, inhibant ainsi la synthèse des protéines. L'ensemble de ces perturbations peut conduire à la mort cellulaire (Figure 02) (Kaiser K.G. et *al.*, 2023).

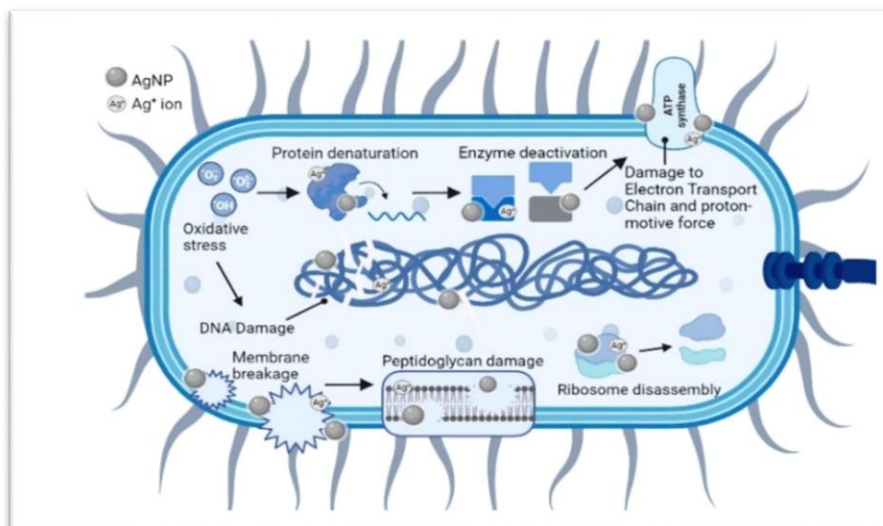


Figure 02 : Mécanismes antibactériens des nanoparticules d’argent au niveau membranaire et intracellulaire. (Kaiser. K.G et al 2023).

Les AgNPs ont également montré une activité anti biofilm contre des pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermidis*, ce qui est crucial pour lutte contre les infections oculaires comme la kératite microbienne.

Selon l’étude de Mallikarjuna.k et al (2011), les AgNPs issues de feuilles de plantes, en particulier d’*Ocimum sanctum*, démontrent une puissante activité antibactérienne contre des agents pathogènes importants comme *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* et *Staphylococcus aureus*. De plus Les AgNPs synthétisées à partir d’extraits de feuilles de goyave (Gr-Ag-NPs) ont montré une activité antibactérienne et une stabilité supérieure par rapport aux AgNPs synthétisées chimiquement, probablement en raison de l’adsorption de biomolécules à leur surface. (Mallikarjuna et al., 2011)

Les nanocomposites contenant des AgNPs, comme les nanocomposites à base de graphène (GO-Ag), ont également démontré une activité antibactérienne renforcée contre des bactéries nosocomiales résistantes aux antibiotiques, notamment le SARM. Les AgNPs dérivées d’extraits fongiques (F-AgNPs) ont montré une activité antibactérienne supérieure à celles dérivées de bactéries. (Lanone & Boczkowski, 2010)

L’activité antibactérienne des nanoparticules d’argent (AgNPs) a été évaluée à l’encontre de plusieurs bactéries pathogènes d’intérêt médical, dont *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (bacilles à Gram négatif) et *Staphylococcus aureus* (Cocci à Gram positif). Ces souches appartiennent à des genres largement représentés dans les infections nosocomiales et communautaires.

Leur classification taxonomique, confirmée par le NCBI en 2025, révèle qu’elles appartiennent majoritairement au phylum *Pseudomonadota* (ex-*Proteobacteria*) pour les Gram

négatifs, et au phylum *Bacillota* pour les Gram positifs. Ces bactéries sont connues pour leur capacité à développer des résistances aux antibiotiques classiques, notamment via la formation de biofilms, la production d'enzymes inactivatrices ou encore l'expression de pompes d'efflux. L'évaluation de l'effet des AgNPs sur ces souches permet donc de mieux apprécier leur potentiel en tant qu'agents antimicrobiens alternatifs (Annexe 01).

I.6.6. Activité antifongique

Les AgNPs sont efficaces contre divers champignons, notamment *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, et bien d'autres. Elles inhibent également la germination des conidies de *Bipolaris sorokiniana*.

Les concentrations inhibitrices minimales (MIC) varient selon les espèces fongiques, allant de 1 à 25 µg/ml pour *Candida albicans* et d'autres champignons. Les AgNPs montrent une activité antifongique améliorée lorsqu'elles sont combinées avec des agents comme le fluconazole, la nystatine (NYT) ou la chlorhexidine (CHX), offrant une activité synergistique contre les biofilms de *Candida albicans* et *Candida glabrata*. Les AgNPs synthétisées biologiquement, notamment par des espèces de *Bacillus*, présentent une forte activité antifongique.

Les AgNPs stabilisées par du sulfate de dodécyle de sodium montrent également une activité accrue. L'efficacité antifongique des AgNPs dépend de leur taille, avec des nanoparticules de 20 nm montrant une activité biocide améliorée. (Zhang *et al.*, 2016)
L'activité antifongique des nanoparticules d'argent a été testée contre deux champignons pathogènes : *Candida albicans* (levure opportuniste) et *Aspergillus niger* (moisissure filamenteuse).

Selon le NCBI (2025), ces champignons appartiennent au règne des *Fungi*, division *Ascomycota*, bien qu'ils présentent des morphologies et des modes de vie distincts. *C. albicans* est une levure polymorphe colonisant les muqueuses humaines, capable de provoquer des candidoses muqueuses ou systémiques, notamment chez les individus immunodéprimés.

A. niger, quant à lui, est un champignon environnemental souvent utilisé industriellement, mais pouvant aussi être impliqué dans des aspergilloses ou otites externes.

En raison de leur importance clinique et de leur résistance croissante aux antifongiques conventionnels, leur utilisation comme modèles biologiques permet d'explorer l'efficacité antifongique des AgNPs dans un contexte de santé publique. (Annexe 01)

I.7 Application de nanoparticules d'argent :

I.7.1. Applications médicales des AgNPs

Les nanoparticules d'argent sont utilisées en médecine pour leurs propriétés antimicrobiennes, cicatrisantes et optiques (Zhang et *al.*, 2016). Elles améliorent la sécurité des cathéters (Burdusel et *al.*, 2018), accélèrent la cicatrisation, notamment dans les ulcères du pied diabétique (Janardana Reddy, 2015 ; Akbar Ali et *al.*, 2021), et sont efficaces en thérapie photothermique contre le cancer (Tse et *al.*, 2011). En dentisterie, elles renforcent les matériaux prothétiques et implantaires (Yin IX et *al.*, 2020), et leur potentiel comme agents de contraste en imagerie médicale est également étudié (Lasmi Faouzi et *al.*, 2023).

I.7.2 Application pharmaceutique

Les AgNPs sont incorporées dans des formulations pharmaceutiques pour améliorer l'efficacité des médicaments, notamment comme agents antimicrobiens et pour le ciblage de médicaments. (Rai et *al.*, 2009).

I.7.3 Application cosmétiques

Les AgNPs sont utilisées dans les produits cosmétiques pour leurs propriétés antibactériennes, notamment dans les déodorants, les crèmes et les produits de soin de la peau. (Tolaymat et *al.*, 2010)

I.7.4 Application électronique

Les AgNPs sont utilisées dans la fabrication de composants électroniques, tels que les encres conductrices, les capteurs et les dispositifs de stockage d'énergie, en raison de leur excellente conductivité électrique. (Lee et *al.*, 2006)

I.7.5 Application textile

Les AgNPs sont intégrées dans les tissus pour créer des vêtements antibactériens et antifongiques, utilisés dans les vêtements sportifs, les chaussettes et les textiles médicaux. (Dastjerdi & Montazer, 2010)

I.7.6 Application environnementale

Les AgNPs sont utilisées dans la purification de l'eau, la décontamination des sols et la lutte contre les polluants microbiens en raison de leurs propriétés antimicrobiennes. (Li et *al.*, 2008)

I.7.7 Application dans l'alimentation et agriculture

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Les AgNPs sont utilisées dans les emballages alimentaires pour prolonger la durée de conservation des aliments et dans l'agriculture comme agents antifongiques et antibactériens pour protéger les cultures. (Emamifar et *al.*, 2011)

Chapitre II :
Matériel et Méthodes

II. Matériels et méthodes

Les expériences de cette étude ont été menées dans deux laboratoires distincts, selon le type d'analyse effectué. La synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'argent et l'évaluation de l'activité antioxydante ont eu lieu au laboratoire d'analyse fonctionnels des procédés au sein de département de génie des procédés à l'Université Saad Dahleb Blida-1, tandis que les tests d'activité antimicrobienne ont été menés au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Dr. Fares Yahia à Koléa wilaya de Tipaza.

II.1. Matériels

La réussite de toute expérimentation scientifique repose sur l'utilisation d'un matériel adéquat et bien adapté aux exigences du protocole. Dans ce travail, divers équipements de laboratoire, réactifs et matériaux biologiques ont été utilisés afin d'assurer la préparation des extraits végétaux, la synthèse des AgNPs et leur caractérisation. Cette section décrit en détail les différents éléments employés au cours de l'étude.

II.1.1. Matériels de laboratoire et réactifs

Le nitrate d'argent (AgNO_3) a servi de précurseur, tandis que le matériel de laboratoire standard (béchers, tubes, pH-mètre, spectrophotomètre) a été utilisé pour les différentes étapes expérimentales. (Annexe02)

II.1.2. Matériels biologiques

La synthèse verte des nanoparticules d'argent a été réalisée en utilisant des extraits de différentes parties du citron comme agents réducteurs et stabilisants ont été récoltés au mois de février dans un jardin privé situé à Boufarik, dans la wilaya de Blida.

Les souches microbiennes utilisées dans ce travail *Staphylococcus aureus* (ATCC25923), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853), *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* (ATCC1015), *Candida albicans* ont été isolées à partir de prélèvements cliniques de patients hospitalisés et fournies par le laboratoire central de l'hôpital Dr Yahia Fares a koléa wilaya de Tipaza en vue de l'évaluation des activités antimicrobiennes des nanoparticules d'argent synthétisées

Tableau II : Tableau représentatif de matériels biologiques utilisés

Plantes	Micro-organismes
• Citronnier frais sans infection visible • Différentes parties du citronnier (Feuilles, écorces, jus, graines.)	• Souches bactériennes pures : Gram-positives : <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC25923) Gram-négatives. <i>Escherichia coli</i> (ATCC25922) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC27853) <i>Klebsiella pneumoniae</i>. • Souches fongiques : <i>Aspergillus niger</i> (ATCC1015) <i>Candida albicans</i> (Annexe01)

II.2. Méthodes

Dans cette étude, nous avons adopté des méthodes expérimentales visant à développer une approche de synthèse verte des nanoparticules d'argent en utilisant des extraits végétaux de citron. Notre démarche a suivi plusieurs étapes, allant de la préparation des extraits à la synthèse et caractérisation des AgNPs, ainsi qu'à l'évaluation de leurs propriétés biologiques.

Afin d'optimiser la formation et la stabilité des nanoparticules d'argent, nous avons soigneusement ajusté et étudié l'influence de divers paramètres expérimentaux tels que le pH, la température, la concentration et le temps de réaction.

II.2.1. Préparation des extraits végétaux

L'utilisation d'extraits végétaux comme agents réducteurs et stabilisants pour la synthèse des nanoparticules est une approche écologique et économique. Dans cette étude, des extraits de différentes parties du citronnier (jus, feuilles, écorces et grains) ont été préparés en utilisant diverses méthodes d'extraction. L'objectif est d'évaluer l'impact de ces extraits sur la formation des AgNPs et d'identifier les conditions optimales de préparation.

II.2.1.1. Préparation du jus de citron

Trois citrons ont été soigneusement lavés à l'eau pour éliminer toute trace de poussière, puis laissés à sécher à l'air libre à température ambiante. Après pesée (masse totale : 487,938 g), les citrons ont été pressés pour extraire 185 ml de jus,

lequel a été filtré afin d'éliminer les résidus solides. Le jus obtenu a ensuite été conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation (Figure 03)

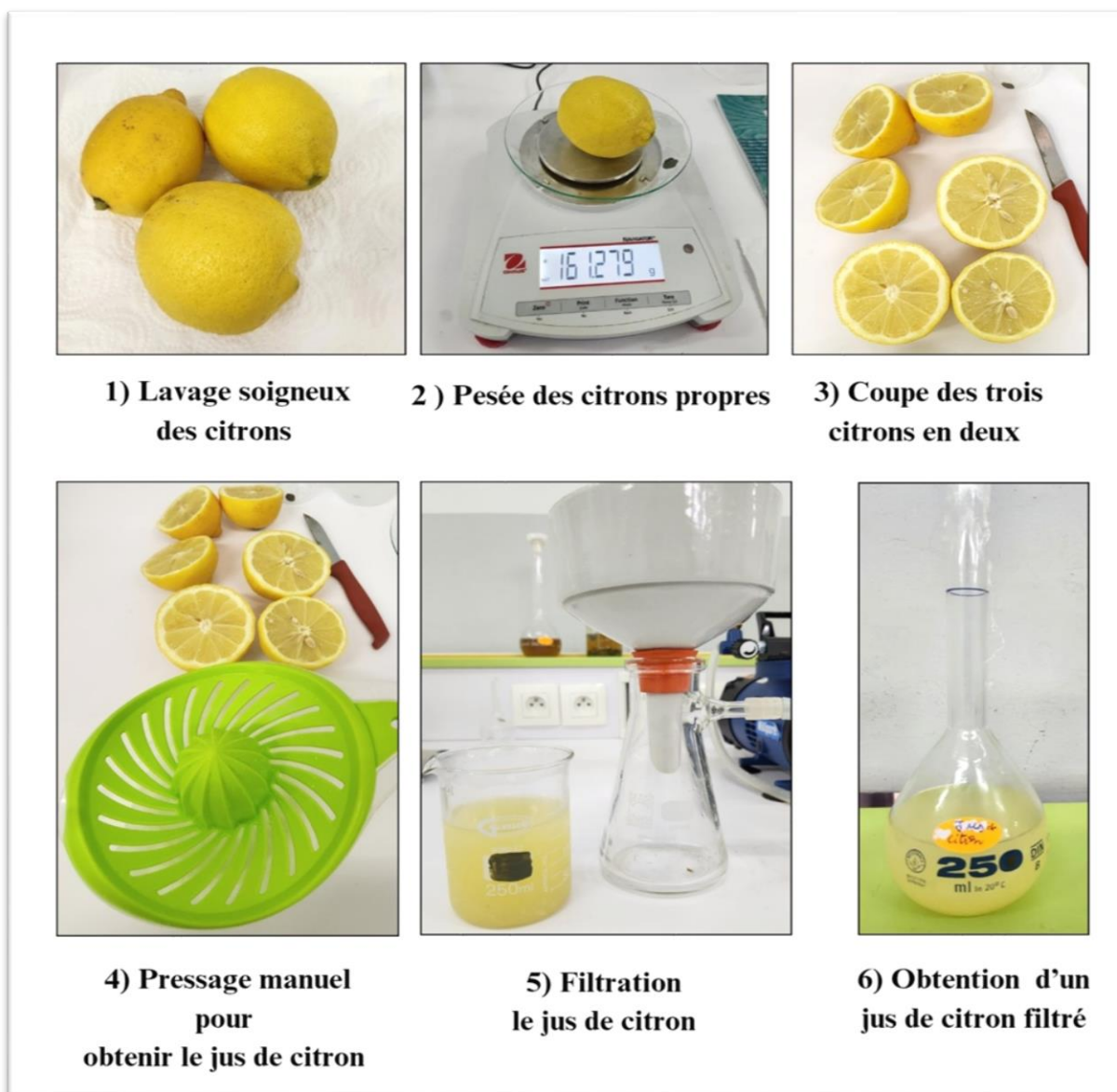


Figure 03 : Étapes de préparation des extraits de feuilles de citron.

II.2.1.2. Préparation des extraits de feuilles de citron

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Les feuilles de citronnier ont été soigneusement lavées à l'eau courante puis distillée, séchées à température ambiante, découpées en petits morceaux, broyées, puis pesées (6,882 g). Le broyat obtenu a été divisé en deux parts égales de 3,441 g, chacune étant mélangée avec 150 mL d'eau distillée dans un bécher de 200 mL

Pour la première méthode d'extraction, le mélange a été chauffé à 70 °C pendant 20 minutes sous agitation magnétique, provoquant un changement de couleur du vert au marron, signe de formation de l'extrait, puis filtré et conservé à 4 °C.

Pour la deuxième méthode, l'extraction a été réalisée par chauffage au micro-ondes à puissance maximale pendant 1 minute 20 secondes, suivie d'une filtration et d'une conservation au froid. Ces deux extraits ont été stockés au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation (Figure 04).

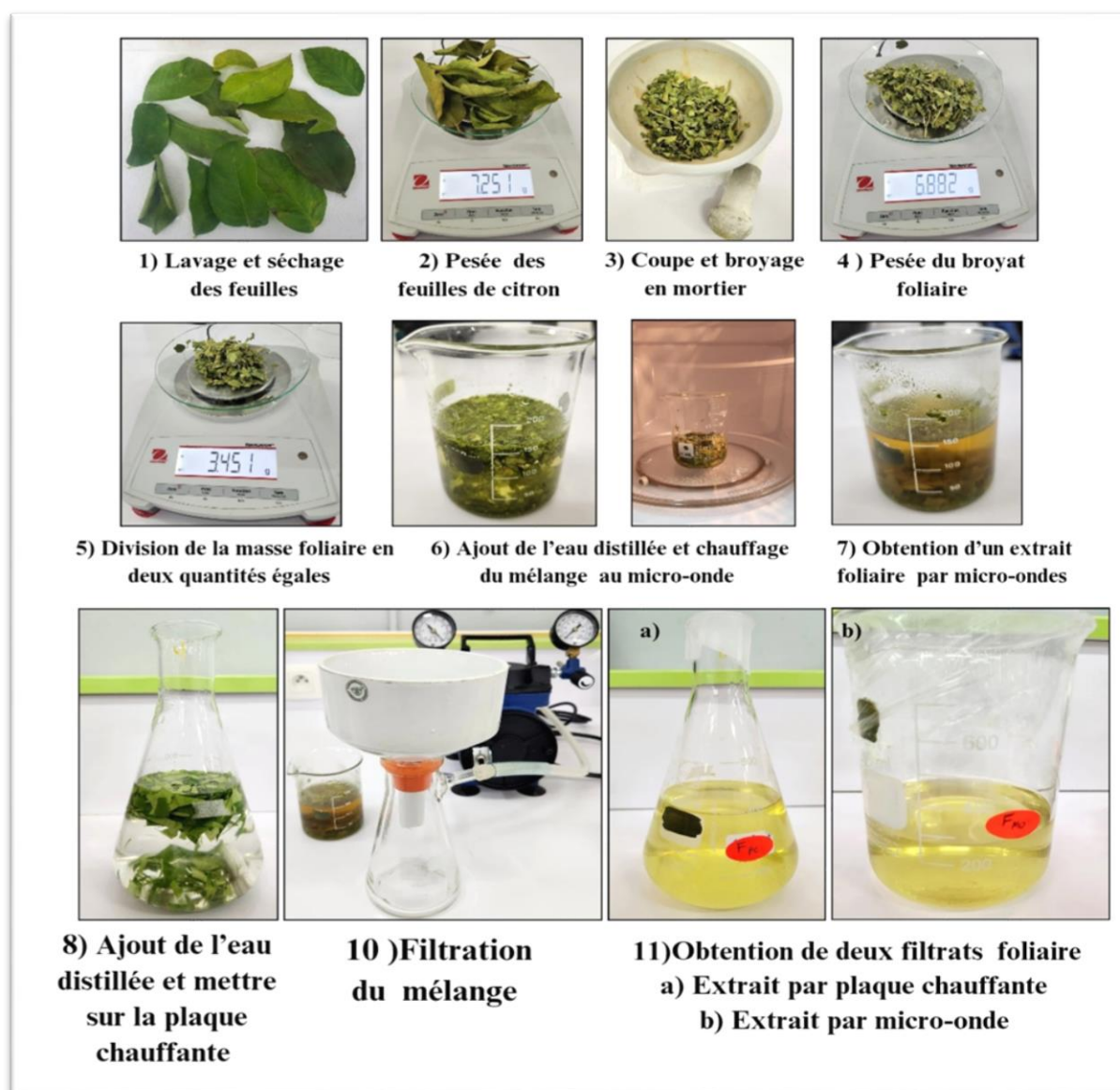


Figure 04 : Étapes de préparation des extraits de feuilles de citron.

II.2.1.3. Préparation de l'extrait des écorces de citron

Les écorces de citron ont été soigneusement lavées, puis pesées (masse totale : 247,274g).

Elles ont été ensuite mises à bouillir avec 500 mL d'eau distillée dans un bécher au micro-ondes, à puissance maximale pendant 7 minutes et 14 secondes. L'extrait obtenu a été filtré pour éliminer les résidus solides, puis conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à utilisation. (Figure 05)

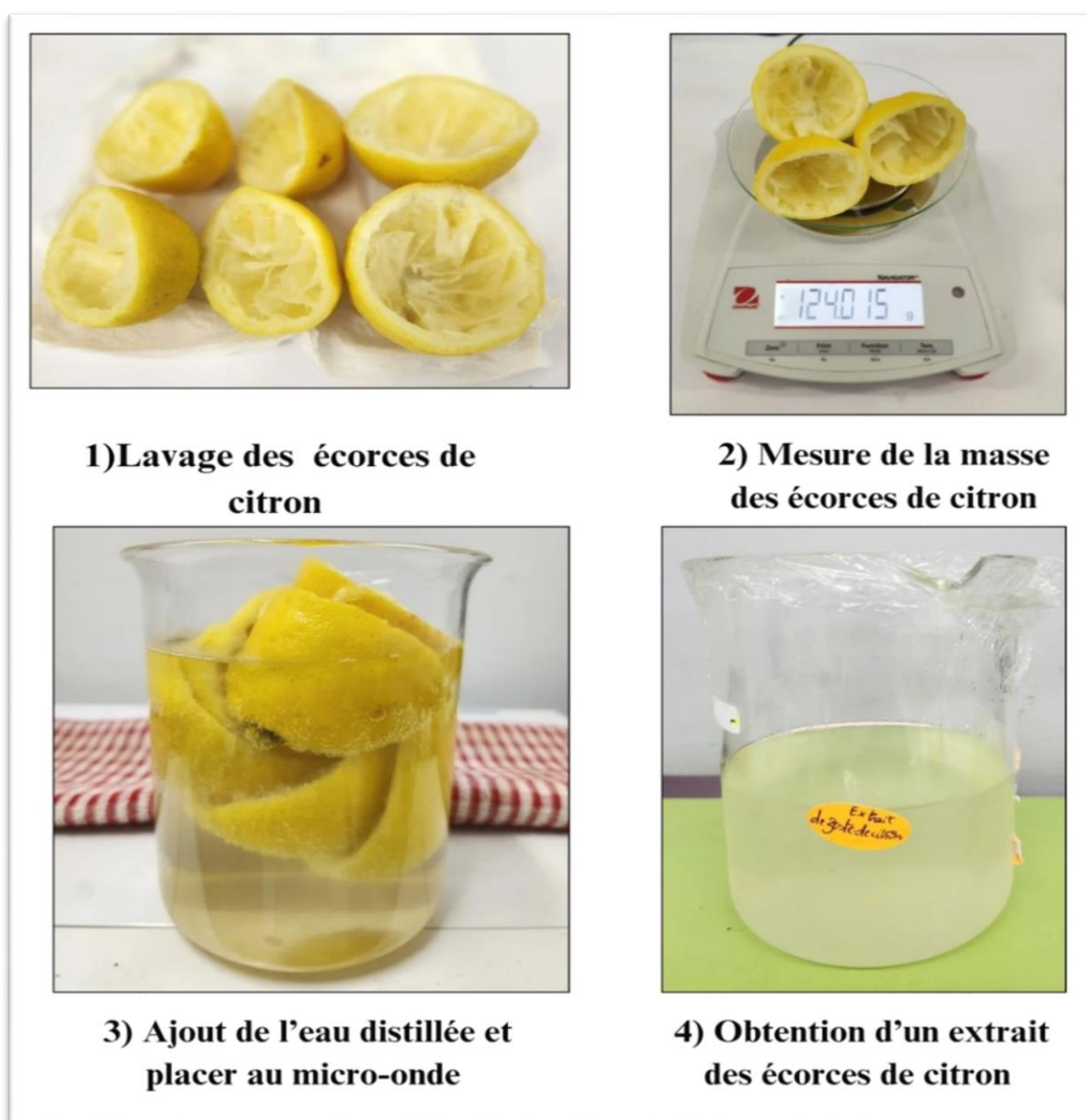


Figure 05 : Étapes de préparation de l'extrait des écorces de citron

II.2.1.4. Préparation des extraits de grains du citron

Les graines de citron ont été soigneusement lavées pour éliminer toute trace de pulpe ou de jus, puis pesées (masse totale : 5,409 g). Elles ont ensuite été broyées à l'aide d'un mortier afin de faciliter l'extraction des composés bioactifs. Le broyat obtenu a été transféré dans un bécher contenant 50 mL d'eau distillée, puis chauffé au micro-ondes à puissance maximale jusqu'à ébullition (environ 40 secondes). L'extrait obtenu a été filtré et conservé au réfrigérateur à 4 °C jusqu'à son utilisation (Figure 06).

