

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Blida 1



Faculté des Sciences - Département de chimie
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
et de Biomolécules (LCSNBioM)



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

Spécialité : Chimie des Produits Naturels

**Synthèse Verte de Nanomatériaux à Base d'Argent : Caractérisation et
Détermination de l'Activité Antibactérienne**

Présenté par :

HABIB Chaima et MAHIOUT Imen

Devant le jury composé

N. SAOULA	Dr. de recherche	CDTA	Présidente
Z. ZEFFOUNI	MCB	Université de Blida 1	Examineur
M. El HATTAB	Professeur	Université de Blida 1	Promoteur

Blida, Juin 2025

Remerciements

La réalisation de ce travail a été rendue possible grâce à Dieu, le Tout-Puissant et le Miséricordieux, pour le courage, la volonté, la patience et la santé qu'Il nous a accordés tout au long de ces années d'études.

Nous exprimons également notre gratitude la plus sincère à l'attention du professeur **El Hattab**, dont l'accompagnement a été d'une rare générosité. Il a su nous guider avec attention, nous soutenir avec cœur et nous encourager avec une présence rassurante et profonde. Nous nous sommes sentis écoutés, compris et soutenus comme des enfants sous l'aile d'un père. Qu'Allah le récompense pour tout le bien qu'il nous a transmis.

Nous adressons toute notre gratitude à la présidente du jury, Dr **N. Saoula**, ainsi qu'à l'examinatrice, Dr **Z. Zeffouni**, pour avoir accepté de consacrer de leur temps à l'évaluation de notre travail. Leurs remarques pertinentes et leurs observations constructives témoignent de leur rigueur scientifique et contribueront sans aucun doute à enrichir notre réflexion. Nous les remercions sincèrement pour leur bienveillance et leur implication.

Un grand merci à la doctorante **Larouci Rania** pour son aide précieuse, ses conseils avisés et sa bonne humeur constante, qui ont rendu notre passage au laboratoire à la fois enrichissant et inoubliable. Qu'Allah la récompense pour sa générosité, lui accorde réussite dans sa vie et sa carrière

Nous souhaitons également à exprimer notre gratitude envers les ingénieurs du laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et de Biomolécules pour leur assistance bienveillante, leur soutien constant et leur gentillesse, qui ont créé un environnement de travail à la fois agréable et motivant.

Enfin, nous souhaitons remercier du fond du cœur notre famille, pilier de notre réussite. Leur amour inconditionnel, leur soutien indéfectible et leurs prières constantes ont été pour nous une source inestimable de force et de motivation. Sans eux, rien de tout cela n'aurait été possible.

DÉDICACES

Merci à moi-même. Ce travail est le fruit de mes nuits blanches, de mes efforts silencieux et de mon courage persistant. Merci, Chaima, d'avoir tenu bon, même quand tout semblait flou. Merci d'avoir cru en toi.

À ma chère mère, mon refuge, ma douceur, ma lumière. Celle qui a su transformer chaque silence en soutien, chaque regard en tendresse, chaque mot en courage. Maman, ton amour m'a donné des ailes. Sans toi, je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui. Je te dédie ce travail avec une gratitude infinie.

À mon père, mon roi, mon exemple, pilier de ma vie et source constante de force et de sagesse. Par ton soutien inébranlable et ta bienveillance, tu m'as guidé avec patience et amour. Ce travail, je te le dédie avec tout mon respect et ma profonde gratitude, en hommage à l'homme exceptionnel que tu es.