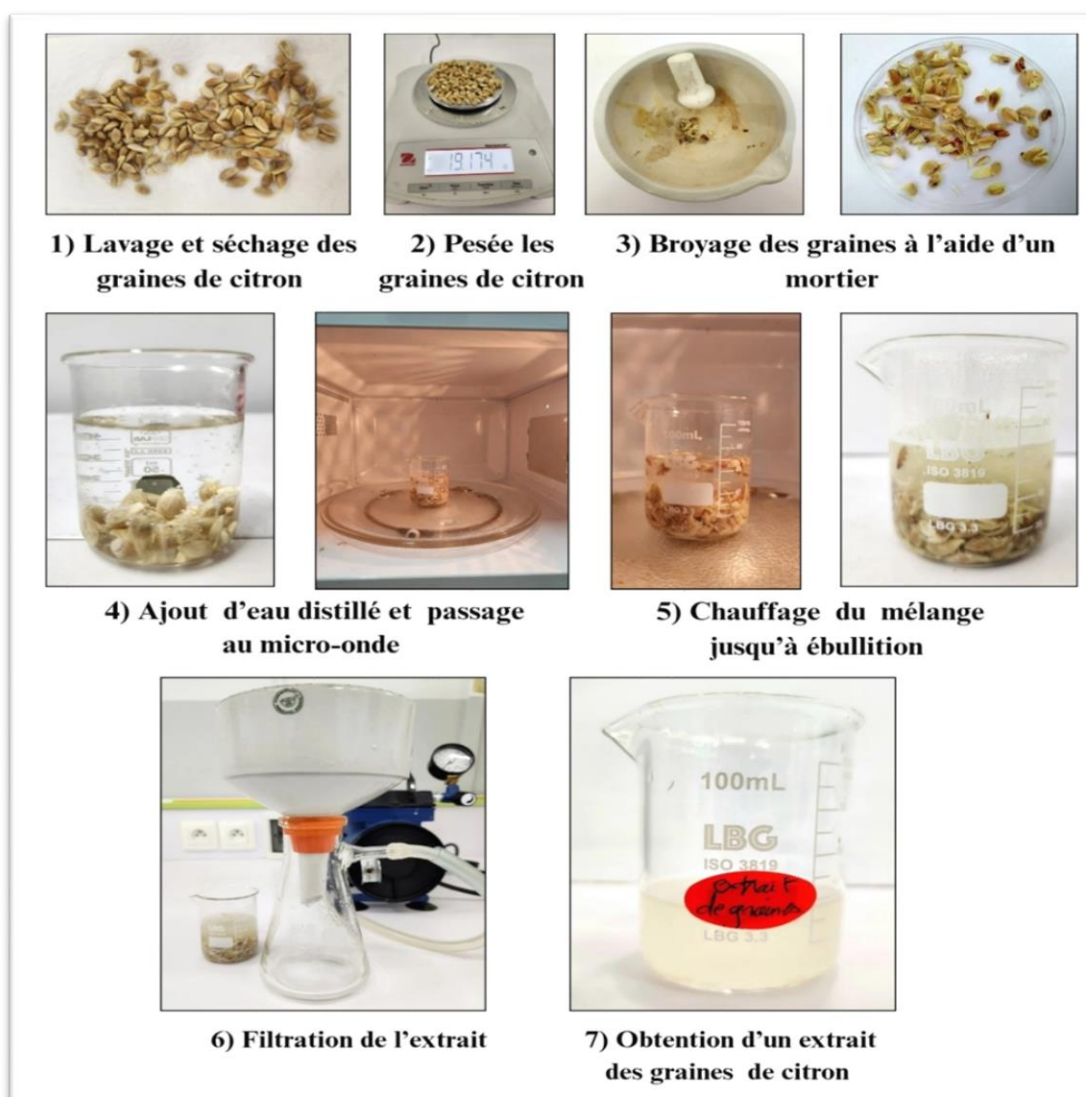


Figure 06 : Étapes de préparation de l'extrait des graines

II.2.2. Synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs)

La synthèse verte des nanoparticules d'argent repose sur l'interaction entre les ions Ag^+ du nitrate d'argent et les composés bioactifs présents dans les extraits végétaux, qui jouent un double rôle de réducteurs et de stabilisants.

Avant l'initiation de la réaction, des solutions de NaOH ont été préparées pour ajuster le pH, et une solution de nitrate d'argent (1 mM) a été confectionnée puis conservée à l'abri de la lumière. Pour chaque essai, 10 mL de solution d' AgNO_3 ont été mélangés à 1 mL d'extrait végétal, et le mélange a été chauffé à 80 °C sous agitation pendant 30 minutes.

Un changement de couleur vers le jaune-brun a été utilisé comme indicateur visuel de la formation des AgNPs. Le suivi de la synthèse s'est fait par spectroscopie UV-Visible, et l'optimisation a porté sur quatre paramètres principaux : pH, température, concentration et temps de réaction. (Ahmed et *al.*,2016)

II.2.2.1. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents pH

Pour évaluer l'impact du pH sur la synthèse des AgNPs, chaque extrait végétal (jus, feuilles, écorces, graines) a été divisé en six fractions avec des pH allant du pH initial (non ajusté) jusqu'à 10,5. À chaque fraction a été ajouté du nitrate d'argent (1 mM), et le mélange a été chauffé à 80 °C pendant 30 minutes sous agitation. Le changement de couleur, suivi d'une analyse UV-Vis dans la plage 190–600 nm, a permis de repérer le pic SPR entre 400 et 450 nm. L'absorbance maximale et la position du pic ont été comparées pour chaque pH afin d'identifier la valeur optimale favorisant la formation rapide et stable des nanoparticules. (Ahmed et *al.*,2016)

II.2.2.2. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes températures

Afin de déterminer la température optimale pour la synthèse des AgNPs, les réactions ont été menées à différentes températures : ambiante, 40°C, 60°C et 80 °C. Le pH et la concentration d' AgNO_3 ont été maintenus constants à leurs valeurs optimales précédemment déterminées pour chaque extrait végétal (jus, écorces, feuilles, grains). Après 30 minutes de réaction à chaque température, les mélanges ont été analysés par UV-Vis pour identifier le pic SPR et mesurer l'absorbance maximale. L'intensité de la coloration et la position du pic ont servi d'indicateurs pour définir la température la plus favorable à la formation des nanoparticules (Ahmed et *al.*,2016).

II.2.2.3. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes concentrations

Chapitre II : Matériel et Méthodes

La synthèse des nanoparticules d'argent a été réalisée en faisant varier les concentrations de la solution de nitrate d'argent (AgNO_3) 1mM, 5mM et 10mM, tout en maintenant un pH et une température optimaux. Pour chaque concentration, l'absorbance a été mesurée par spectrophotométrie UV-Visible afin de déterminer la concentration optimale favorisant la formation des nanoparticules. (Ahmed et *al.*,2016)

II.2.2.4. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents temps de réaction

Pour étudier la cinétique de formation des AgNPs, les réactions ont été suivies à différents temps d'incubation : 0, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 minutes. Les conditions de pH, de température et de concentration d' AgNO_3 ont été maintenues constantes. À chaque intervalle, un échantillon a été prélevé et analysé par UV-Visible.

L'évolution de l'intensité du pic SPR a permis de déterminer le temps de réaction nécessaire pour atteindre une formation maximale et stable des nanoparticules, en identifiant le plateau d'absorbance correspondant à l'équilibre de la réaction. (Ahmed et *al.*,2016)

II.2.3. Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNPs)

Afin de confirmer la formation des nanoparticules et d'évaluer leurs propriétés physico-chimiques, différentes techniques de caractérisation ont été utilisées. La spectroscopie UV-Visible permet d'identifier le pic de résonance plasmonique de surface (SPR) des AgNPs, tandis que l'analyse spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) permet d'identifier les interactions entre les nanoparticules et les composés bioactifs des extraits végétaux. La microscopie électronique à transmission (MET) offre une visualisation directe de leur morphologie et de leur taille. La diffusion dynamique de la lumière (DLS) évalue la distribution granulométrique des nanoparticules en suspension, tandis que la mesure du potentiel zêta renseigne sur leur stabilité colloïdale. (Ahmed et *al.*,2016)

II.2.3.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible

Pour suivre la formation des nanoparticules d'argent (AgNPs), nous avons utilisé un spectrophotomètre UV-visible SHIMADZU UV-1900i. L'eau distillée a été utilisée comme blanc pour le calibrage de l'appareil, et les mesures ont été réalisées dans des cuvettes en quartz soigneusement nettoyées afin d'éviter toute contamination.

Nous avons dilué les échantillons d'AgNPs de manière appropriée. Les spectres d'absorption ont été enregistrés dans la plage de 190 à 600 nm. Une attention particulière a été portée à l'identification du pic de résonance plasmonique de surface (SPR), généralement situé entre 400 et 450 nm, dont l'évolution a permis de suivre la cinétique de formation des AgNPs et d'optimiser les conditions de synthèse.

II.2.3.2. Analyse du potentiel zêta

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées à l'aide d'un analyseur de potentiel zêta de type « nano particle sizer » (modèle Horiba) basé sur la technique de mobilité électrophorétique.

Une portion de chaque suspension colloïdale fraîche a été prélevée (1 à 2 mL), diluée avec l'eau distillée, puis introduite dans une cellule à électrodes en or, propre et sans bulles, spécialement conçue pour ce type d'analyse. L'analyse a été conduite à une température de 25 °C, avec une viscosité du milieu comprise entre 0,893 et 0,897 mPa·s. La conductivité variait selon l'extrait entre 0,059 et 0,108 mS/cm, et la tension appliquée au cours des mesures se situait entre 3,4 et 3,9

II.2.3.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Quelques gouttes de chaque suspension colloïdale ont été déposées directement sur une pastille de KBr propre. Après séchage, l'échantillon a été introduit dans la cellule de mesure du spectrophotomètre FTIR-8900 (modèle : SHIMADZU). Le spectre a été enregistré dans la gamme de 4000 à 500 cm⁻¹. Les bandes d'absorption observées ont permis d'identifier les biomolécules issues des extraits végétaux (flavonoïdes, acides phénoliques, etc.) fixées à la surface des nanoparticules.

II.2.3.4. La diffusion de la lumière dynamique

la méthode de diffusion dynamique de la lumière (DLS) a été réalisée à l'aide du même appareil Zetasizer utilisé pour les mesures de potentiel zêta. Les suspensions ont été diluées avec de l'eau distillée, puis introduites dans des cuves spéciales en quartz, propres et exemptes de bulles. Les analyses ont été effectuées à température ambiante, et les résultats ont été exprimés en taille moyenne (diamètre) ainsi qu'en indice de polydispersité (PDI), permettant d'évaluer l'uniformité de la distribution granulométrique.

II.2.4. Évaluation des propriétés biologiques des nanoparticules d'argent (AgNPs)

Les nanoparticules d'argent possèdent des propriétés biologiques intéressantes, notamment une activité antioxydante et antimicrobienne, qui peuvent être exploitées dans divers domaines biomédicaux.

II.2.4.1. Activité antioxydante

Dans cette étude, l'activité antioxydante des nanoparticules d'argent (AgNPs) synthétisées à partir des extraits de jus, feuilles, écorces et graines de citron a été évaluée par le test au DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl), une méthode couramment utilisée pour mesurer le pouvoir antioxydant. Une solution de DPPH a été préparée en dissolvant 4 mg de DPPH dans 100 mL d'éthanol, ajustée pour obtenir une absorbance initiale de 0,8 à 517 nm.

Chapitre II : Matériel et Méthodes

Les AgNPs ont été diluées à différentes concentrations (100 à 5 ppm) selon un protocole précis :

- 1 000 ppm (5 mL d'AgNPs)
- 800 ppm (4 mL d'AgNPs + 1 mL d'eau distillée)
- 600 ppm (3 mL d'AgNPs + 2 mL d'eau distillée)
- 400 ppm (2 mL d'AgNPs + 3 mL d'eau distillée)
- 200 ppm (1 mL d'AgNPs + 4 mL d'eau distillée)
- 100 ppm (0.5 mL d'AgNPs + 4.5 mL d'eau distillée)
- 50 ppm (0.25 mL d'AgNPs + 4.75 mL d'eau distillée)

et les réactions ont été menées à l'abri de la lumière pour éviter la photodégradation du DPPH. Dans chaque tube, 1 mL de solution d'AgNPs a été mélangé à 3 mL de DPPH, avec un intervalle de 2 minutes entre chaque ajout, puis incubé pendant 30 minutes.

Un témoin positif a été préparé en utilisant une solution d'acide ascorbique (100 ppm) également diluée aux mêmes concentrations que les AgNPs, tandis qu'un contrôle a été constitué d'un mélange d'eau distillée et d'éthanol. Après incubation, l'absorbance des mélanges a été mesurée, et le pourcentage d'inhibition (PI%) a été calculé selon la formule

$PI\% = [(A_0 - A_{\text{échantillon}}) / A_0] \times 100$, où A_0 est l'absorbance du contrôle.

Une correction de l'absorbance due à la couleur de fond des extraits a été effectuée à l'aide d'un contrôle (extrait seul + éthanol, sans DPPH). Pour chaque concentration, 1 mL de l'extrait a été mélangé à 3 mL de la solution de DPPH. Après incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm, et le pourcentage d'inhibition (PI%) a été calculé selon la formule suivante :

$$PI\% = [(A_0 - (A_{\text{échantillon}} - A_c)) / A_0] \times 100$$

A_0 : Absorbance du témoin (DPPH + éthanol, sans extrait)

$A_{\text{échantillon}}$: Absorbance du mélange (DPPH + extrait)

A_c : Absorbance du contrôle de fond (extrait seul + éthanol, sans DPPH)

Les résultats ont permis de tracer les courbes du PI% en fonction de la concentration pour chaque échantillon, et d'estimer l'IC50, c'est-à-dire la concentration nécessaire pour inhiber 50 % du radical DPPH. Cette comparaison entre les AgNPs et l'acide ascorbique a permis d'évaluer l'efficacité antioxydante relative de chaque extrait (Zhang et al., 2013)

II.2.4.2. Évaluation de l'activité antimicrobienne

II.2.4.2.1. Méthode de diffusion sur disque

L'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent (AgNPs) a été évaluée par la méthode de diffusion des disque sur gélose Mueller-Hinton pour les bactéries et *Candida albicans*, et sur gélose Potato Dextrose Agar (PDA) pour *Aspergillus niger*. Les milieux ont étéensemencés par écouvillonnage à l'aide d'inoculums microbiens standardisés : une densité de

Chapitre II : Matériel et Méthodes

0,5 MC Ferland pour les souches bactériennes et *Candida albicans*, et de 0,3 Mac Ferland pour *A. niger*.

Des disques de papier stériles (6 mm de diamètre), imprégnés de nanoparticules d'argent à différentes concentrations (100, 80, 60, 40, 20, 10 et 5 ppm), ont été déposés sur les milieux ensemencés, puis maintenus à température ambiante pendant 1 heure afin de permettre la diffusion des composés avant incubation. Les boîtes ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 24 heures pour les bactéries et *Candida albicans*, et à 27 °C pendant 48 heures pour *Aspergillus niger*. À l'issue de l'incubation, les diamètres des zones d'inhibition (exprimés en mm) ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse, afin d'évaluer l'efficacité antimicrobienne des AgNPs. (Balouiri et *al.*, 2016).

II.2.4.2.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) des nanoparticules d'argent a été déterminée par la méthode de microdilution en milieu liquide, dans des microplaques à 96 puits. Pour les souches bactériennes et *Candida albicans*, 90 µL d'un mélange à parts égales de bouillon Mueller-Hinton (MH) et de suspension de nanoparticules ont été distribués, puis dilués en série selon un facteur de deux ($\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ etc.). À ce mélange, 10 µL d'un inoculum standardisé à 0,5 McFarland ont été ajoutés, suivis d'une incubation à 37 °C pendant 24 h. Un inoculum de *Aspergillus niger*, ajusté à 0,3 McFarland dans du bouillon Potato Dextrose (PDB), a été utilisé pour l'évaluation de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent (AgNPs). Le test a été réalisé par microdilution en milieu liquide, en ajoutant 100 µL de l'inoculum à 100 µL de la solution d'AgNPs dans des microplaques à 96 puits.

L'incubation a été effectuée à 27 °C pendant 48 heures, afin de déterminer l'effet inhibiteur des AgNPs à différentes concentrations.. La densité optique a été mesurée avec un lecteur Multiskan, la CMI correspondant à la plus faible concentration inhibant visiblement la croissance. (Balouiri et *al.*, 2016).

Un antibiogramme comparatif a ensuite été réalisé afin d'évaluer l'efficacité des nanoparticules d'argent à leur CMI, en comparaison avec les antibiotiques ou antifongiques de référence spécifiques à chaque souche. Après incubation des milieux ensemencés avec les disques imprégnés, les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse afin d'évaluer l'activité relative des traitements (Balouiri et *al.*, 2016).

Chapitre III :

Résultats et discussions

Ce chapitre présente et discute les résultats obtenus lors de la synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs) à partir d'extraits de citron (jus, écorces, feuilles, grains), ainsi que leur caractérisation et l'évaluation de leurs propriétés biologiques.

III.1. Synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs)

Conformément au protocole expérimental décrit au chapitre 2, nous avons exploré l'influence de divers paramètres (pH, température, temps de réaction et concentration) sur la formation des AgNPs, en utilisant différentes parties du citron (jus, feuilles, écorces, grains) comme agents réducteurs et stabilisants.

III.1.1. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents pH

Le pH du milieu réactionnel influence fortement la synthèse des nanoparticules d'argent (AgNPs) à partir des extraits de citron. Une formation optimale et une bonne stabilité colloïdale sont observées entre les pH 8 et 10, avec des couleurs caractéristiques (jaune à brun) et des pics UV-Vis nets entre 411 et 430 nm. En milieu acide (pH 3–7), la synthèse est inefficace. Les extraits de jus et d'écorces donnent des AgNPs homogènes à pH 8–9, tandis qu'un pH ≥ 10 entraîne souvent une agglomération. Les feuilles traitées par micro-ondes ou plaque chauffante montrent une synthèse renforcée entre pH 10–10,5. Quant aux graines, elles ne permettent une synthèse visible qu'à partir de pH 8, avec un rendement maximal entre pH 9 et 10. Le pH module donc l'efficacité de réduction, la dispersion et la stabilité des AgNPs. (Tableau III), (Figure 7 ;8)

Tableau III: Récapitulatif des résultats d'optimisation du pH pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron

Type d'AgNPs	pH	Observation macroscopique	λ Spr (nm)
AgNPs –Jus	pHi =3,2	Marron foncé	327
	pH=7	Marron clair	412
	pH=8	Jaune clair	406
	pH =9	Jaune plus foncé	410
	pH =10	Jaune doré	406
	pH=10,5	Jaune foncé	406
AgNPs - Ecorces	pHi=3,5	Jaune clair	324
	pH=7	Marron clair	412
	pH=8	Marron foncé	411
	pH =9	Brun foncé	410
	pH =10	Brun orangé	407
	pH=10,5	Brun rougeâtre	414
AgNPs - Feuilles Micro-onde	pHi =7,2	Brun très clair	431
	pH=8	Jaune a brun clair	418
	pH=9	Brun foncé	314
	pH =10	Brun doré	411
	pH =10.5	Brun rougeâtre	415
AgNPs - Feuilles plaque chauffante	pHi =7,5	Beige	426
	pH=8	Brun clair	284
	pH=9	Brun plus soutenu	282
	pH =10	Brun doré	400
	pH =10,5	Brun orangé	419

AgNPs Graines	pHi= 5.3	Incolore	217
	pH=7	Blanc laiteux	217
	pH=8	Légère opalescence	218
	pH =9	Brun clair	409
	pH =10	Brun plus soutenu	401
	pH=10,5	Jaune clair	400

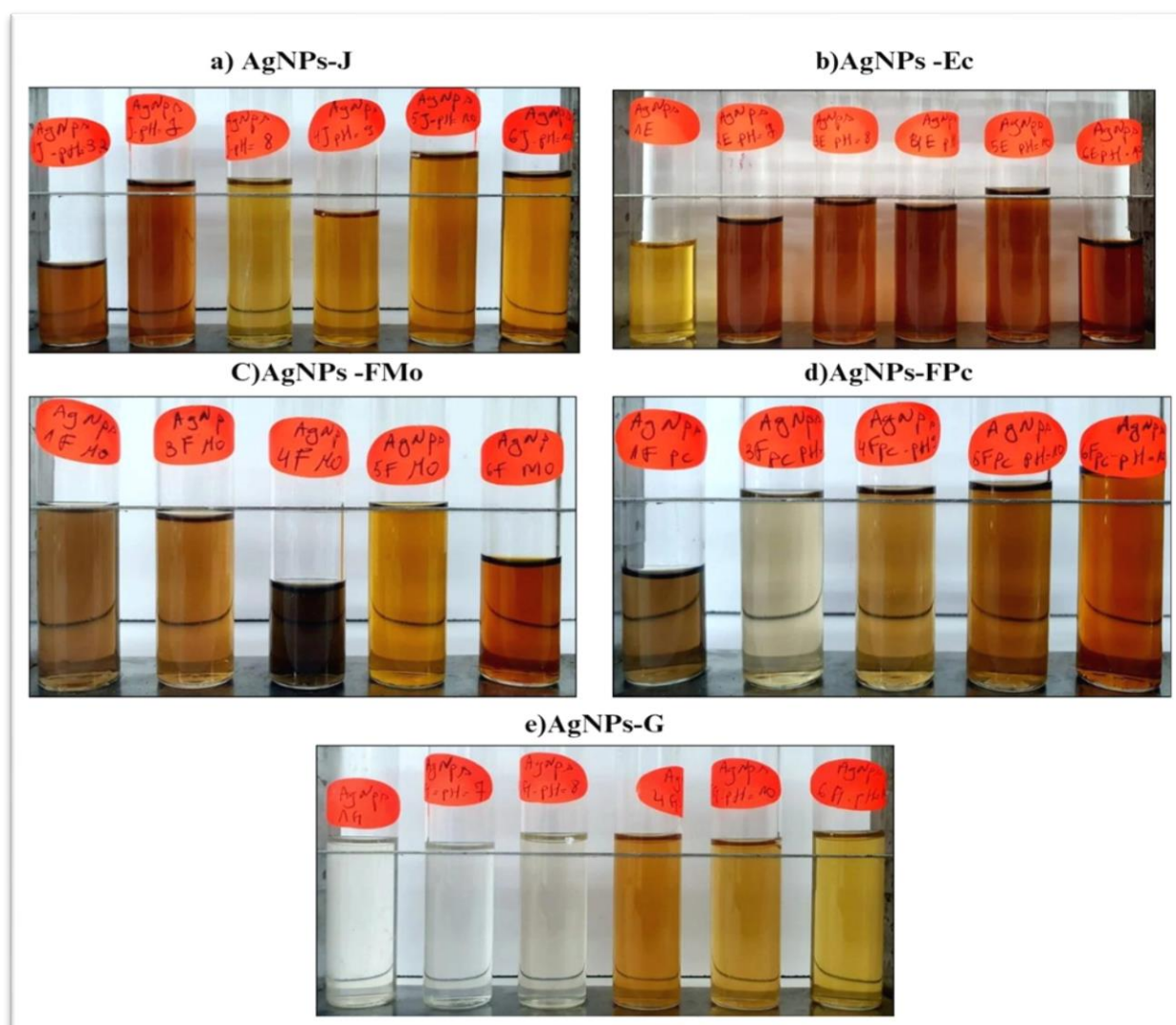


Figure 7 : Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différents pH.

a)AgNPs J (jus de citron) ; b)AgNPs Ec (Écorces) ; c) AgNPs FMo (Feuilles micro-ondes) ; d) AgNPs FPc (feuilles -Plaques chauffante) ; e)AgNPs G(graines).