*À mon professeur, **M. El Hattab**, merci d'avoir été bien plus qu'un encadrant. Votre patience, vos conseils et votre soutien m'ont guidée tout au long de ce travail. Comme un père dans ce parcours, vous m'avez appris à avancer avec confiance. Vous avez cru en moi, même quand moi je doutais. Grâce à vous, j'ai pu aller jusqu'au bout. Ce mémoire se termine, mais tout ce que vous m'avez transmis restera avec moi. Merci du fond du cœur.*

*À mes frères **Oussama, Abdesselam, Djilali** et ma sœur **Amina**, mes premiers amis, mes racines. Vos rires, vos encouragements, même vos taquineries, m'ont tant apporté. Votre présence m'a donné de la force tout au long de ce parcours. Merci d'être là, dans ma vie et dans mon cœur.*

*À mes sœurs **Bouchra, Assma, Khouloud et Hayette** et Tati **Lila**, Vous avez été ma force douce dans les moments d'incertitude, un soutien sincère et silencieux. Merci du fond du cœur.*

*À mes trésors, **Imen, Aicha et Khadidja**, Vous n'êtes plus juste des amies, Vous êtes mes sœurs de cœur, Des âmes liées par la confiance. Avec vous, chaque instant devient lumière, Chaque difficulté, une force partagée. Merci d'être là, toujours, présentes dans chaque moment, dans chaque battement de vie. Une remerciement spéciale à **Adjér**, pour ta présence fidèle dans mes nuits blanches, quand le silence pesait et que ton soutien faisait toute la différence.*

*À **Rania**, ton intelligence, ta rigueur et ta passion ont illuminé notre projet. Tu es bien plus qu'une doctorante qui aide, tu es une source d'inspiration et une véritable sœur d'armes. Merci pour ta patience, ta confiance et ton engagement. Avec toi, chaque défi est devenu une victoire partagée.*

*Aux petits anges de la famille, **Anes, Adem, Djawed, Alaa, Meriem et Abdallah**, vos sourires ont illuminé mes journées. Vous êtes une source de joie pure. Merci mes petits cœurs.*

Habib Chaima

DÉDICACES

Ce travail est le fruit de mes efforts et de ma patience durant mes études. Je le dédie avec tout mon cœur à moi-même et à ceux qui m'ont toujours soutenu.

À mon père, qui a toujours été là pour moi, avec son amour, sa patience et ses encouragements. Merci d'avoir toujours cru en moi, même dans les moments difficiles. Ta présence m'a donné la force d'aller jusqu'au bout. Avec tout mon amour, je te remercie du fond du cœur. Je suis fière d'être ton enfant.

À ma mère, rahimaha Allah. Ton absence est immense, mais ton amour, ta force et tes valeurs vivent en moi chaque jour. Ce travail est le fruit de tout ce que tu m'as transmis. Je le dédie à toi, avec fierté, comme un reflet de ton courage et de ton amour éternel.

À mon frère Anis, et à mes petites sœurs Wissal, Lina et Amira, pour leur amour sincère, leur soutien précieux et leur présence réconfortante qui m'ont aidé à avancer, même dans les moments difficiles.

À Chaima, ma chère amie et partenaire de travail. Notre entente et notre collaboration ont été essentielles à notre succès. Je te remercie profondément pour ta présence et ton soutien. Nous avons bâti bien plus qu'un simple projet ; nous avons partagé une aventure unique et mémorable, nous avons partagé des moments précieux et inoubliables

Une spéciale dédicace à la doctorante Larouci Rania. Je te remercie du fond du cœur pour ton soutien sincère et ta présence rassurante. Tu as été d'un grand soutien, avec ta gentillesse et ta patience, comme celle d'une grande sœur, tout au long de ce parcours.

À mes chères amies Aïcha, Khadidja et Hadjer, Merci, du fond du cœur, pour votre présence constante, vos mots réconfortants, vos encouragements sincères et votre énergie positive. Vous avez été de véritables piliers dans cette aventure, me soutenant dans les moments de doute, me motivant dans les instants de fatigue, et partageant avec moi chaque petite victoire. Votre amitié est une richesse immense que je chéris profondément. Ce mémoire vous est dédié, Avec tout mon amour et une reconnaissance infinie

Mahiout Imen

RÉSUMÉ

La présente étude porte sur la synthèse verte des nanoparticules d'argent, en utilisant la fraction polaire extraite, par la méthode de Bligh & Dyer modifiée, à partir de l'extrait de margine.