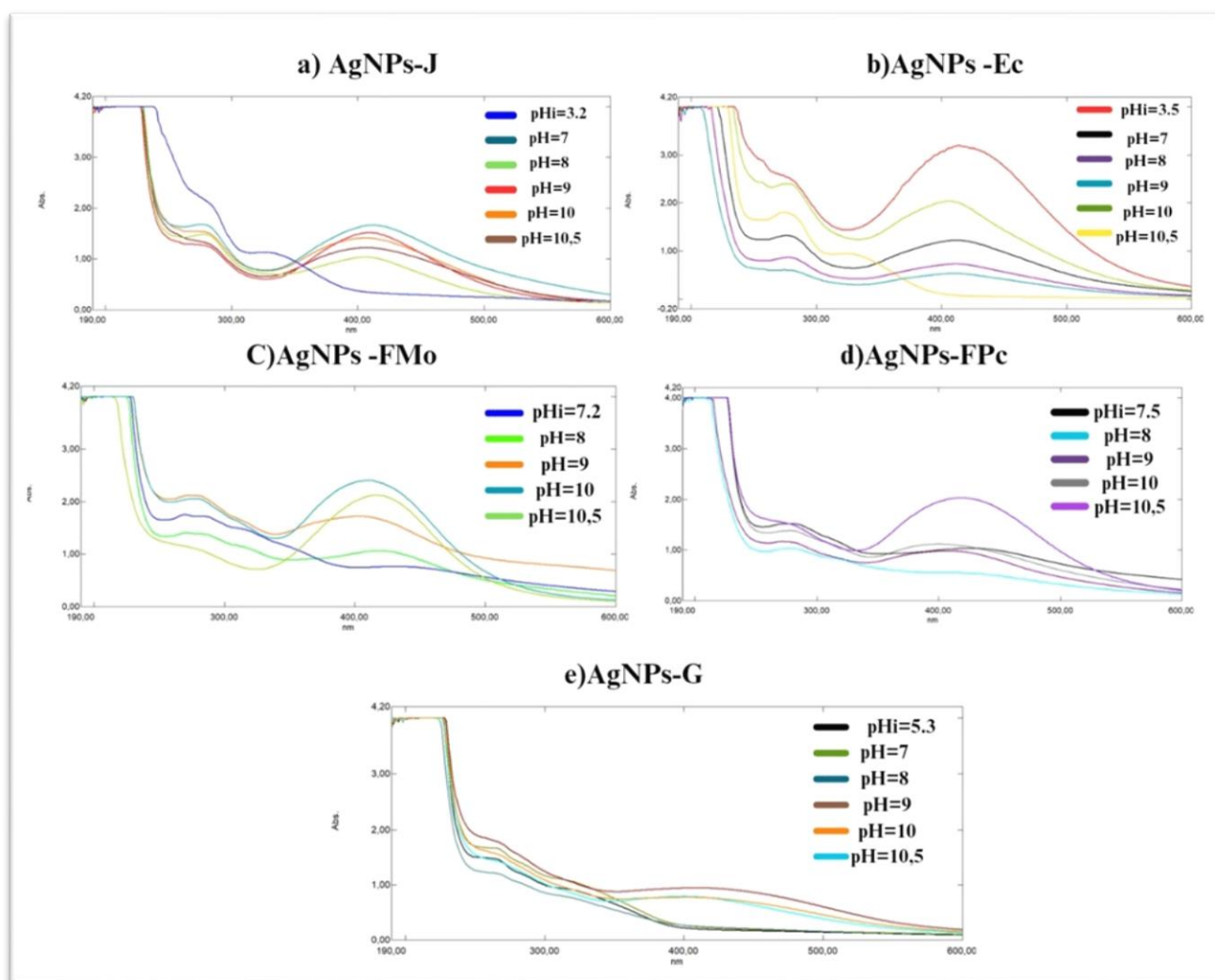


Figure 8 : Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différents pH.

Le pH joue un rôle crucial dans la synthèse verte des nanoparticules d'argent (AgNPs), en influençant à la fois la cinétique de réduction des ions Ag^+ et la stabilité colloïdale des particules formées. Selon Singh et Nasrollahzadeh (2018 ; 2019), un pH modérément basique (8–10) favorise une formation efficace des AgNPs, ce qui s'est manifesté dans cette étude par un changement de couleur et des pics SPR nets (411–430 nm).

En revanche, comme le soulignent Iravani (2011) et Adebayo-Tayo *et al.* (2019), les milieux acides limitent cette réduction en raison de la protonation des groupes fonctionnels des biomolécules. Selon Baranwal et Khan (2018 ; 2020), un pH très basique (≥ 10) accélère la réaction mais peut induire une agglomération, observable par l'élargissement des bandes SPR, notamment avec les extraits de jus et d'écorces. Mittal *et al.* (2020) relèvent également que les milieux alcalins activent certains métabolites secondaires, ce qui pourrait expliquer l'efficacité des extraits de feuilles chauffés à pH 10–10,5.

Enfin, selon Ahmad, Muhammad et Nowack (2011 ; 2016), les extraits de graines deviennent actifs à pH basique, avec une production optimale autour de pH 9–10. Ces données confirment que le

pH influence à la fois l'activité réductrice des extraits et les caractéristiques physico-chimiques des AgNPs obtenues.

III.1.2. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes températures

La température influence fortement la synthèse des AgNPs à partir des extraits de citron. À température ambiante, la formation est limitée, avec des couleurs pâles et des pics SPR faibles ou absents. À 40 °C, une synthèse débute, tandis qu'à 60 °C, elle devient optimale : coloration intense, pics SPR nets (410–420 nm) et bonne dispersion. À 80 °C, une surcroissance et une instabilité apparaissent, marquées par une couleur très foncée et un élargissement ou un déplacement des pics SPR (430–440 nm). Ainsi, 60 °C constitue une température idéale pour une synthèse efficace et stable des AgNPs (Tableau IV), (Figure 9 ;10)

Tableau IV : Récapitulatif des résultats d'optimisation de température pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron

Type d'AgNPs	Température	Observation macroscopique	λ SPR (nm)
AgNPs -J	Ambiante	Beige clair	413
	40°C	Brun clair	412
	60°C	Brun plus soutenu	421
	80°C	Brun foncé	412
AgNPs -E	Ambiante	Brun foncé	406
	40°C	Brun légèrement trouble	407
	60°C	Brun clair	409
	80°C	Brun clair homogène	426
AgNPs -G	Ambiante	Jaune pale	404
	40°C	Jaune clair	410
	60°C	Jaune doré	408
	80°C	Jaune orangé	409
AgNPs - FMo	Ambiante	Brun clair	390
	40°C	Brun plus intense	392
	60°C	Brun doré	400
	80°C	Brun rougeâtre	405
AgNPs - FPc	Ambiante	Brun foncé	404
	40°C	Brun foncé	406
	60°C	Brun très foncé	405
	80°C	Marron foncé	406

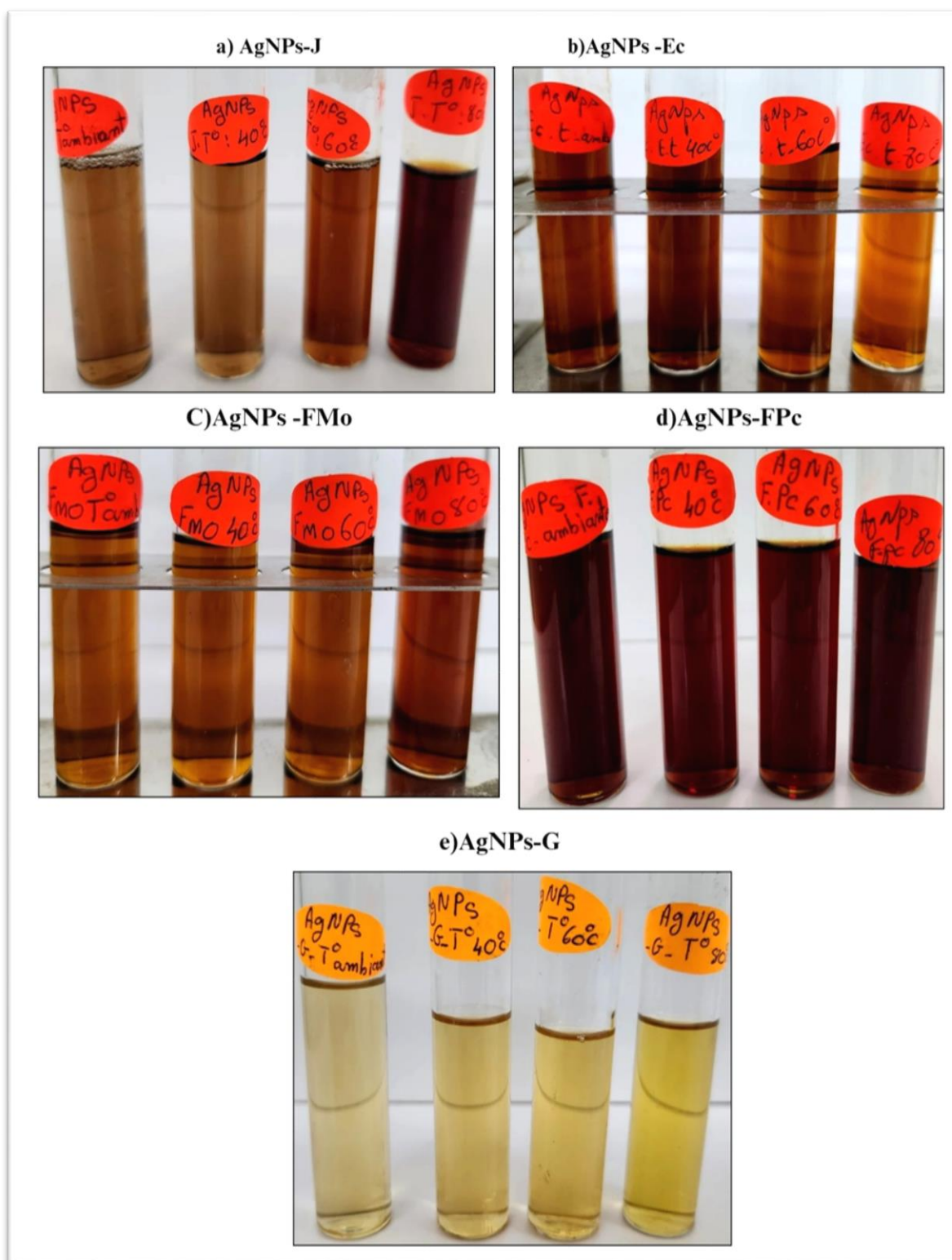


Figure 9 : Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures.

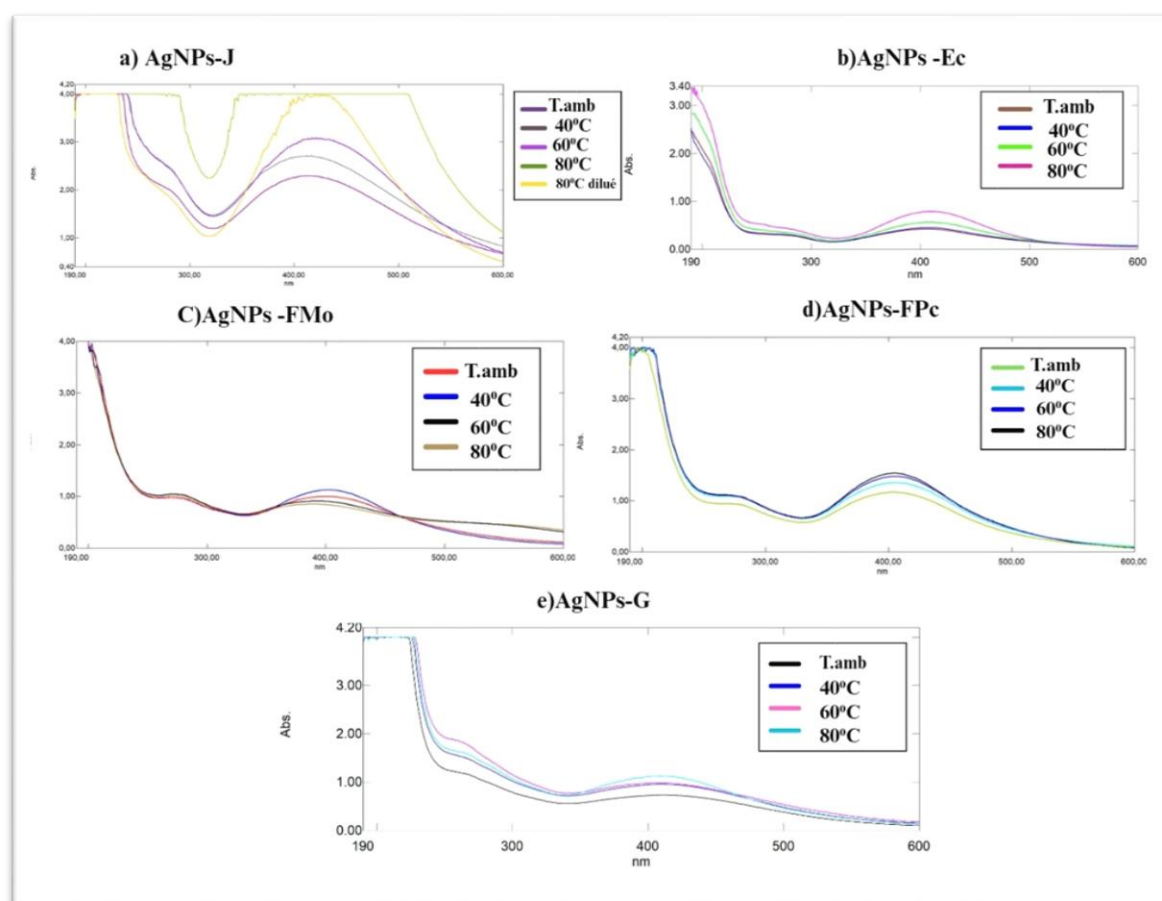


Figure 10 : Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures.

La température constitue un paramètre clé dans la synthèse verte des AgNPs, influençant la cinétique de réduction, la taille des particules et leur stabilité colloïdale (Ahmad *et al.*, 2011 ; Iravani, 2011). Dans cette étude, une élévation progressive de la température (ambiante à 80 °C) a montré un impact significatif selon le type d'extrait de citron utilisé. À température ambiante, la réaction est lente et incomplète, comme en témoignent la faible coloration et les signaux SPR discrets, ce que Nasrollahzadeh *et al.*, (2019) attribuent à une activation insuffisante des groupes réducteurs. À partir de 40 °C, une amélioration de la synthèse est observée, marquée par l'apparition de pics SPR autour de 410–420 nm.

Selon Baranwal *et al.* (2018), la hausse de température favorise la nucléation rapide et la formation de particules plus petites. Cette tendance atteint son optimum à 60 °C, avec des solutions intensément colorées et des spectres SPR bien définis, indiquant une bonne dispersion.

Cependant, à 80 °C, une polydispersité et une possible agglomération sont observées, notamment dans les extraits de graines et de feuilles, en lien avec l'élargissement ou le décalage des pics SPR. Ces effets sont compatibles avec les observations de Muhammad *et al.* (2016) et Mittal *et al.* (2020), qui soulignent qu'une température excessive peut déstabiliser les agents protecteurs naturels et altérer la qualité des AgNPs formées.

III.1.3. Synthèse des nanoparticules d'argent à différents temps de réaction

La synthèse des AgNPs à partir des extraits de citron progresse avec le temps, atteignant une efficacité optimale entre 20 et 30 minutes. Cette évolution se manifeste par une intensification de la couleur et l'apparition de pics SPR dès 5 à 10 minutes, avec une absorbance maximale vers 25–30 minutes. Au-delà de 60 minutes, une surcroissance, une agglomération et une perte de stabilité sont observées, particulièrement marquées après 90 à 120 minutes (sédimentation, déplacement des pics SPR). Un temps de réaction modéré (30–60 minutes) permet donc d'obtenir des AgNPs stables, homogènes et bien formées. (Tableau V) ;(Figure 11 ;12).

Tableau V : Récapitulatif des résultats d'optimisation du temps pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron

AgNPs	Temps de réaction	Observation macroscopique	λ SPR (nm)
AgNPs J	0s	Brun pâle	370
	5min	Brun clair	411
	10min	Brun plus intense	412
	20min	Marron clair	411
	25min	Brun plus foncé	405
	30min	Brun homogène	405
	60min	Brun marron	406
	90min	Brun plus clair	406
	120min	Brun moyen	407
AgNPs-Ec	0s	Brun très pâle	403
	5min	Teinte brunâtre	405
	10min	Brun plus soutenu	407
	20min	Brun foncé	413
	25min	Brun plus vif	411
	30min	Brun noir	408
	60min	Brun opaque	412

	90min	Brun foncé	404
	120min	Brun moyen	408
AgNPs G	0s	Jaune clair et translucide	368
	5min	Jaune brun-clair	402
	10min	Jaune brun légèrement intense	413
	15 min	Jaune brun clair	401
	20min	Brun légèrement plus foncé	406
	30min	Brun plus prononcé	400
	60min	Brun moyen	414
	90min	Brun plus foncé	418
	120min	Brun foncé presque noir	411
AgNPs FMo	0s	Incolore	371
	5min	Pâle	405
	10min	Jaune clair	399
	20min	Jaune intense	409
	30min	Jaune intense	413
	60min	Brunâtre	407
	90min	Brun foncé	412
	120min	Brun foncé	404
AgNPs FPc	0s	Jaune clair	404
	5min	Brun rougeâtre clair	406
	10min	Brun rougeâtre intense	401
	15min	Brun rougeâtre intense	406
	20min	Brun foncé	406
	30min	Brun foncé	402
	60min	Brun très foncé	516

	90min	Brun foncé opaque	401
	120min	Brun foncé presque noir	391

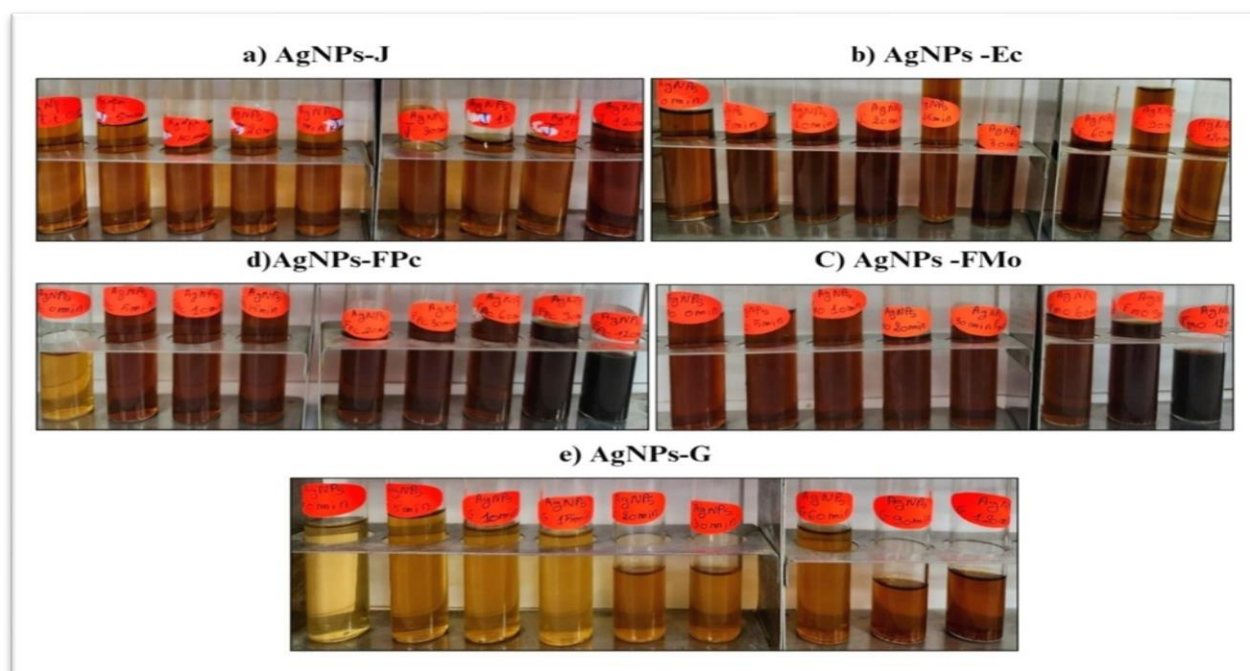


Figure 11 : Observation visuelle des AgNPs biosynthétisées par des extraits de citron a différents temps de réaction.

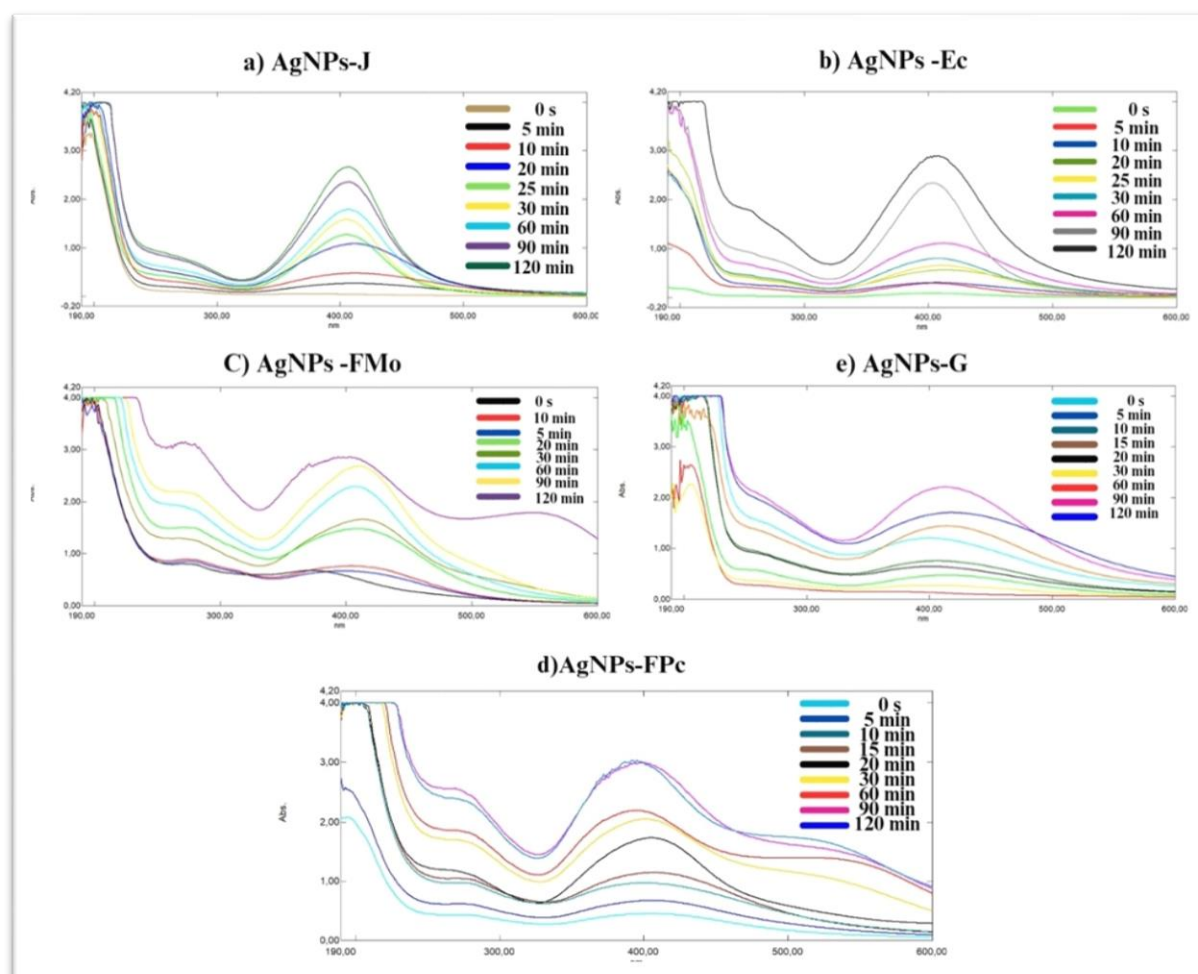


Figure 12 : Analyse spectroscopie UV-Visible des AgNPs biosynthétisées a différents temps de réaction

Le temps de réaction constitue un paramètre déterminant dans la synthèse verte des AgNPs, influençant directement leur taille, leur homogénéité et leur stabilité colloïdale (Ahmad *et al.*, 2011 ; Baranwal *et al.*, 2018). Dans cette étude, une formation rapide des nanoparticules a été observée dès les premières minutes, avec une efficacité maximale atteinte entre 20 et 30 minutes. Ces résultats sont cohérents avec ceux de Nasrollahzadeh *et al.* (2019), qui associent l'intensification de la couleur et l'apparition rapide des pics SPR (5–10 min) à une réduction efficace des ions Ag^+ .

Selon Iravani (2011), un temps de réaction modéré favorise la production de nanoparticules bien dispersées, tandis qu'un prolongement au-delà de 60 minutes entraîne une surcroissance et une agglomération, comme en témoignent l'élargissement des pics SPR et le brunissement accru observés dans cette étude. Muhammad *et al.* (2016) relie ces changements spectraux à une augmentation de la taille ou à une sédimentation progressive des particules.

En outre, Mittal *et al.* (2020) précisent qu'une durée excessive (au-delà de 90–120 minutes) peut saturer les agents stabilisants naturels, affectant la colloïdalité du système, un phénomène ici accentué avec les extraits de feuilles traités thermiquement. Ainsi, ces données confirment qu'un temps de

réaction compris entre 30 et 60 minutes constitue une fenêtre optimale pour obtenir des AgNPs stables, homogènes et bien dispersées, comme le confirment également Singh *et al.* (2018).

III.1.4. Synthèse des nanoparticules d'argent à différentes concentrations

La concentration en nitrate d'argent (AgNO_3) influence fortement la synthèse des AgNPs à partir des extraits de citron. À 1 mM, la formation est faible, avec des couleurs pâles et des pics SPR peu marqués. À 5 mM, la synthèse est optimale pour tous les extraits, avec des teintes brunâtres, des pics SPR nets (417–426 nm) et une bonne dispersion. À 10 mM, une instabilité apparaît, indiquée par une absorbance élevée, un élargissement ou un déplacement du pic SPR, traduisant une agrégation. Ainsi, 5 mM constitue la concentration idéale pour un bon compromis entre rendement, taille, dispersion et stabilité des AgNPs (Tableau VI), (Figure 13 ; 14).

Tableau VI : Récapitulatif des résultats d'optimisation de la concentration pour la biosynthèse des AgNPs à partir d'extraits de citron

AgNPs	[AgNO₃] (mM)	Observation macroscopique	λ Spr (nm)
AgNPs-J	1mM	Jaune clair	406
	5mM	Marron très foncé	441
	10mM	Brun-noir	441
AgNPs-Ec	1mM	Brun rougeâtre	413
	5mM	Brun clair	422
	10mM	Brun foncé	431
AgNPs-G	1mM	Jaune pale	409
	5mM	Jaune doré a orangé	417
	10mM	Brun rougeâtre	416
AgNPs -FMo	1mM	Jaune pale	390
	5mM	Orangé moyen	424
	10mM	Brun-roux intense	422
AgNPs -FPc	1mM	Brun rougeâtre foncé	405
	5mM	Brun rougeâtre moins opaque	423
	10mM	Brun très foncé à noir	420

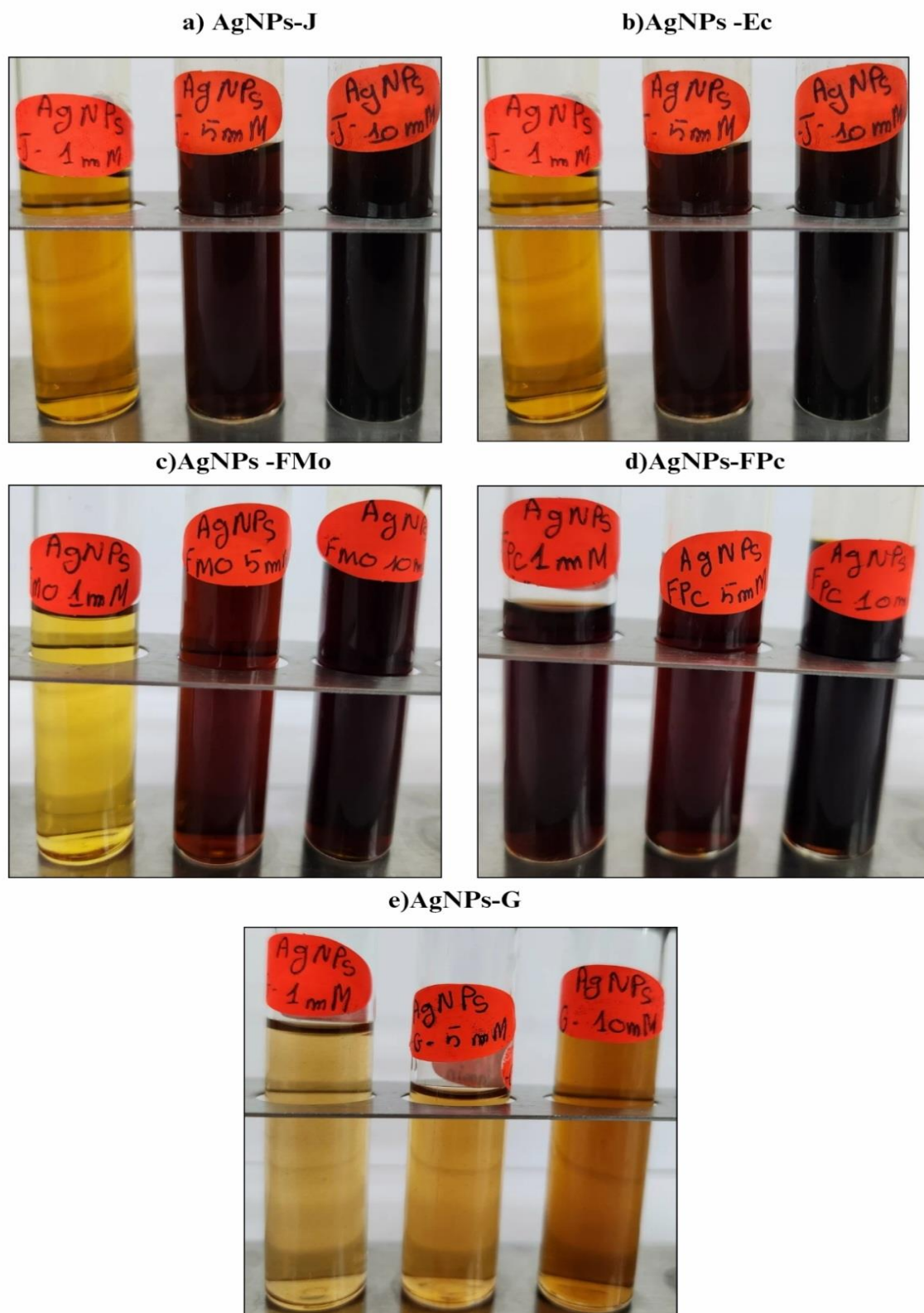


Figure 13 :Observation visuelle des tubes réactionnels des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes concentrations

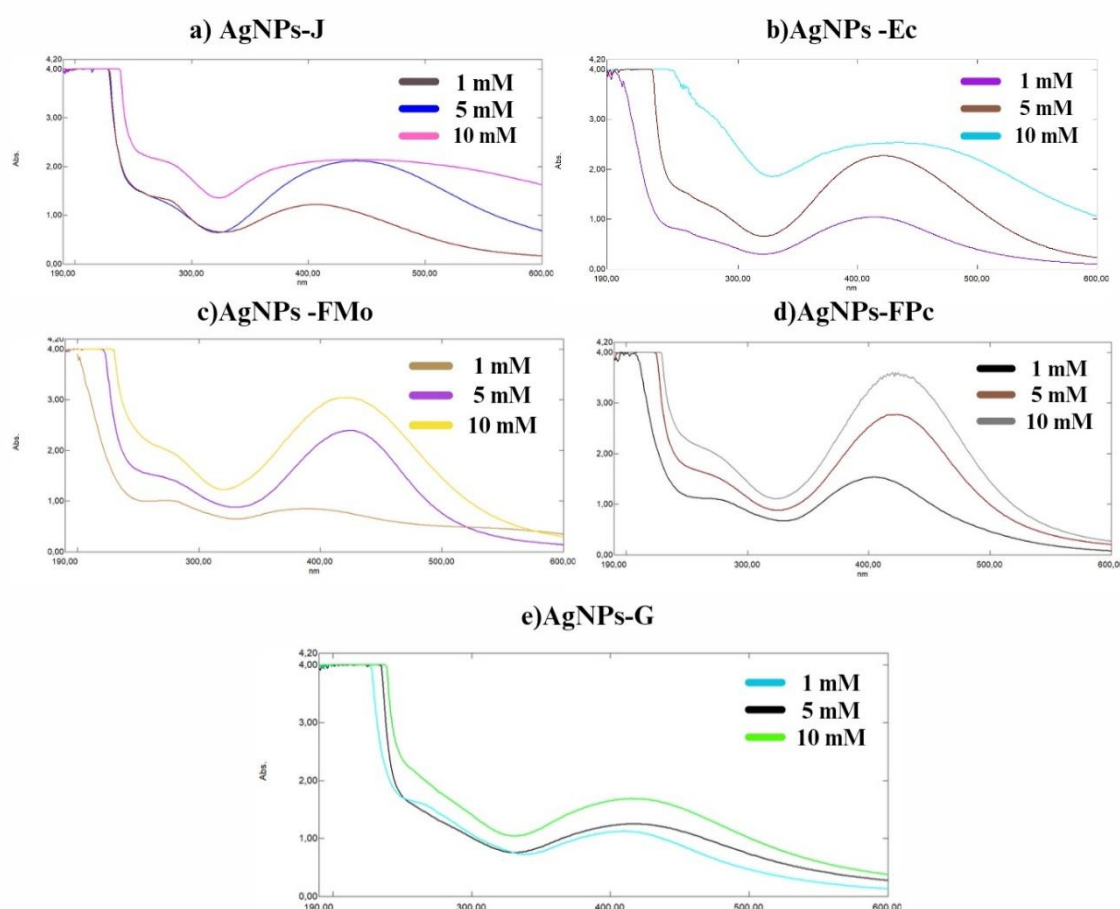


Figure 14 : Analyse spectroscopique UV-Visible des nanoparticules d'argent biosynthétisées par les extraits de citron a différentes températures .

La concentration en AgNO_3 représente un facteur essentiel dans la synthèse verte des AgNPs, influençant le taux de nucléation, la croissance des particules et leur stabilité colloïdale (Ahmad *et al.*, 2011).

Dans cette étude, une faible concentration (1 mM) a abouti à une synthèse limitée, traduite par une coloration pâle des solutions et l'absence ou la faiblesse des pics SPR, suggérant une réduction incomplète des ions Ag^+ . Ce comportement pourrait résulter, selon Iravani (2011), d'un déséquilibre entre la quantité d'ions argent et le potentiel réducteur des extraits végétaux.

À l'inverse, une concentration intermédiaire (5 mM) a permis une synthèse optimale, marquée par une coloration intense, des pics SPR nets (417–426 nm) et une bonne dispersion des particules, en accord avec les observations de Nasrollahzadeh *et al.* (2019), qui soulignent l'importance d'un équilibre entre la vitesse de réduction et la stabilisation par les métabolites végétaux. Toutefois, une concentration plus élevée (10 mM) a induit une instabilité colloïdale, caractérisée par une surintensité des couleurs, un élargissement des pics SPR et une possible agglomération, comme l'ont rapporté Baranwal *et al.* (2018) et Muhammad *et al.* (2016). Ces résultats confirment que la concentration optimale en AgNO_3

se situe autour de 5 mM, garantissant la formation de nanoparticules bien formées, homogènes et stables (Singh et al., 2018 ; Mittal et al., 2020).

III.2. Caractérisation des nanoparticules d'argent (AgNPs)

III.2.1. Spectroscopie Ultraviolet-visible

L'analyse UV-Visible a confirmé la formation des AgNPs à partir des extraits de citron, avec des pics SPR entre 425 et 445 nm. Le jus a présenté un pic intense à 430 nm, signe d'une synthèse rapide et abondante, liée à sa richesse en antioxydants. Les feuilles ont montré un pic à 425 nm, indiquant des particules plus petites et homogènes. L'écorce a donné un pic à 435 nm, révélant des particules de taille intermédiaire. Les graines ont affiché un pic large et décalé (440–445 nm), suggérant une synthèse moins efficace et une distribution de taille hétérogène. Ces différences reflètent l'impact de la composition photochimique de chaque extrait .

L'apparition de pics d'absorbance entre 400 et 450 nm dans les spectres UV-Vis constitue une preuve optique de la formation des AgNPs, liée à la résonance plasmonique de surface (SPR) (Baranwal et al., 2018). Dans cette étude, tous les extraits de citron ont généré de tels pics, confirmant la réussite de la synthèse. L'intensité et la position de ces pics varient selon le type d'extrait utilisé, ce qui reflète les différences en taille, concentration et homogénéité des nanoparticules (Ahmad et al., 2011). Le jus de citron a montré un pic intense à 430 nm, indiquant une synthèse rapide et abondante, attribuée à la richesse en acides organiques et antioxydants (Iravani, 2011).

Les extraits de feuilles ont produit un pic à 425 nm, suggérant des particules de petite taille et bien dispersées, probablement stabilisées par les polyphénols et flavonoïdes (Nasrollahzadeh et al., 2019). Pour les écorces, un pic à 435 nm indique des particules légèrement plus grandes, en lien avec une cinétique de réduction plus lente (Mittal et al., 2020).

Enfin, les extraits de graines ont donné un pic plus large et décalé vers 440–445 nm, traduisant une hétérogénéité granulométrique et une agglomération partielle, en accord avec les travaux de Muhammad et al. (2016).

III.2.2. Analyse du potentiel zêta

Les analyses du potentiel zêta montrent que la stabilité colloïdale des AgNPs varie selon l'extrait de citron utilisé. Les écorces offrent la meilleure stabilité (−35,8 mV), grâce à une forte charge négative assurée par les polyphénols. Le jus et les graines présentent une stabilité modérée (+16,1 mV et +14,0 mV), mais avec une forte hétérogénéité de charge, indiquant un risque d'agglomération. Les feuilles chauffées classiquement montrent une stabilité faible à modérée (−9,9 mV), tandis que celles traitées par micro-ondes présentent la stabilité la plus faible (−4,5 mV). Ainsi, les écorces apparaissent comme l'extrait le plus favorable à la stabilité des AgNPs (Figure 15).

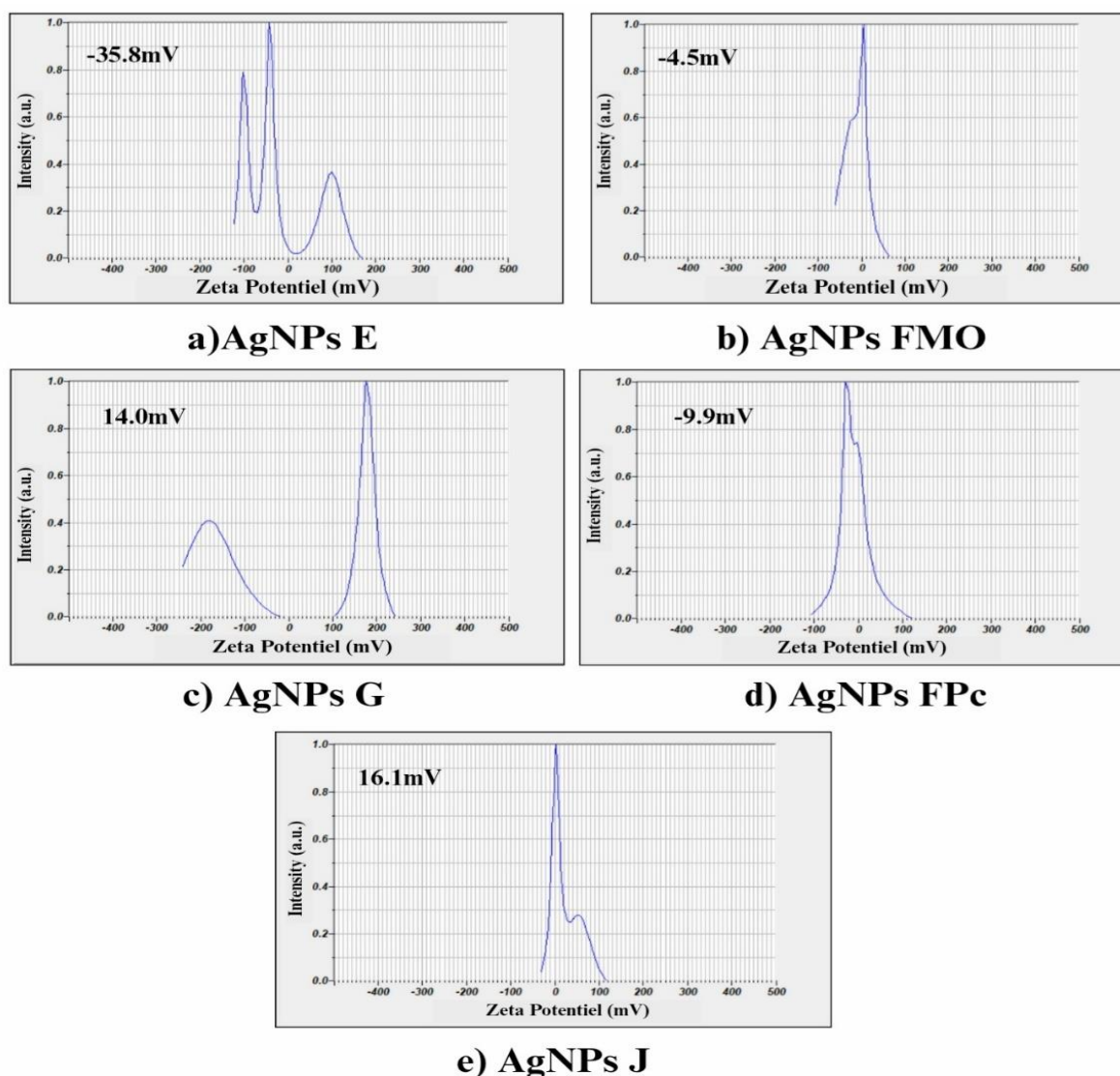


Figure 15 :Résultats de l'analyse de potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées à base des extraits végétaux de citron

Le potentiel zêta est un paramètre essentiel pour évaluer la stabilité colloïdale des nanoparticules, une valeur absolue supérieure à ± 30 mV étant généralement considérée comme indicatrice d'une bonne dispersion (Baranwal et *al.*, 2018 ; Irvani, 2011). Dans cette étude, les AgNPs synthétisées à partir des extraits de citron ont montré des niveaux de stabilité variables selon la partie végétale utilisée. Les extraits d'écorces ont généré les particules les plus stables, avec un potentiel zêta de $-35,8$ mV, attribué à la richesse en polyphénols et acides phénoliques formant une couche de stabilisation efficace (Nasrollahzadeh et *al.*, 2019).

En revanche, les AgNPs issues du jus ont affiché une stabilité modérée ($+16,1$ mV), avec une double population de charges, ce qui reflète une hétérogénéité métabolique dans l'extrait (Singh et *al.*, 2018). Les extraits de graines ont également montré une stabilité moyenne ($+14,0$ mV), mais avec une

grande variabilité de charge (± 180 mV), traduisant une dispersion instable et un risque élevé d'agglomération (Muhammad *et al.*, 2016).

Les AgNPs des feuilles chauffées à la plaque ont présenté une stabilité faible à modérée ($-9,9$ mV), avec des pics multiples liés à une passivation incomplète due à la dégradation partielle des agents capping (Mittal *et al.*, 2020).

Enfin, les nanoparticules obtenues à partir des feuilles traitées par micro-ondes ont montré la stabilité la plus faible ($-4,5$ mV), ce que Ahmad *et al.* (2011) attribuent à la dénaturation thermique des biomolécules actives, compromettant leur capacité de stabilisation.

III.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

L'analyse FTIR des AgNPs issues des extraits de citron met en évidence la présence de groupes fonctionnels jouant un rôle dans la réduction et la stabilisation des ions Ag^+ . Des bandes larges entre $3421\text{--}3475\text{ cm}^{-1}$ indiquent des groupes O–H et N–H, liés aux flavonoïdes, polyphénols et protéines. Un pic autour de 1635 cm^{-1} (liaisons C=O) suggère l'implication de protéines ou composés aromatiques. Les bandes à 1122 et 1272 cm^{-1} révèlent des polysaccharides, glycosides ou alcaloïdes. Certains extraits, comme les graines, montrent aussi un pic à 2144 cm^{-1} (groupes nitriles/alcyne). Enfin, les bandes entre $516\text{--}597\text{ cm}^{-1}$ confirment la formation de liaisons Ag–O ou Ag–N, attestant de l'interaction directe entre les AgNPs et les biomolécules végétales (Figure 15).

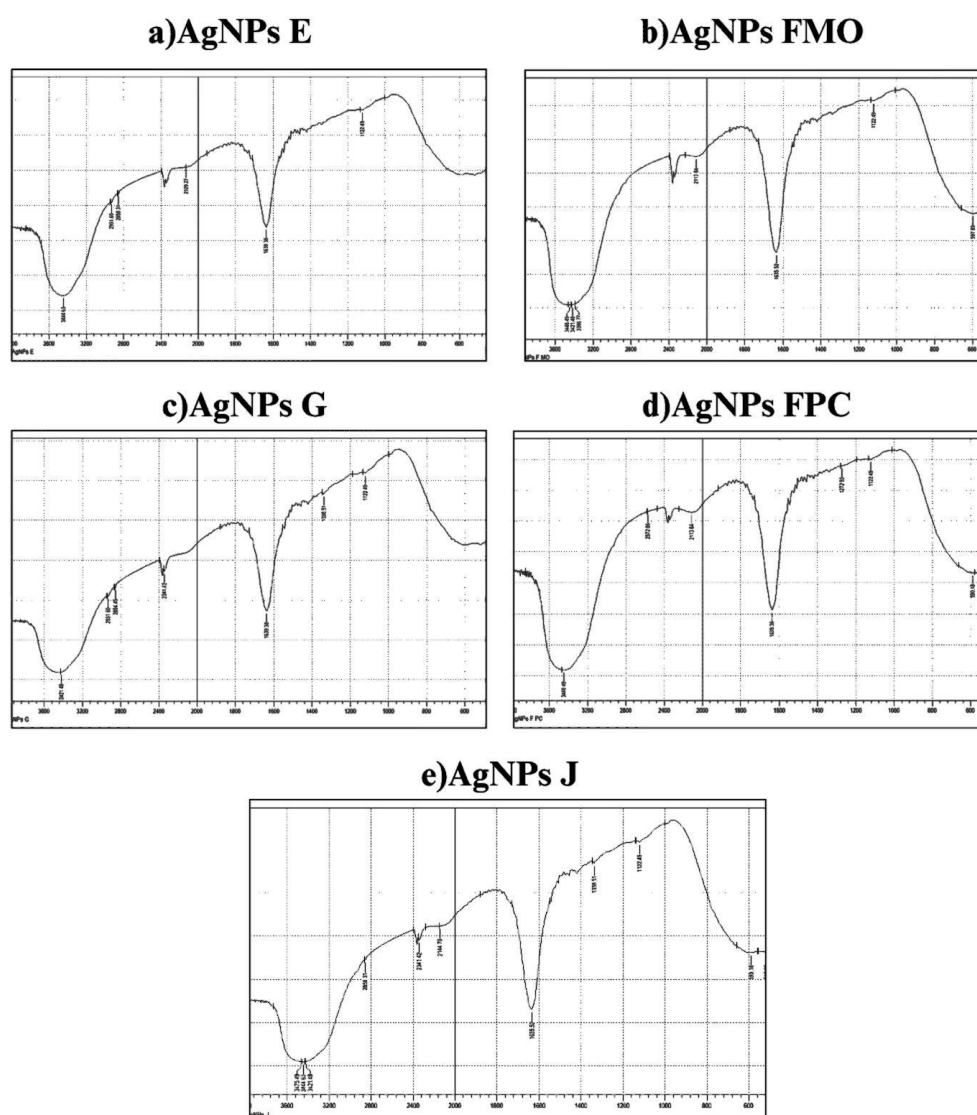


Figure 16 : Résultat de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier des nanoparticules d'argent synthétisées à base des extraits végétaux de citron

La spectroscopie FTIR constitue une technique clé pour identifier les groupes fonctionnels impliqués dans la réduction et la stabilisation des nanoparticules d'argent (AgNPs) (Iravani, 2011 ; Nasrollahzadeh *et al.*, 2019). Dans cette étude, les spectres FTIR des AgNPs issues des différents extraits de citron révèlent la présence de divers biomolécules actives. Une bande large entre 3421 et 3475 cm^{-1} indique la présence de groupes -OH et -NH , caractéristiques des flavonoïdes, polyphénols et protéines végétales, connus pour leur double rôle de réducteurs et de stabilisants (Ahmad *et al.*, 2011). Un pic intense autour de 1635 cm^{-1} , attribué aux liaisons C=O , suggère la contribution de composés aromatiques ou protéiques dans les processus de capping (Baranwal *et al.*, 2018).

D'autres bandes à 1122 et 1272 cm^{-1} sont liées à des vibrations C-O ou C-N , associées à des glycosides, polysaccharides ou alcaloïdes, jouant un rôle dans la stabilisation colloïdale (Muhammad *et*

al., 2016). Les spectres des extraits de graines présentent également des bandes autour de 2144 cm^{-1} , indiquant la présence possible de groupes nitriles ou alcynes issus de composés azotés ou lipidiques (Mittal *et al.*, 2020). Enfin, des bandes entre 516 et 597 cm^{-1} confirment les liaisons Ag–O ou Ag–N, témoignant d’une interaction directe entre les nanoparticules et les biomolécules végétales, essentielle à leur stabilité colloïdale (Singh *et al.*, 2018).

III.2.4. La diffusion de la lumière dynamique

La taille et la dispersion des nanoparticules d’argent varient selon l’extrait végétal utilisé. Les plus petites tailles sont observées avec les extraits d’écorces (27,8 nm) et de feuilles traitées par micro-ondes (34,2 nm), traduisant une synthèse efficace. Les AgNPs issues des feuilles chauffées à la plaque (51,3 nm ; PI 0,55) montrent une bonne stabilité et homogénéité. En revanche, les nanoparticules synthétisées à partir du jus (73,3 nm) et des graines (70,9 nm) sont plus grandes, suggérant une aggrégation ou une moins bonne stabilisation. Ainsi, les extraits de feuilles et d’écorces semblent plus favorables à une formation contrôlée et stable des AgNPs (Figure 17).

Selon Singh *et al.* (2018) et Iravani (2011), la taille et la dispersion des AgNPs dépendent étroitement de la composition biochimique des extraits végétaux. Dans cette étude, les extraits d’écorces (27,8 nm, PI 5.18) et de feuilles micro-ondes (34,2 nm, PI 0.38) ont permis une synthèse efficace de petites nanoparticules, traduisant une bonne activité réductrice et stabilisatrice. D’après Baranwal *et al.* (2018), cette efficacité est liée à la richesse en polyphénols et flavonoïdes. Les feuilles chauffées à la plaque ont donné des particules modérées (51,3 nm, PI 0,55) avec une bonne stabilité (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019).

En revanche, les tailles plus élevées observées avec le jus (73,3 nm, PI 1.49) et les graines (70,9 nm, PI 1.18) indiquent une stabilisation moins efficace, probablement due à un déséquilibre des métabolites actifs (Muhammad *et al.*, 2016). Ainsi, les extraits de feuilles et d’écorces semblent les plus favorables à la formation d’AgNPs stables et homogènes (Mittal *et al.*, 2020).

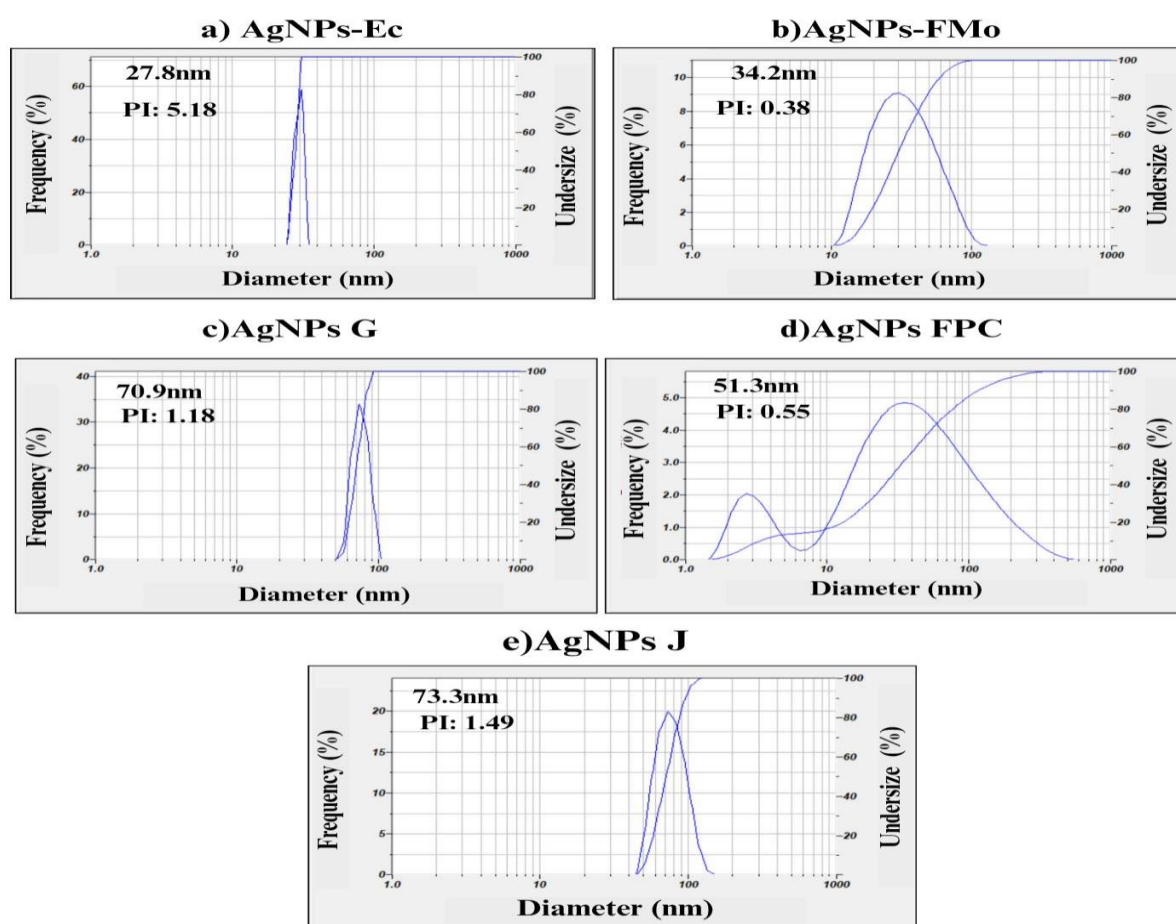


Figure 17 :L'analyse de diffusion dynamique des nanoparticules d'argent des extraits de citron.

III.3. Évaluation des propriétés biologiques des nanoparticules d'argent (AgNPs)

III.3.1. Activité antioxydante

L'analyse de l'activité antioxydante des nanoparticules d'argent (AgNPs) synthétisées à partir des différents extraits de citron a montré une efficacité généralement faible dans le test DPPH. La plupart des formulations, notamment celles issues du jus, des écorces, des graines et des feuilles chauffées à la plaque, ont présenté des pourcentages d'inhibition inférieurs à 50 %, même à des concentrations élevées, indiquant une faible capacité à neutraliser les radicaux libres. Certaines valeurs négatives observées dans les échantillons non corrigés traduisent une interférence optique ou une absence d'interaction réelle avec le DPPH.

En revanche, après correction pour la couleur de fond, les AgNPs obtenues à partir des feuilles traitées par micro-ondes ont atteint un pourcentage d'inhibition de 52,03 % à 80 ppm, représentant la seule activité modérée observée dans l'ensemble des extraits. Cette performance pourrait être liée à une meilleure conservation ou à une plus grande disponibilité des composés antioxydants à la surface des nanoparticules. Ces résultats indiquent que la méthode de traitement de l'extrait et la composition

Chapitre III : Résultats et discussions

chimique de la surface des AgNPs jouent un rôle déterminant dans leur potentiel antioxydant (Tableau VII ; Figure 18,19,20).

Tableau VII : Pourcentages d'inhibition (PI%) en fonction de la concentration des AgNPs synthétisées à partir des extraits de citron, selon deux méthodes de calcul : sans correction de couleur (AgNPs I) et avec correction (AgNPs II).

Concentration (Ppm)	FMo I %	FMo II %	FPc I %	FPc II %	Gr I %	Gr II %	J I %	JII %	Ec I %	Ec II %
5	-0.88	1.01	5.09	8.42	0.95	5.51	10.50	15.58	6.20	8.90
10	5.96	8.5	4.45	11.6	0.48	6.89	4.45	10.50	4.77	11.77
20	10.79	17.13	-2.06	10.17	-5.25	0.69	-4.16	5.40	-1.11	11.45
40	11.80	25.13	-14.94	7.95	-12.08	-3.10	-10.96	15.73	-11.60	12.08
60	14.85	33.50	-30.52	5.40	-17.96	-3.44	-26.70	21.94	-12.27	33.06
80	21.19	52.03	-46.74	3.18	-21.60	-5.17	-57.07	16.37	-40.06	26.23
100	/	/	-36.91	3.18	-24.01	6.89	-75.71	14.47	-51.20	43.88

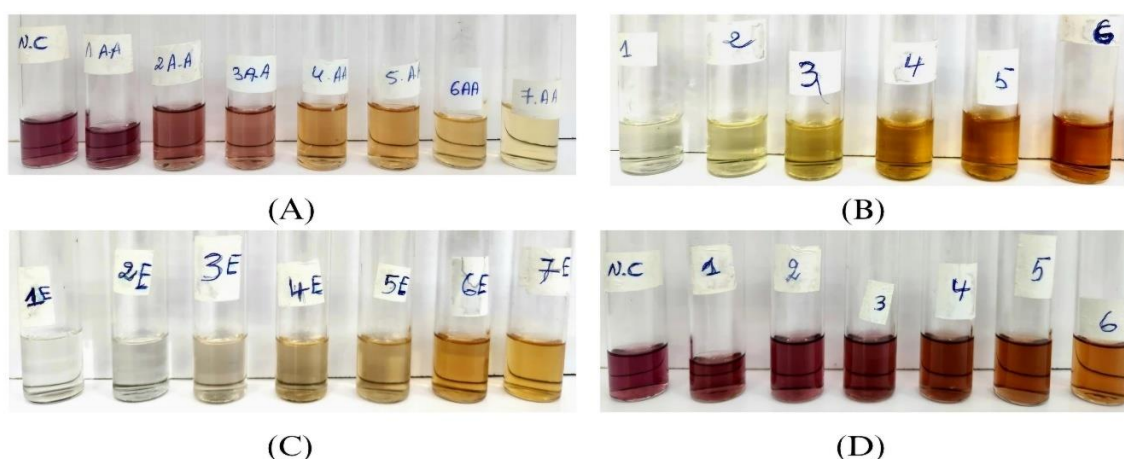
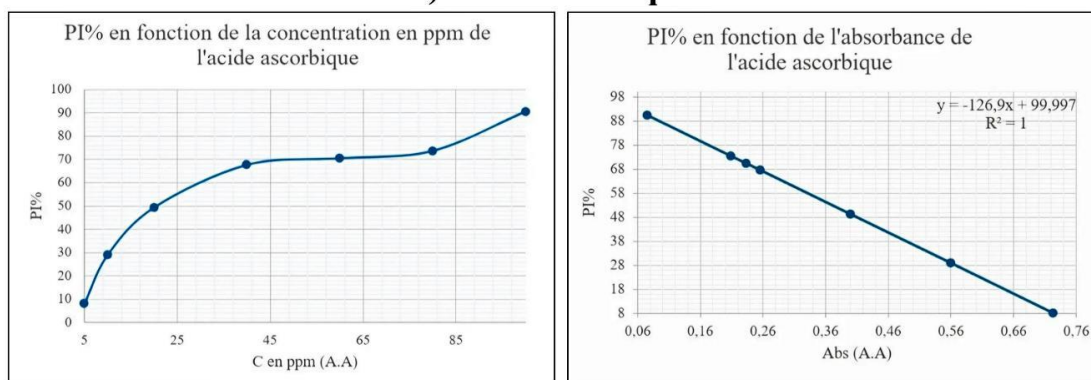


Figure 18: Évaluation de l'activité antioxydante par test DPPH .(A) Acide ascorbique (AA) + DPPH (témoin positif),(B) Dilutions AgNPs FMo , (C) AgNPs FMo + éthanol (contrôle solvant), (D) AgNPs FMo + DPPH. N.C = DPPH (contrôle négatif).

a) Acide ascorbique



b) AgNPs FMO

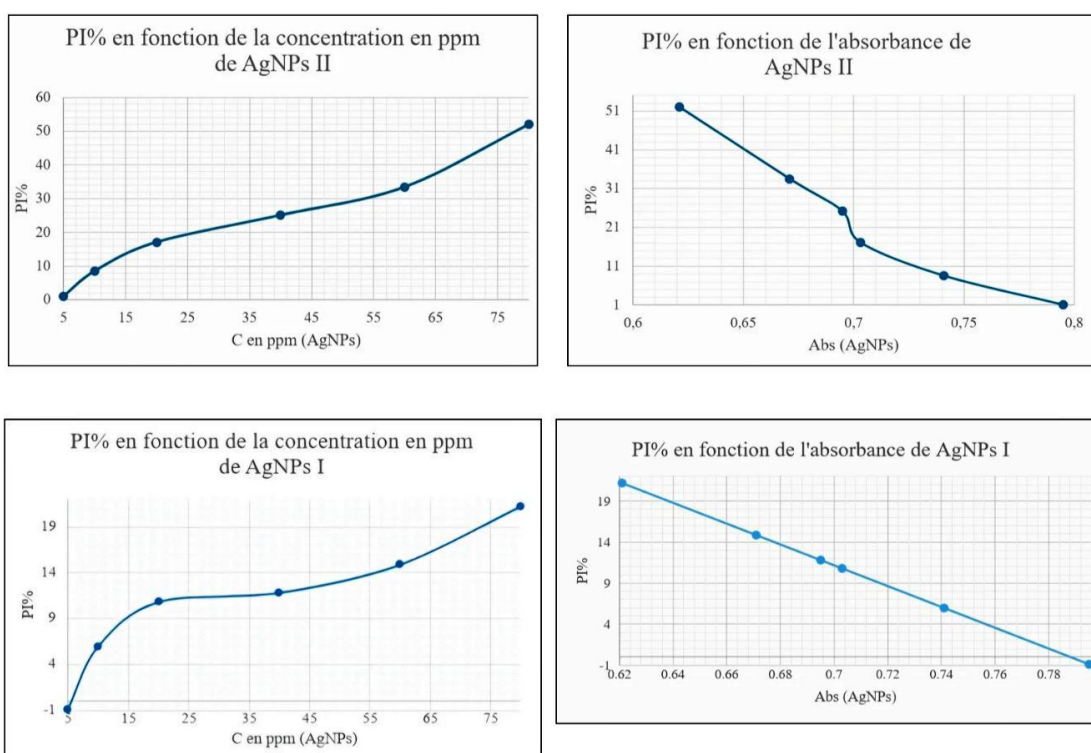


Figure 19 : Courbes de pourcentage d'inhibition (PI%) du DPPH. (A) Acide ascorbique (témoin positif), (B) AgNPs FMO (types I et II). Les graphiques de gauche montrent PI% en fonction de la concentration (ppm), ceux de droite PI% vs absorbance.



Figure 20 : Évaluation de l'activité antioxydante de quatre formulations d'AgNPs. Pour chaque type, trois séries sont présentées : (1) dilutions aqueuses (contrôle de couleur), (2) Dilutions dans l'éthanol (contrôle solvant), et (3) Mélanges réactionnels avec DPPH.

Selon Iravani et al. (2014) et Ahmed et al. (2016), l'efficacité antioxydante des nanoparticules d'argent dépend largement de la nature des métabolites végétaux adsorbés à leur surface, en particulier les flavonoïdes, acides phénoliques et autres composés réducteurs. Dans la présente étude, l'évaluation de l'activité antioxydante par le test DPPH a révélé une efficacité globalement faible pour la plupart des AgNPs synthétisées à partir des extraits de citron. En effet, les pourcentages d'inhibition (PI%) calculés sans correction (AgNPs I) ont été non seulement inférieurs à 50 %, mais souvent négatifs, traduisant soit une absence d'interaction réelle avec le radical DPPH, soit une interférence optique liée à la couleur intense des extraits résiduels dans la solution colloïdale.

Toutefois, après correction de la couleur de fond (AgNPs II), les PI% ont montré une amélioration notable dans certaines formulations, en particulier pour les AgNPs issues des feuilles traitées par micro-ondes, qui ont atteint un PI% de 52,03 % à 80 ppm. Cette valeur est la seule à dépasser le seuil de 50 %, indiquant une activité antioxydante modérée. Ce résultat pourrait s'expliquer par une meilleure préservation des composés phénoliques lors du traitement par micro-ondes, favorisant leur intégration et leur stabilité à la surface des nanoparticules.

En revanche, les AgNPs issues du jus, des graines, des écorces ou des feuilles chauffées à la plaque ont montré des PI% inférieurs à 40 %, même après correction, ce qui suggère soit une faible teneur en composés antioxydants dans ces extraits, soit une dégradation thermique de ces composés pendant la synthèse. Les faibles performances des AgNPs I par rapport aux AgNPs II soulignent par ailleurs l'importance de corriger les effets de fond dans les tests colorimétriques, notamment avec des extraits végétaux naturellement colorés.

Enfin, en comparaison avec l'acide ascorbique, utilisé comme standard, qui a montré une inhibition supérieure à 90 %, les AgNPs obtenues dans cette étude présentent un pouvoir antioxydant faible à modéré, dépendant du type d'extrait et du protocole de préparation. Ces observations confirment que l'activité antioxydante des AgNPs biosynthétisées n'est pas seulement liée à la présence de nanoparticules, mais également à la qualité, la nature et la stabilité des composés phytochimiques impliqués dans leur formation et leur fonctionnalisation.

III.3.2. Activité antibactérienne

III.3.2.1 Méthodes de diffusion des disques

Les AgNPs synthétisées à partir des extraits de citron ont toutes montré des activités antibactériennes variables selon la partie végétale utilisée. Celles issues du jus (AgNPs-J) présentent une activité modérée, avec une zone d'inhibition maximale de 16 mm à 80 ppm contre *Staphylococcus aureus* de 19 mm à 100 ppm contre *Escherichia coli*, mais restent inefficaces contre *Klebsiella pneumoniae*.

Les AgNPs à base d'écorces (AgNPs-E) se révèlent plus actives, notamment contre *Staphylococcus aureus* (25 mm) et *Escherichia coli* (19 mm), tandis que *Klebsiella pneumoniae* y est faiblement sensible (13 mm). En revanche, les nanoparticules obtenues par traitement micro-ondes

Chapitre III : Résultats et discussions

(AgNPs-FMo) présentent une faible efficacité globale, avec des zones d'inhibition ne dépassant pas 14 mm, toutes souches confondues.

Les AgNPs synthétisées à partir des feuilles chauffées par plaque (AgNPs-FPc) affichent les meilleures performances, avec des zones d'inhibition atteignant 28 mm contre *S. aureus*, 25 mm contre *P. aeruginosa*, 20 mm contre *E. coli* et 22 mm contre *K. pneumoniae*, traduisant une activité large spectre et puissante. Enfin, les AgNPs issues des graines (AgNPs-G) donnent également de bons résultats, avec des zones allant jusqu'à 25 mm contre *S. aureus* et 21 mm contre *E. coli*, mais restent moins efficaces sur *K. pneumoniae* (10–11 mm).

Ces résultats soulignent que les feuilles chauffées par plaque constituent la source végétale la plus performante pour la synthèse de nanoparticules d'argent à large spectre et forte efficacité.

(Tableau VIII ; Figure 21,22,23 ;24).

Tableau VIII : Diamètres des zones d'inhibition (mm) des AgNPs issus des extraits de citron

Souches bactériennes	Concentration (ppm)	Code boîte	AgNPs J	AgNPs E	AgNPs FMo	AgNPs FPc	AgNPs G
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27 853	5	1	9 mm	-	7 mm	-	-
	10	2	10 mm	-	8 mm	17 mm	16 mm
	20	3	11 mm	12 mm	8 mm	17 mm	15 mm
	40	4	12mm	16 mm	10 mm	17 mm	15 mm
	60	5	12 mm	12 mm	10 mm	18 mm	16 mm
	80	6	13 mm	13 mm	11 mm	20 mm	16 mm
	100	7	11 mm	12 mm	14 mm	25 mm	20 mm
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC-25923	5	1	-	-	-	-	-
	10	2	-	-	7 mm	27 mm	-
	20	3	-	-	8 mm	22 mm	-
	40	4	14 mm	18 mm	9 mm	23 mm	18 mm
	60	5	15 mm	20 mm	10 mm	24 mm	20 mm
	80	6	16 mm	22 mm	11 mm	26 mm	22 mm
	100	7	14 mm	25 mm	15 mm	28 mm	25 mm

Chapitre III : Résultats et discussions

<i>Escherichia Coli ATCC 25 922</i>	5	1	-	-	8 mm	-	-
	10	2	-	-	10 mm	14 mm	-
	20	3	-	-	-	13 mm	19 mm
	40	4	-	-	7 mm	13 mm	18 mm
	60	5	-	-	8 mm	14 mm	20 mm
	80	6	-	-	9 mm	14 mm	21 mm
	100	7	-	19	10 mm	20 mm	21 mm
<i>Klebsiella pneumonia</i>	5	1	-	-	-	-	-
	10	2	-	-	-	-	-
	20	3	-	-	-	-	-
	40	4	-	-	9 mm	20 mm	-
	60	5	-	13 mm	13 mm	22 mm	-
	80	6	-	13mm	11 mm	22 mm	11 mm
	100	7	-	12 mm	13 mm	22 mm	10 mm

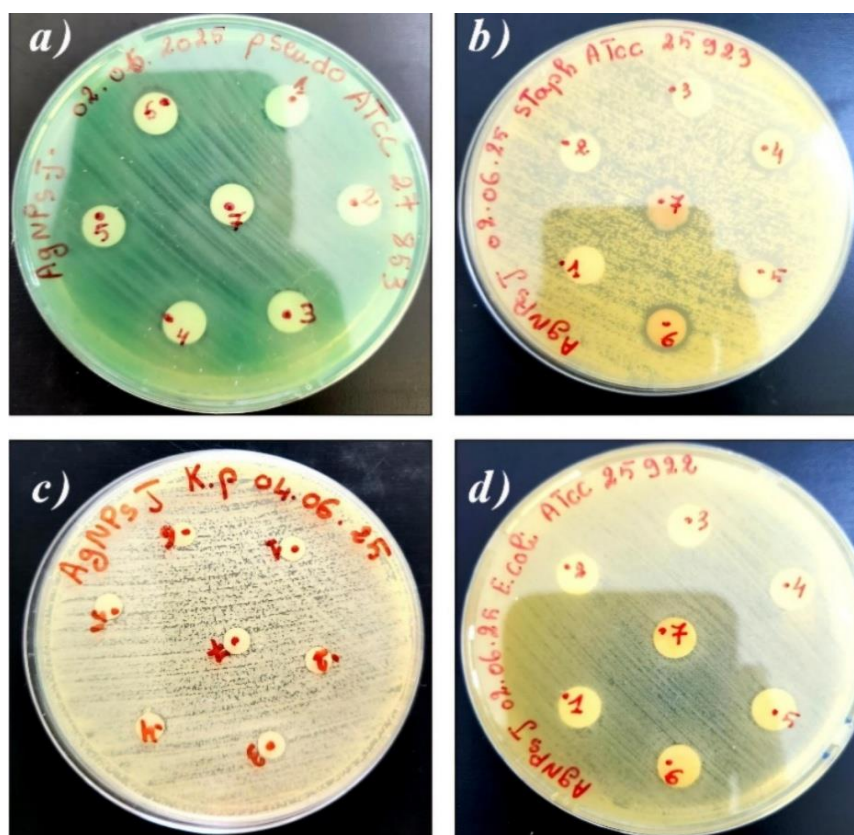


Figure 21: Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues du jus de citron

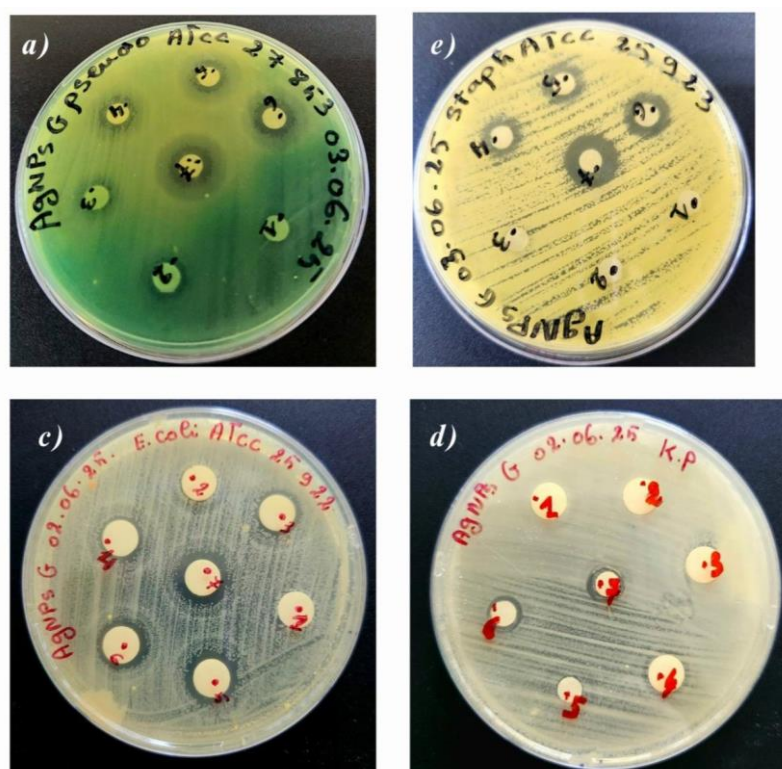


Figure 22 : Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des graines de citron.

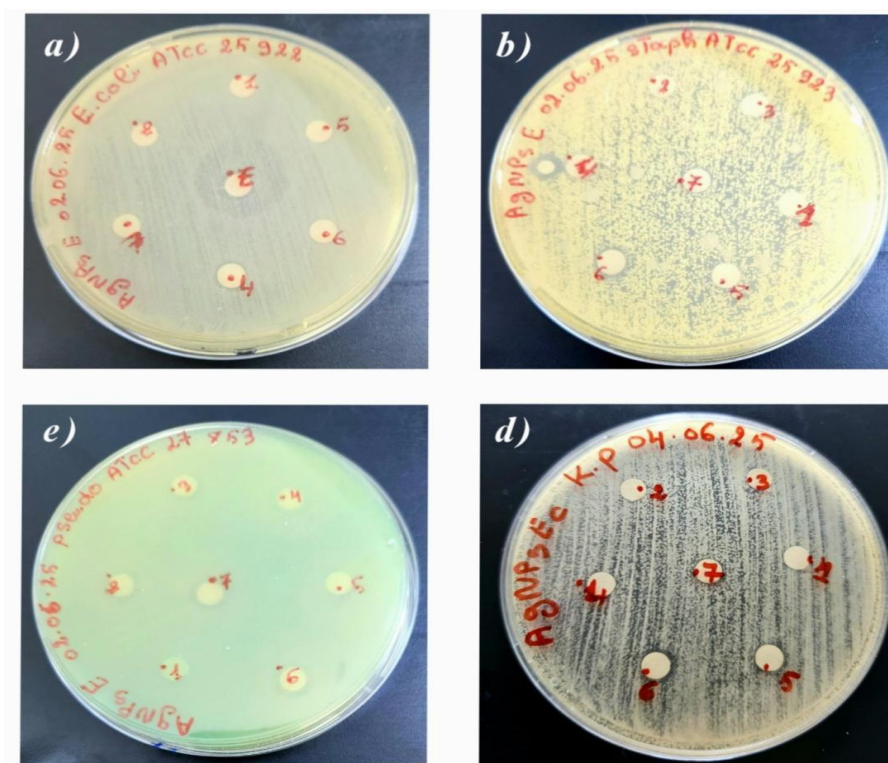


Figure 23 : Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des écorces de citron.

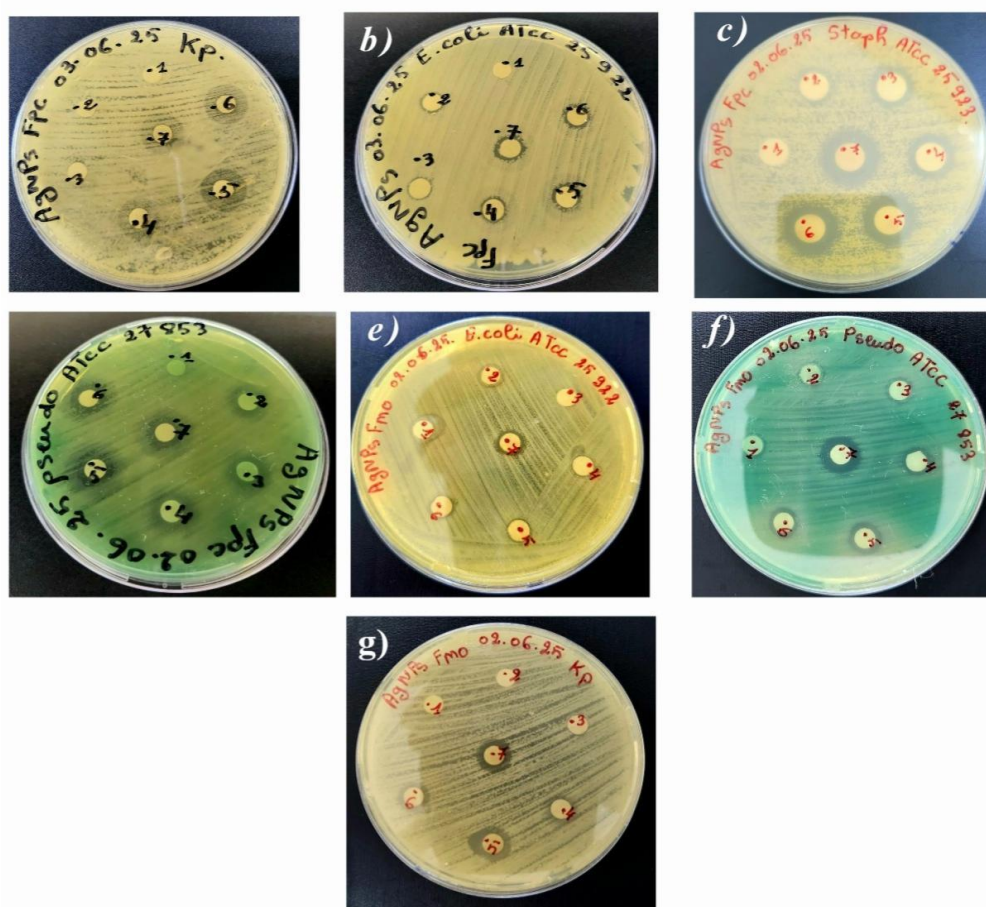


Figure 24 : Évaluation de l'efficacité : Résultats de la méthode de diffusion des disques des AgNPs issues des feuilles traitées par plaque chauffante et par micro-ondes

Les AgNPs synthétisées à partir de jus de citron (AgNPs-J) montrent une activité modérée contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, mais s'avèrent inefficaces contre *Klebsiella pneumoniae*, ce que Shah et al. (2019) attribuent à une teneur insuffisante en polyphénols et acide ascorbique limitant leur biodisponibilité, tandis que Rai et al. (2021) invoquent la résistance capsule-dépendante des entérobactéries.

Les AgNPs-E montrent une meilleure activité, corrélée à la présence de flavonoïdes (Vijayaraghavan & Ashokkumar, 2017), tandis que leur efficacité réduite contre *Klebsiella pneumoniae* s'aligne avec le rôle des porines membranaires (Pal et al., 2020).

Les AgNPs-FMo présentent une inhibition limitée (≤ 14 mm), résultat aligné avec les travaux de Makarov et al. (2014) sur la dénaturation thermique des biomolécules actives. En revanche, les AgNPs de feuilles chauffées sur plaque démontrent un large spectre (jusqu'à 28 mm contre *S. aureus*), les performance que El-Naggar et al. (2020) expliquent par la libération de terpénoïdes (El-Naggar et al., 2020), dépassant les performances rapportées par Singh et al. (2018).

Enfin les AgNPs-G sont efficaces contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* grâce aux limonoïdes (Mittal et al., 2020), mais confirment la résistance de *K. pneumoniae* aux nanomatériaux (Slavin et al., 2017). La supériorité des AgNPs-FPc s'explique par la stabilité des biomolécules (Daphedar et al., 2022), une synergie métabolites-Ag⁺ (Rónavári et al., 2021) et l'hétérogénéité structurale bactérienne (Podschun & Ullmann, 2023).

III.3.3. Activité antifongique

I.3.3.1 méthode de diffusion des disques

Tous AgNPs démontrent une activité antifongique sélective et dose-dépendante contre *C. albicans* avec une efficacité croissante à 10 ppm avec les AgNPs-FPc (21 mm) et FMo (14 mm), puis s'intensifie jusqu'à 100 ppm, atteignant 28 mm pour FPc, 25 mm k FMo, suivies de J (22 mm), E (19 mm) et G (16 mm). Cette évolution confirme une relation concentration-réponse marquée, avec une efficacité maximale pour les AgNPs-FPc (Figure 25).

À l'inverse, *A. niger* montre une résistance complète dans la plage de concentrations testée (5–100 ppm) sans inhibition observée, probablement en raison de mécanismes de défense fongiques renforcés (paroi épaisse, biofilms), mais également de l'épuisement progressif des AgNPs au cours de l'essai, lié à la croissance lente du champignon, laissant le temps aux nanoparticules de se dégrader (Figure 26).

Ces résultats soulignent l'importance du choix de la souche, du type de nanoparticules, de la concentration, ainsi que de la méthode utilisée notamment la diffusion sur disque pour optimiser l'usage antifongique des AgNPs. Cette méthode, bien que courante, peut toutefois sous-estimer l'efficacité des nanoparticules en raison de leur faible diffusion dans le milieu gélosé (Tableau IX).

Tableau IX : Récapitulatif des diamètres des zones d'inhibition (mm) des AgNPs issus des extraits de citron

Souches fongiques	Concentration (ppm)	Code boîte	AgNPs J	AgNPs E	AgNPs FMo	AgNPs FPc	AgNPs G
Candida albicans	5	1	-	-	-	-	-
	10	2	-	-	14 mm	21 mm	-
	20	3	14 mm	-	18 mm	21 mm	-
	40	4	16 mm	12 mm	21 mm	22 mm	-
	60	5	17 mm	15 mm	23 mm	27 mm	12 mm
	80	6	16 mm	17 mm	22 mm	28 mm	12 mm
	100	7	22 mm	19 mm	25 mm	25 mm	16 mm
Aspergillus Niger ATCC 1015	5	1	-	-	-	-	-
	10	2	-	-	-	-	-
	20	3	-	-	-	-	-
	40	4	-	-	-	-	-
	60	5	-	-	-	-	-
	80	6	-	-	-	-	-
	100	7	-	-	-	-	-

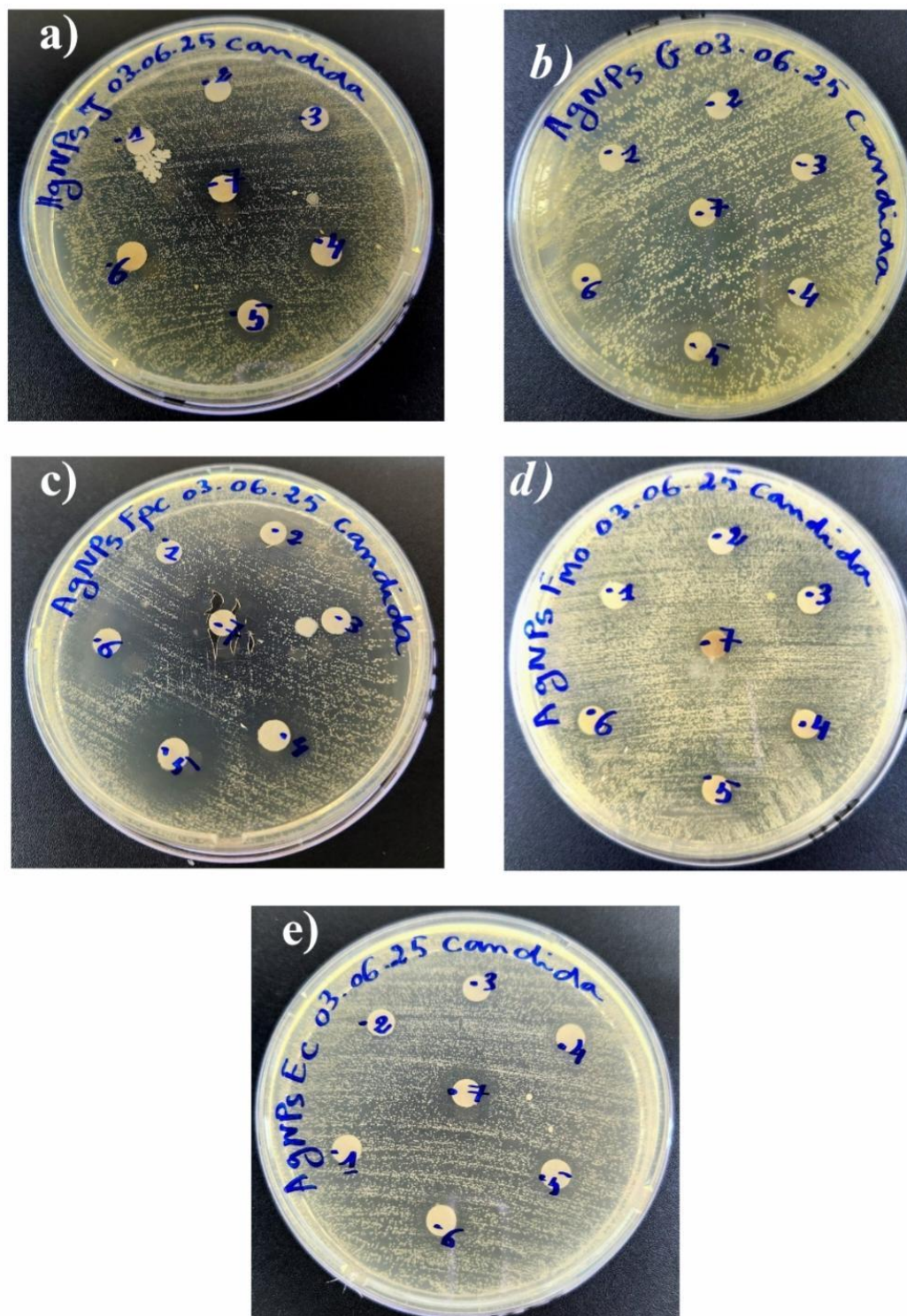


Figure 25 : Évaluation de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent sur *Candida albicans*

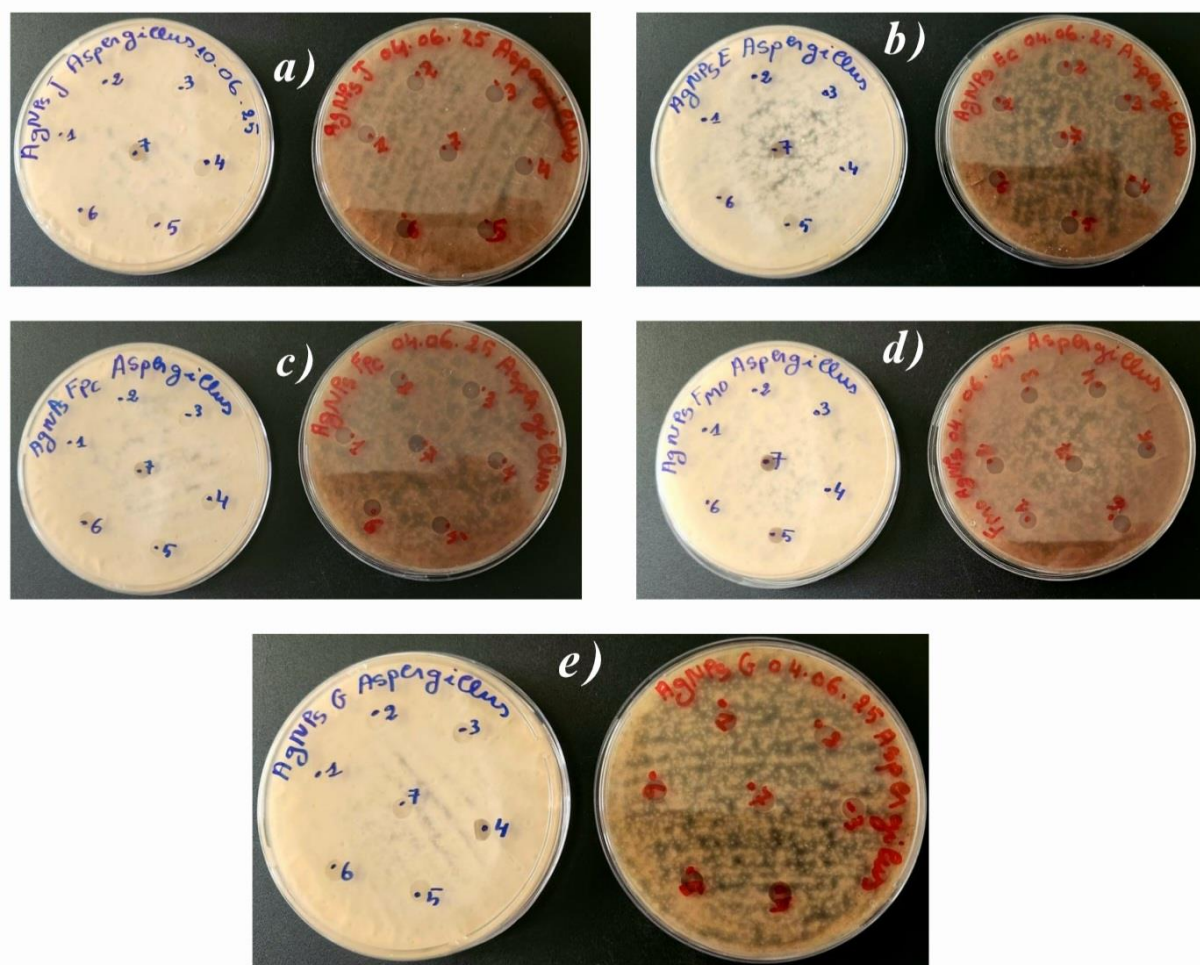


Figure 26 : Évaluation de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent sur

Aspergillus niger

Les résultats obtenus montrent que les nanoparticules d'argent synthétisées à partir des différents extraits de citron exercent une activité antifongique marquée contre *Candida albicans*, mais aucune inhibition n'a été observée sur *Aspergillus niger*, même à haute concentration (100 ppm). Ce comportement sélectif est cohérent avec plusieurs études récentes, soulignant une plus grande sensibilité des levures par rapport aux moisissures filamenteuses aux traitements à base de nanoparticules métalliques.

Selon Zhang et al. (2021), les AgNPs interfèrent avec la membrane cellulaire de *C. albicans*, provoquant une fuite du contenu intracellulaire et la mort cellulaire, effet qui s'intensifie avec l'augmentation de la concentration. Cette relation dose-réponse a également été observée dans notre étude, où les AgNPs-FPc ont induit une zone d'inhibition de 28 mm à 100 ppm, contre 21 mm à 10 ppm. Ce profil est conforme aux travaux de Rahman et al. (2024), qui ont rapporté une activité antifongique significative des AgNPs biosynthétisées à partir d'extraits riches en flavonoïdes et composés phénoliques.

D'après Ben Ali *et al.* (2025), les extraits végétaux à fort pouvoir réducteur, comme FPc, favorisent la formation de nanoparticules plus petites et plus actives, ce qui explique leur supériorité par rapport aux extraits de graines (G) et de jus (J), dont l'activité reste plus modeste.

Les AgNPs issues de sources végétales ayant un fort pouvoir réducteur comme les extraits de feuilles chauffées dans notre étude favorisent la formation de nanoparticules plus petites, plus stables et plus actives contre les cellules fongiques. Cela pourrait expliquer pourquoi les AgNPs-FPc surpassent les autres dans notre série, en particulier celles issues des graines et du jus, dont l'activité antifongique reste plus modeste (16–22 mm à 100 ppm). Ben Ali *et al.* (2025),

En revanche, l'absence totale d'inhibition sur *A. niger* est en accord avec les résultats de Chowdhury *et al.* (2020), qui ont signalé une forte tolérance de cette moisissure vis-à-vis des nanoparticules métalliques, attribuée à sa paroi cellulaire épaisse, son fort pouvoir sporulant et sa capacité à former des biofilms denses. Par ailleurs, comme mentionné par Singh *et al.* (2023), la croissance lente d'*A. niger* peut également compromettre l'action des AgNPs, celles-ci pouvant se désagréger ou s'oxyder avant d'atteindre une concentration active au point d'impact.

Ces résultats confirment l'importance cruciale du type de souche cible, du procédé de synthèse des AgNPs et de leur concentration. D'après Lopez-Medina *et al.* (2022), l'adaptation fongique aux métaux, notamment chez les espèces filamenteuses, nécessite souvent des approches combinées (AgNPs + antifongiques conventionnels) pour atteindre une efficacité satisfaisante.

III.3.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices obtenues par lecture en microplaque 96 puits

Les valeurs de CMI obtenues par lecture spectrophotométrique en microplaque 96 puits montrent une efficacité variable des AgNPs selon l'origine végétale et la souche testée. Les AgNPs issues des feuilles (FMo, FPc) et des graines (G) présentent les plus faibles CMI, notamment contre *P. aeruginosa* ($\approx 0,417$ – $0,421$ ppm) et *E. coli* (jusqu'à $0,291$ ppm avec G), traduisant une forte activité antibactérienne. En revanche, les AgNPs de jus (J) et d'écorces (Ec) sont moins actives, avec des CMI plus élevées (jusqu'à $1,716$ ppm) ou une absence d'effet sur *K. pneumoniae*. Toutes les formulations restent actives contre *S. aureus* ($\text{CMI} \leq 1$ ppm), tandis que seules G, FPc et FMo montrent une action sur *K. pneumoniae* ($\text{CMI} \approx 0,59$ – $0,62$ ppm).

Ces résultats soulignent le potentiel supérieur des AgNPs-FMo, FPc et G, notamment contre les bactéries Gram-négatives, et confirment l'influence déterminante de la source végétale sur l'efficacité antimicrobienne des nanoparticules d'argent synthétisées.

Par ailleurs, les AgNPs présentent une bonne activité antifongique contre *Candida albicans*, avec des CMI comprises entre $0,313$ ppm (FPc) et $0,474$ ppm (J). Les formulations issues des feuilles chauffées par plaque (FPc), des graines (G) et des feuilles micro-ondes (FMo) sont les plus efficaces.

Chapitre III : Résultats et discussions

Bien que *Aspergillus niger* se soit montré résistant à l'ensemble des AgNPs lors de la méthode de diffusion sur disque (absence de halo d'inhibition), les résultats obtenus par la méthode des CMI révèlent une inhibition significative, avec des valeurs comprises entre 0,220 ppm (FMo) et 0,982 ppm (J). Les meilleurs résultats sont observés pour les extraits FMo, FPc et G, suggérant une efficacité renforcée de ces sources végétales contre ce champignon filamenteux (Tableau X ; Figure 27).

Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau X: Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des nanoparticules d'argent (AgNPs) issus des extraits végétaux exprimées en (ppm) par méthode de microplaque

Souches microbiennes	CMI AgNPs –J (PPM)	CMI AgNPs –G (PPM)	CMI AgNPs –FMo (PPM)	CMI AgNPs -FPc (PPM)	CMI AgNPs -Ec (PPM)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27 853	1.479	0.421	0.417	0.419	1.716
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25 923	0.975	0.816	1.079	1.080	1.017
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25 922	1.209	0.291	0.414	0.501	Absence
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Absence	0.627	Absence	Absence	Absence
<i>Candida albicans</i>	0.474	0.356	0.338	0.313	0.361
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 1015	0.982	0.399	0.220	0.269	0.853

Cette divergence entre les deux approches peut s'expliquer par la capacité limitée des nanoparticules à diffuser dans le milieu solide (gélouse), en raison de leur taille, de leur charge ou de leur agrégation, alors qu'en milieu liquide (microplaque), les AgNPs restent plus dispersées et interagissent plus efficacement avec les structures fongiques.

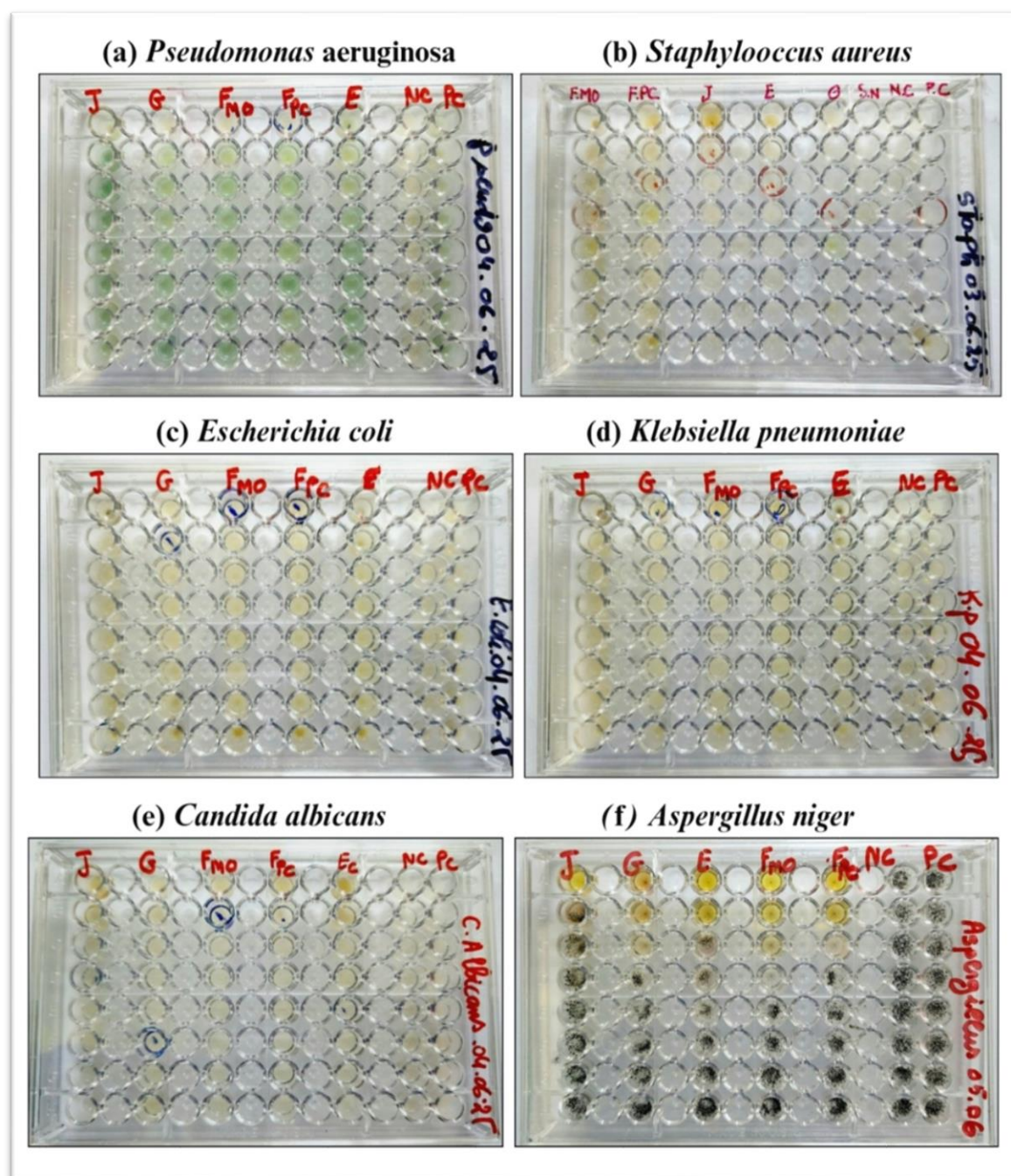


Figure 27 : Résultats de détermination de la concentration minimale inhibitrice par méthode de microplaque sur les souches microbiennes

Contrairement aux résultats obtenus par la méthode de diffusion sur disque, où *Aspergillus niger* n'a montré aucune sensibilité aux AgNPs (absence de halo d'inhibition), la méthode des CMI en microplaque a mis en évidence une inhibition significative. Les valeurs de CMI obtenues varient entre 0,220 ppm (Fmo) et 0,982 ppm (J), traduisant une réelle efficacité en milieu liquide. Ce contraste peut être attribué à une meilleure dispersion et interaction des nanoparticules dans les milieux homogènes,

comme l'ont suggéré Hassan et *al.* (2023), où la stabilité colloïdale augmente la biodisponibilité des AgNPs et améliore leur effet antifongique.

De même, *Candida albicans* a montré une sensibilité marquée en microplaque, avec des CMI allant de 0,313 ppm (FPc) à 0,474 ppm (J). Ces résultats confirment ceux obtenus par diffusion, en soulignant l'efficacité des extraits FPc, G et FMo. Plusieurs études (e.g., Al-Shabib et *al.*, 2018 ; Das et *al.*, 2022) ont souligné que la taille réduite, la charge de surface et la présence de biomolécules stabilisatrices influencent fortement l'activité antifongique des AgNPs, notamment contre les levures pathogènes.

III.3.5. Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence

L'analyse par souche montre une activité antibactérienne modérée à bonne des AgNPs, avec une efficacité plus marquée contre les bactéries Gram⁺, notamment *Staphylococcus aureus*, où FMo et FPc sont les plus actifs, bien que moins que la vancomycine. Contre les Gram⁻, les AgNPs présentent une activité homogène mais généralement inférieure aux antibiotiques standards : FMo, FPc et G se montrent actifs sur *P. aeruginosa*, *E. coli* et *K. pneumoniae*, avec FPc surpassant l'AMC contre cette dernière. En antifongique, toutes les AgNPs inhibent *Candida albicans* (jusqu'à 15 mm), bien que moins que l'éconazole, tandis qu'*Aspergillus niger* résiste totalement à tous les traitements, standards inclus. Ces résultats confirment une efficacité dépendante de la souche et de la nature végétale des AgNPs. (Tableau XI ; Figure 28).

En outre, les résultats de l'antibiogramme comparatif confirment l'efficacité modérée à bonne des AgNPs-FMo, FPc et G. Les bactéries à Gram positif, comme *S. aureus*, sont plus sensibles en raison de leur paroi riche en peptidoglycane et dépourvue de membrane externe, facilitant l'action des AgNPs. À l'inverse, les Gram négatif, dotées d'une membrane externe lipopolysaccharidique, sont plus résistantes, bien que certaines formulations d'AgNPs parviennent à franchir cette barrière. (Franci et *al.*, 2015)

Sur le plan antifongique, *Candida albicans* a répondu favorablement à l'ensemble des formulations d'AgNPs, bien que leur activité soit inférieure à celle de l'éconazole. En revanche, *Aspergillus niger* a montré une résistance complète, y compris face au traitement standard, probablement en raison de la complexité de sa paroi et de sa capacité sporulante (Lopez-Medina et *al.*, 2022).

Chapitre III : Résultats et discussions

Tableau XI : Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence

Souches microbiennes	Traitement de référence	Zone ATB/ATF (mm)	AgNPs J	AgNPs E	AgNPs FMo	AgNPs FPc	AgNPs G
<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomycin (VA) 30 µg/disc	35mm	12mm	12mm	20mm	18 mm	14mm
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Piperacilline (PI) 100 µg/disc	25mm	13mm	13mm	16mm	15mm	15mm
<i>Escherichia coli</i>	Amoxicilline/Ac. clavulanique (AMC) 30 µg/disc	22 mm	—	15mm	14mm	10 mm	13mm
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Amoxicilline/Ac. clavulanique (AMC) 30 µg/disc	14mm	—	13mm	14mm	15mm	10mm
<i>Candida albicans</i>	Éconazole 1%	30mn	15mm	15mm	15 mm	13mm	13mm
<i>Aspergillus niger</i>	Éconazole 1%	—	—	—	—	—	—

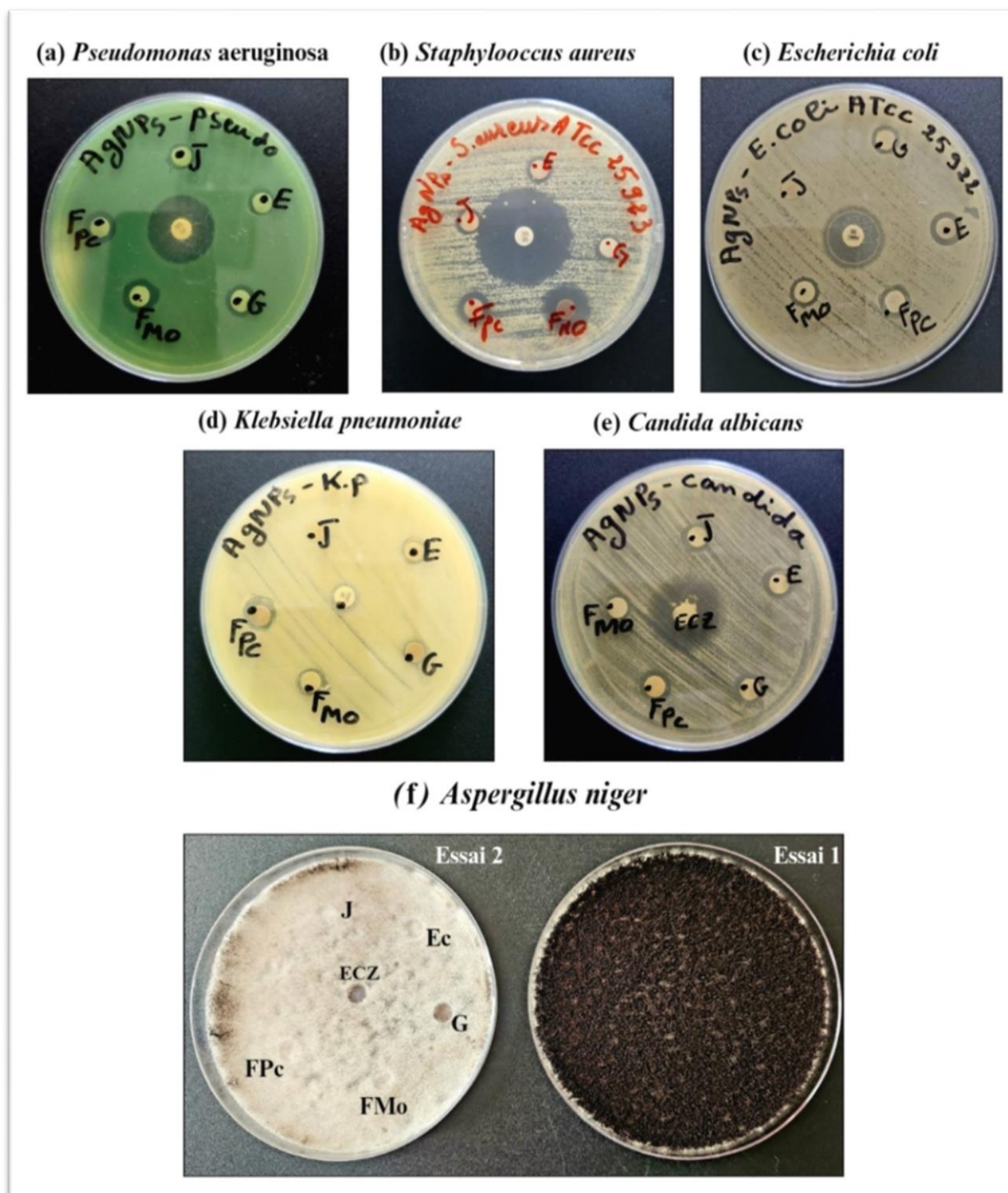


Figure 28 : Résultats d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AgNPs à leur CMI en comparaison avec les traitements de référence .

Conclusion 🎓

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans l'essor des nanobiotechnologies vertes, en mettant en lumière des procédés de synthèse écologiques, peu coûteux et efficaces pour produire des nanoparticules d'argent (AgNPs) actives. Il a démontré le potentiel des extraits de citron (*Citrus limon*) jus, écorces, feuilles et graines en tant qu'agents réducteurs et stabilisants dans la synthèse verte des AgNPs. L'optimisation des paramètres réactionnels, notamment le pH, la température, le temps de réaction et la concentration en AgNO₃, a permis d'identifier des conditions optimales : un milieu modérément basique (pH 8–10), une température de 60 °C, une durée de réaction comprise entre 30 et 60 minutes, ainsi qu'une concentration de 5 mM en AgNO₃. Ces conditions favorisent la formation de nanoparticules stables, homogènes et bien définies.

Les analyses de caractérisation ont confirmé la formation des AgNPs, avec des spectres UV-Vis typiques (pics SPR entre 425 et 445 nm), des potentiels zêta révélant une stabilité colloïdale variable selon l'extrait utilisé, des spectres FTIR mettant en évidence l'implication de divers groupes fonctionnels d'origine végétale, et des mesures DLS indiquant une meilleure monodispersité dans les extraits de feuilles et d'écorces. Parmi toutes les formulations, celles issues des feuilles traitées thermiquement, notamment par plaque chauffante, ont présenté les meilleures propriétés physicochimiques.

Par ailleurs, sur le plan biologique, l'activité antioxydante globale s'est révélée faible à modérée. Seules les nanoparticules issues des feuilles traitées par micro-ondes (AgNPs-FMo) ont affiché un taux d'inhibition supérieur à 50 % dans le test DPPH. En revanche, une activité antibactérienne marquée a été observée, en particulier pour les AgNPs-FPc et AgNPs-G, qui ont montré une efficacité significative contre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Klebsiella pneumoniae*, avec des CMI parfois inférieures à 0,5 ppm.

L'activité antifongique s'est révélée plus sélective, avec une forte inhibition de *Candida albicans*, notamment par les AgNPs-FPc, tandis que *Aspergillus niger* a présenté une résistance complète, soulignant l'importance du choix de la souche cible dans l'évaluation de l'efficacité.

Dans l'ensemble, cette étude confirme que la synthèse verte des nanoparticules d'argent à partir d'extraits de citron constitue une alternative durable, économique et prometteuse aux méthodes chimiques classiques. Les AgNPs biosynthétisées montrent un potentiel réel pour des applications biomédicales, notamment en tant qu'agents antimicrobiens.

Néanmoins, des recherches complémentaires restent nécessaires afin d'évaluer leur toxicité, leur biocompatibilité et leur stabilité à long terme. Les perspectives viseront également à optimiser les formulations, notamment en synergie avec des antibiotiques, et à approfondir la compréhension des mécanismes d'action des AgNPs, tant au niveau cellulaire que moléculaire, à travers des études *in vitro* et *in vivo*.

Annexe 🎓

Annexe 01 – Classification taxonomique des micro-organismes testés selon NCBI 2025

Micro-organisme	Domaine	Phylum	Classe	Ordre	Famille	Genre	Espèce	Description courte
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacterales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i>	Bactérie intestinale Gram –, pathogène opportuniste urinaire et digestif
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Bacille Gram –, infections nosocomiales, multi-résistant

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Bacillota</i>	<i>Bacilli</i>	<i>Bacillales</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>S. aureus</i>	Cocci Gram +, infections cutanées et systémiques y compris SARM
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Bacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i>	Bacille Gram –, encapsulé, pneumonies et infections urinaires
<i>Candida albicans</i>	<i>Eukaryota</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Candida</i>	<i>C. albicans</i>	Levure opportuniste, candidoses superficielles

								es et systémiques
<i>Aspergillus niger</i>	<i>Eukaryo ta</i>	<i>Ascomycota</i>	<i>Eurotiomycetes</i>	<i>Eurotiales</i>	<i>Aspergillaceae</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i>	Champigno n filamenteux , responsable de mycoses opportunist es et de contaminati on alimentaire

Note : Le phylum **Firmicutes** est désormais désigné **Bacillota** selon la mise à jour NCBI 2025.

Source : NCBI Taxonomy Browser, version 2025.

Annexe 02 – matériel de laboratoire et réactifs utilisés

1. Matériel de laboratoire

Verreries	Équipements	Accessoires
• Béchers (50, 100, 200, 500 et 1 000 mL) • Fioles jaugées (100 mL) • Entonnoirs (classique et Büchner) • Tubes à essai • Éprouvettes graduées (10 mL) • Verre de montre	• Agitateur magnétique • pH-mètre • Incubateur • Vortex • Pompe à vide • Spectrophotomètre UV-Visible (SHIMADZU UV-1900i).	• Barreaux magnétiques • Tiges de récupération • Micro-pipettes • Boîtes de Pétri • Écouvillons • Bec Bunsen • Parafilm • Papier filtre • Spatule

--	--	--

2. Réactifs

Synthèse	Antioxydants	Solvants
- Nitrate d'argent (AgNO_3) - Hydroxyde de sodium (NaOH)	2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) - Acide ascorbique (Vitamine C).	- Eau distillée - Éthanol

3. Milieu de culture

- Mueller-Hinton semi solide
- Mueller-Hinton liquide
- Gélose nutritive GN
- Sabouraud
- Potato Dextrose Agar PDA
- Potato Dextrose Broth PDB



Annexe 03 : Equipements de
Spectrophotomètre infrarouge à
FTIR-8400s)



laboratoire
transformée de Fourier (SHIMADZU

Spectrophotomètre Ultraviolet-visible (SHIMADZU UV-1900i).



Un analyseur de nanoparticules de la série HORIBA nanoPartica SZ-100V2

(DLS et potentiel zêta)



Balance à peser



Pompe à vide



PH-mètre (HANNA HI8424)

Annexe 04 : préparation des milieux de culture

• Préparation de milieu PDA :

• Dissoudre 39 g dans 1000ml d'eau distillée, porter à l'ébullition pour dissoudre complètement, stériliser par autoclavage à 15 min (121°) pendant 15 min. Si le milieu doit être utilisé pour la numération fongique, il peut être souhaitable de supprimer la croissance bactérienne. Cela peut être réalisé en ajoutant 1 ml d'acide lactique à 10 % pour chaque 100 ml de milieu stérilisé à 50 °C afin d'acidifier le pH à environ 3,5.

• Préparation du milieu MH :

• Dissolvez 38,0 grammes dans 1000 ml d'eau distillée. Chauffez jusqu'à ébullition pour dissoudre complètement le milieu. Stérilisez par autoclavage à 15 min (121 °C) pendant 15 minutes. Laissez refroidir à 45-50 °C. Mélangez bien, puis versez dans des boîtes de Petri stériles.

• Préparation de la gélose nutritive :

• Suspendre 28 g du produit dans 1000 ml d'eau purifiée ou distillée. Chauffez jusqu'à ébullition pour dissoudre complètement le milieu. Stérilisez par autoclavage à 15 livres de pression (121 °C) pendant 15 minutes. Laissez refroidir à 45-50 °C.

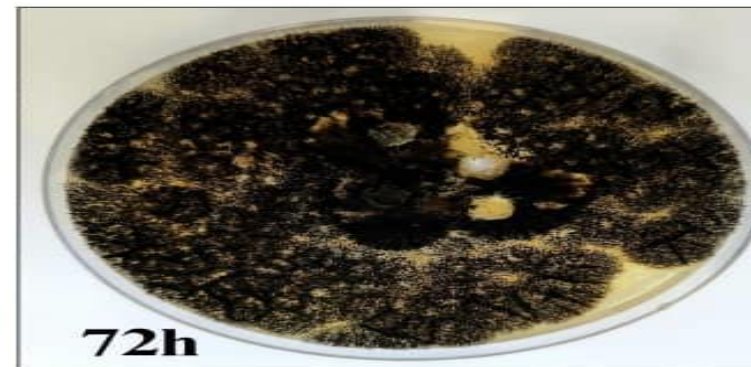
• Preparation du PDB (milieu liquid):

- Faire bouillir 200 g de pommes de terre pelées et coupées dans 500 ml d'eau pendant environ 30 minutes.
- Filtrer l'extrait à l'aide d'une gaze ou d'un tamis propre.
- Ajouter 20 g de glucose au filtrat.
- Compléter le volume à 1 litre avec de l'eau distillée.
- Ajuster le pH à 5,6 si nécessaire.
- Répartir dans des flacons ou tubes.
- Stériliser à 121 °C pendant 15-20 minutes.

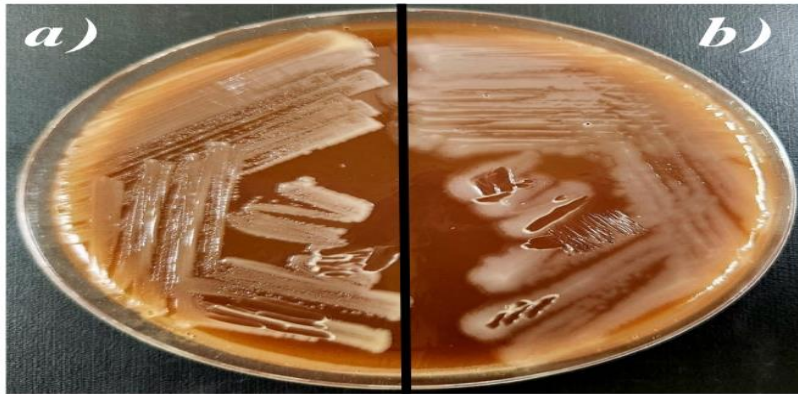
Annexe 05 : Aspect macroscopique des micro-organismes étudiés



Aspect macroscopiquee *Candida albicans* cultivé sur milieu PDA après 24h à 37°C .



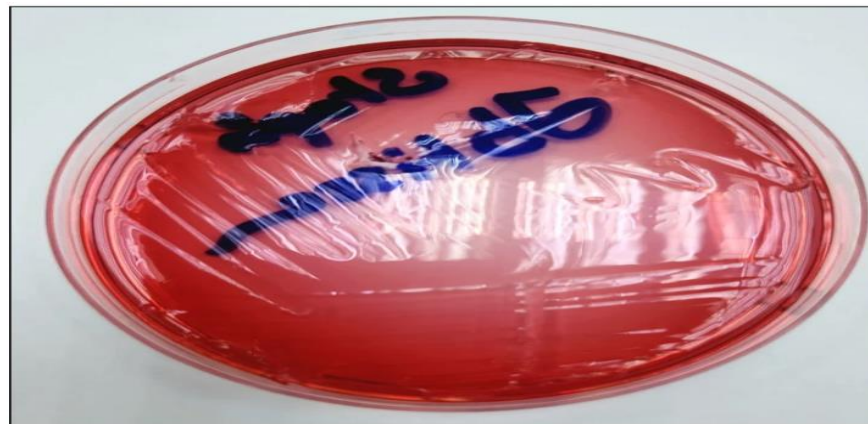
Aspect macroscopique d'*Aspergillus niger* cultivé sur milieu PDA après 24h et 72h à 25°C .



Aspect macroscopique de
a) *Pseudomonas aeruginosa*
b) *Escherichia coli*
cultivée sur gélose chocolat après
24 h à 37°C



Aspect macroscopique de
Klebsiella pneumoniae
cultivée sur gélose chapman
après 24h à 37°C



Aspect macroscopique de *Staphylococcus aureus* cultivée sur gélose
chapman après 24h à 37°C

Références bibliographique 🎓

Références bibliographique

- Ahmad Almatroudi. (2020). Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. *Open Life Sciences*, 15: 819–839.
- Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., & Reddy, P. S. (2013). The Influence of Silver Precursor Concentration on Size of Silver Nanoparticles Grown by Soft Chemical Route. *Research Journal of Physical Sciences*, 1(6), 1–6.
- Anita Dhaka, Suresh Chand Mali, Sheetal Sharma, Rohini Trivedi. (2023). Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. University College of Science, Mohanlal Sukhadia University, India.
- Ahmed, S., Saifullah, Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 1–7.
- Arokiyaraj, S., Arasu, M. V., Vincent, S., & Kim, K. H. (2017). Green synthesis of silver nanoparticles using *Rosa indica* petal extract and evaluation of their antibacterial activity. *Biotechnology Reports*, 13, 1–7.
- Bruna, T., Malondonado-Bravo, F., Jara, P., Caro, N. (2021). Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 22:7202.
- Burduşel, A. C., Gherasim, O., Grumezescu, A. M., Mogoantă, L., Fica, A., Andronescu, E. (2018). Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)*, 8(9):681.
- Baudino, S., Gambino, G., & Drago, S. (2011). Morphological and biochemical characterization of lemon (*Citrus limon*) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9555-9562.
- Bermejo, A., & Cano, A. (2012). Analysis of bioactive compounds in citrus fruits as a function of varietal and environmental factors: A review. *Food Science and Technology International*, 18(6), 565-584.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Basavegowda, N., & Lee, Y. R. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using *Aloe vera* leaf extract and evaluation of their antimicrobial activities: A green approach. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 4077–4085.
- Blois, M. A. R. S. D. E. N. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200.

Référence bibliographique

- Chauvel, R. (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie, Université Claude Bernard Lyon 1.
- Choi, J. C., Kang, Y., & Yoon, J. (2023). Optimisation de la synthèse de nanoparticules d'argent pour le traitement de l'eau. *Journal of Environmental Sciences*, 38(3), 407–419.
- Chernousova, S., & Epple, M. (2013). Silver as Antibacterial Agent: Ion, Nanoparticle, and Metal. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(6), 1636–1653.
- Das, S., Baker, S. N., & Prasad, B. L. V. (2022). Understanding the antifungal activity of biogenic silver nanoparticles against *Candida albicans*: Influence of size, zeta potential and surface chemistry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 214, 112460.
- Dastjerdi, R., & Montazer, M. (2010). A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 79(1), 5–18.
- Dhaka, A., Mali, S. C., Sharma, S., & Trivedi, R. (2023). Silver nanoparticles: synthesis, characterisation and biomedical applications. Laboratory of Plant Pathology, Department of Botany, University College of Science, Mohanlal Sukhadia University, Udaipur 313001, Rajasthan, India.
- Drake, P. L., & Hazelwood, K. J. (2005). Exposure-related health effects of silver and silver compounds: A review. *Annals of Occupational Hygiene*, 49(7), 575–585.
- Dipankar, C., & Murugan, S. (2012). The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98, 112–119.
- Daphedar, A., Vastrad, B. M., & Vastrad, C. M. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using plant extracts and their synergistic antibacterial activity with antibiotics. *Journal of Molecular Structure*, 1249, 131638.
- El-Naggar, M. E., Shaheen, T. I., Fouda, M. M. G., & Hebeish, A. A. (2020). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green chemistry approaches and their antimicrobial applications. *Journal of Advanced Research*, 24, 129–138.
- Emamifar, A., Kadivar, M., Shahedi, M., & Soleimani-Zad, S. (2011). Evaluation of nanocomposite packaging containing Ag and ZnO on shelf life of fresh orange juice. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11(4), 742–748.
- Faris, M. A., Abdeen, A., & Ali, H. M. (2021). Antioxidant and antimicrobial properties of silver nanoparticles: A review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21, 1–14.
- Feng, Q. L., Zhang, J., & Li, J. (2015). Regeneration and reuse of silver nanoparticles for antimicrobial applications. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 133, 31–37.

Référence bibliographique

- Galatage, S. T., Hebalkar, A. S., Dhobale, V. R., Mali, O. R., Kumbhar, S. V., Nikade, P. V., & Killedar, S. G. (2021). Silver Nanoparticles: Properties, Synthesis, Characterization, Applications and Future Trends. IntechOpen.
- González-Mas, M. C., Rambla, J. L., Alamar, M. C., Gomis, M. D., & Blázquez, M. A. (2019). Comparative analysis of peel and pulp volatile profiles in different varieties of citrus fruit. *Food Chemistry*, 292, 150-157.
- Hao, X., Yang, Z., & Chen, W. (2018). Magnetic nanoparticles for the treatment of cancer using hyperthermia and photothermal therapy. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 435.
- He, Y., Du, Z., Lv, H., Jia, Q., Tang, Z., Zheng, X., & Zhang, K. (2019). Facile green synthesis and applications of silver nanoparticles: a state-of-the-art review. *RSC Advances*, 9, 6644–6661.
- Henglein, A. (1993). Colloidal silver particles: Electrochemical synthesis. *The Journal of Physical Chemistry*, 97(6), 1206–1213.
- Hawa Jasni, A., Akbar Ali, A., Sagadevan, S., & Wahid, Z. (2021). Silver Nanoparticles in Various New Applications. IntechOpen.
- Hassan, M. E., El-Batal, A. I., Khalil, H. M., & Fadaly, R. H. (2023). Enhanced antifungal activity of biosynthesized silver nanoparticles in liquid medium against filamentous fungi: Role of dispersion and colloidal stability. *Journal of Nanobiotechnology*, 21(1), 147.
- Hulkoti, I. N., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes—A review. *Colloids and Surfaces B*, 121, 474–483.
- Hussain, A. I., Anwar, F., & Nigam, P. S. (2014). Essential oils from citrus species and their pharmacological properties. *Scientia Horticulturae*, 178, 164-182.
- Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*.
- Jiang, K., Li, Z., Liu, X., & Zhang, Y. (2017). Catalytic reduction of nitroaromatics by silver nanoparticles. *Journal of Catalysis*, 348, 129–136.
- Johnston, H. J., Hutchison, G. R., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., & Stone, V. (2010). A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 328–346.
- Kaiser, K. G., Delattre, V., Frost, V. J., Buck, G. W., Phu, J. V., Fernandez, T. G., & Pavel, I. E. (2023). Nanosilver: An Old Antibacterial Agent with Great Promise in the Fight against Antibiotic Resistance. *Antibiotics*, 12, 1264.
- Kamat, P. V., Kalyani, S. R., & Muralidharan, S. (2003). Silver nanoparticles as catalysts for photochemical reactions. *Journal of Physical Chemistry B*, 107(28), 6687–6698.

Référence bibliographique

- Keerawelle, B., & Chamara, A. (2019). Green Synthesis of Silver Nanoparticles. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 8(7), 100–111.
- Kumar, S. S. D., & Houreld, N. N. (2018). Silver nanoparticles: Synthesis and toxic effects. *Int. J. Bioassays*, 7(5), 5630–5638.
- Khalil, M. M. H., et al. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using olive leaf extract and its antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 7(6), 1131–1139.
- Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010). Les sources de nanoparticules. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 211–213.
- Lasmi, F., Hamitouche, H., Laribi-Habchi, H., & Boudechicha, A. (2024). Application of aqueous extract of red onion peel for the green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs): Characterization, assessment of antioxidant and antimicrobial activities. *Studies in Engineering and Exact Sciences*, 5(2), 01–30.
- Lee, Y.-J., Kim, T.-G., & Sung, Y.-M. (2006). Synthesis and characterization of silver nanoparticles in AOT microemulsion system. *Materials Chemistry and Physics*, 96(2–3), 417–421.
- Li, Q., Mahendra, S., Lyon, D. Y., Brunet, L., Liga, M. V., Li, D., & Alvarez, P. J. J. (2008). Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: Potential applications and implications. *Water Research*, 42(18), 4591–4602.
- Liu, H., Zhao, X., Qian, W., & Guo, Z. (2019). Stability and catalytic performance of silver nanoparticles supported on carbon-based materials for reduction reactions. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 19(2), 1039–1046.
- Li, S., Lo, C. Y., & Ho, C. T. (2020). Citrus flavonoids: Bioactivities and applications. *Food Science and Human Wellness*, 9(4), 334–343.
- Makarov, V. V., Love, A. J., Sinitsyna, O. V., Makarova, S. S., Yaminsky, I. V., Taliansky, M. E., & Kalinina, N. O. (2014). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Acta Naturae*, 6(1), 35–44.
- Mallikarjuna, K., Narasimha, G., Dillip, G. R., Praveen, B., Shreedhar, B., Lakshmi, C. S., Reddy, B. V. S., & Raju, B. D. P. (2011). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ocimum* leaf extract and their characterization. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 6(1), 181–186.
- Marambio-Jones, C., & Hoek, E. M. V. (2010). Antibacterial effects of silver nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531–1551.
- Muhammad, R., Sadaf, I., Rafique, M., Tahir, M. A., Shakir, H. A., & Arshad, M. (2016). A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272–1291.

Référence bibliographique

- Morton, J. F. (1987). *Fruits of Warm Climates*. Creative Resources Systems, Inc., 418 p.
- Muhammad, R., Sadaf, I., Rafique, M., Tahir, M. A., Shakir, H. A., & Arshad, M. (2016). A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272–1291.
- Nwachukwu, E. O., Olayanju, T. M., & Dada, A. O. (2014). Phytochemical composition and antimicrobial activity of Citrus limon leaves. *African Journal of Microbiology Research*, 8(2), 207-213.
- Nair, S., & Pradeep, T. (2009). Coated silver nanoparticles as catalysts. *Environmental Science & Technology*, 43(9), 3003–3009.
- Nasrollahzadeh M., Mahmoudi-Gom Y., Motahharifar N., et al., (2019).Recent Developments in the Plant-Mediated Green Synthesis of Ag-Based Nanoparticles for Environmental and Catalytic Applications ». *J Chem. Rec.* ; 19 :1-45. doi.org/ : 10.1002/tcr.201800202.
- Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. *Environmental Science & Technology*, 45(4), 1177–1183.
- Nunes, S. A. K., da Silva, G. C., & Oliveira, D. R. (2024). Bio-hybrid regeneration of silver nanoparticles for environmental applications. *Environmental Science & Technology*, 54(11), 7356–7363.
- Omar, S. H. (2010). Citrus limon (L.) Burm. f. as a source of medicinal properties. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(8), 553-558.
- Padhi, S., & Behera, A. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles. In *Agri-waste and microbes for sustainable nanomaterials*, 397–440.
- Punjabi, K., Choudhary, P., Samant, L., Mukherjee, S., Vaidya, S., & Chowdhary, A. (2015). Biosynthesis of Nanoparticles: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 30(1), 219–226.
- Prathna, T. C., Chandrasekaran, N., Raichur, A. M., & Mukherjee, A. (2011). Kinetic evolution studies of silver nanoparticles in a bio-based green synthesis process. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 377(1–3), 212–216.
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2020). 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*, 76(5), 1628–1638.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (2023). Klebsiella spp. As nosocomial pathogens : Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589–603.

Référence bibliographique

- Qu, X., Alvarez, P. J. J., & Li, Q. (2013). Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. *Water Research*, 47(12), 3931–3946.
- Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule–nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC Advances*, 9(5), 2673–2702.
- Rahman, M. A., Hossain, M. A., Molla, M. A., & Ali, S. (2016). Catalytic reduction of Cr(VI) to Cr(III) using silver nanoparticles for environmental remediation. *Journal of Hazardous Materials*, 318, 67–74.
- Rajeshkumar, S., & Bharath, L.V. (2017). Plant-mediated synthesis of silver nanoparticles. *Chemico-Biological Interactions*.
- Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83.
- Rai, M., Yadav, A., Gade, A., & Duran, N. (2016). Silver nanoparticles as a novel antimicrobial agent: A review. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(6), 1–12.
- Rai, M., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2021). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841–852.
- Rónavári, A., Igaz, N., Kónya, Z., & Pfeiffer, I. (2021). Synergistic antibacterial activity of silver nanoparticles and plant extracts: A review of the underlying mechanisms. *Nanomaterials*, 11(6), 1650. <https://doi.org/10.3390/nano11061650>
- Reyes-Estebanez, M., Ortega-Morales, B. O., Chan-Bacab, M., Granados-Echegoyen, C., Camacho-Chab, J. B., Pereañez-Sacarias, J. E., & Gaylarde, C. (2018). Antimicrobial engineered nanoparticles in the built cultural heritage context and their ecotoxicological impact on animals and plants: A brief review. *Heritage Science*, 6(1), 1–11.
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdon, E., & Baborun, T. (2011). Polyphenolic composition, vitamin C content, and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, 44(7), 2088-2099.
- Soh, K. S., & Lee, B. P. (2018). Pharmacological effects of citrus leaves in traditional medicine. *Pharmaceutical Biology*, 56(1), 268-276.
- S. Janardana Reddy. (2015). Silver nanoparticles - synthesis, applications and toxic effects. *International Journal of Bioassays*, 4(11), 4563–4573.
- Sang, H., & Jun, B. (2019). Silver Nanoparticles for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 865.
- Sajanlal, P. R., Sreeprasad, T. S., Samal, A. K., & Pradeep, T. (2011). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 11244–11254.

Référence bibliographique

- Smith, P. J., Liu, H., & Zhang, S. (2022). Green regeneration of silver nanoparticles for catalytic applications. *Journal of Materials Chemistry A*, 10(3), 1456–1463.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177–182.
- Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2019). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 12(3), 524.
- Tolaymat, T. M., El Badawy, A. M., Genaidy, A., Scheckel, K. G., Luxton, T. P., & Suidan, M. (2010). An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Science of the Total Environment*, 408(5), 999–1006.
- Tse, C., Zohdy, M. J., Ye, J. Y., O'Donnell, M., Lesniak, W., & Balogh, L. (2011). Enhanced optical breakdown in KB cells labeled with folate-targeted silver-dendrimer composite nanodevices. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(1), 97–106.
- Tucker, A. O., & L. A. T. (2015). *Citrus species of the world: taxonomy and utilization*. Springer. ISBN 978-1-4614-6435-8.
- Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3), 033001.
- Tran, Q. H., Nguyen, V. Q., & Le, A. T. (2018). Corrigendum: Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(1), 019501.
- Vardi, A., Lurie, S., & Ben-Gal, A. (2015). Citrus limon (L.) Burm. f. – A Review of the Genus Lemon. *Horticultural Reviews*, 42, 61-101.
- Vogt, C., Geyer, A., & Hämmerle, H. (2010). Immobilization of silver nanoparticles on solid supports for catalytic applications. *Catalysis Today*, 152(1–2), 8–13.
- Vijayaraghavan, K., & Ashokkumar, T. (2017). Plant-mediated biosynthesis of metallic nanoparticles : A review of literature, factors affecting synthesis, characterization techniques and applications. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), 4866–4883. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.09.026>
- Wang, X., Zhang, L., Liu, J., & Yang, L. (2018). Catalytic performance of silver nanoparticles in oxidation and reduction reactions. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 445, 121–128.

Référence bibliographique

- Wu, X., Liu, Q., Zhang, X., & Wang, L. (2018). Silver nanoparticles as a potential antioxidant in oxidative stress and its implication for human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 24–34.
- Xu, L., Wang, Y.-Y., Huang, J., Chen, C.-Y., Wang, Z.-X., & Xie, H. (2020). Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*, 10(20), 8996–9031.
- Yin, I. X., Zhang, J., Zhao, I. S., Mei, M. L., Li, Q., & Chu, C. H. (2020). The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2555–2562.
- Zhang, W., Xiao, S., & Ahn, D. U. (2013). Protein oxidation: Basic principles and implications for Meat Quality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(11), 1191–1201.
- Zhang, L., Wei, Y., Li, H., et al. (2016). Magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer therapy. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 12(4), 1319–1331.
- Zhang, Q., Wang, H., Li, Y., & Xu, X. (2020). Effect of nanoparticle size and shape on the catalytic performance of silver nanoparticles in oxidation reactions. *Nano Research*, 13(4), 945–955.
- Zhang, X.-F., Liu, Z.-G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534.
- Zhang, Y., Liu, Y., Yang, Z., & Li, W. (2016). In vitro antioxidant activities of silver nanoparticles and their impact on oxidative stress. *Journal of Nanoparticle Research*, 18, 121–129.
- Zhang, L. D., Wang, L., & Hu, X. (2023). Regeneration of silver nanoparticles for antimicrobial applications using electrochemical reduction. *Journal of Colloid and Interface Science*, 505, 523–530.

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET
POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique

UNIVERSITÉ DE BLIDA-1

Faculté de Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Sciences Biologiques



Mémoire

En Vue de l'Obtention du Diplôme

Master En Sciences biologiques

Option : Microbiologie

Intitulé du mémoire

**Évaluation des activités antimicrobienne et antioxydant des
nanoparticules d'argent à base des extraits du citron**

Présenté par :

BOULARAS Ayatelhouda

BOUREGAA Nouha

Membres de jurys :

Présidente	HAMAIDI. F	Professeur	USDB-1
Examinatrice	LOUNACI. L	MCB	USDB-1
Promotrice	Mme.MOHAMED MAHMOUD. F	MCA	USDB-1
Co-promoteur	Mr. BENNOUI Sid Ahmed	Doctorant	USDB-1

Année universitaire : 2024 /2025