L'analyse quantitative des polyphénols et des flavonoïdes totaux a révélé une teneur en composés phénoliques totaux (TPC) de 331,5 pour l'extrait brut et de 802,75 pour la fraction polaire, en mg Équivalents Acide Gallique par gramme d'extrait sec.

La teneur en flavonoïdes totaux est de 1,834 pour l'extrait brut et de 11,35 pour la fraction polaire, en mg Équivalents Quercétine par gramme d'extrait sec.

L'activité antioxydante, évaluée par la méthode du DPPH, a montré des valeurs de IC_{50} égale à 0,192 mg/ml et 0,048 mg/ml pour l'extrait d'acétate et la fraction polaire respectivement, indiquant une forte capacité antioxydante de cette dernière.

L'analyse de la fraction polaire par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM) a révélé 28 composés, parmi lesquels neuf ont été identifiés. L'ensemble des composés identifiés sont de nature phénolique, principalement de types C6 et C6-C2. Le composé majoritaire est le tyrosol. Une voie de biosynthèse basée sur le précurseur principal l'acide shikimique a été proposée pour expliquer la présence des différents composés phénoliques identifiés.

Les nanoparticules d'argent ont été synthétisées dans des conditions optimisées, en utilisant la fraction polaire comme agent réducteur et stabilisant. Leur caractérisation a été effectuée par spectrophotomètre UV-Visible avec une bande caractéristique autour de 435 nm, l'analyse FT-IR a révélé une large bande -OH dans la fraction polaire, atténuée après la synthèse, indiquant l'implication des polyphénols dans la réduction des ions Ag^+ . Une bande nouvelle à 435 cm^{-1} dans le spectre des AgNPs atteste de la formation de liaisons Ag-O.

L'analyse par DRX a montré la nature cristalline des nanoparticules d'argent synthétisées avec une structure cubique à face et un diamètre estimé à 42,19 nm.

L'analyse par DLS a révélé une taille moyenne des nanoparticules d'argent de 61,8 nm avec un indice de polydispersité de 1,3.

L'activité antibactérienne a été évaluée pour l'extrait d'acétate brut, la fraction polaire et les nanoparticules synthétisées contre quatre souches pathogènes. Les valeurs de CMI des AgNPs varient entre 0,156 mg/mL et 0,321 mg/mL, significativement supérieure à celle de la fraction polaire et l'extrait d'acétate, avec un rapport d'amélioration ($CMI_{fr-p}/CMI_{NP_{Ag}}$) atteignant jusqu'à 64 fois. Ces observations valident l'intérêt de leur utilisation en tant qu'agents antibactérienne d'origine naturelle.

Mots clés : Nanoparticules d'argent, Margine, fraction polaire, composés phénoliques, synthèse verte, activité antioxydante, activité antibactérienne.

ABSTRACT

This study focuses on the green synthesis of silver nanoparticles using the polar fraction extracted by the modified Bligh & Dyer method from margin extract. Quantitative analysis of polyphenols and total flavonoids revealed a total phenolic content (TPC) of 331,5 for the crude extract and 802,75 for the polar fraction, expressed in mg Gallic Acid Equivalent per gram of dry extract. The total flavonoid content is 1.834 for the crude extract and 11,35 for the polar fraction, expressed in mg Quercetin Equivalent per gram of dry extract. The antioxidant activity, evaluated by the DPPH method, showed IC_{50} values of 0,192 mg/mL and 0,048 mg/mL for the acetate extract and the polar fraction respectively, indicating a strong antioxidant capacity of the latter. The analysis of the polar fraction by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS) revealed 28 compounds, of which nine were identified. All identified compounds are phenolic in nature, mainly of types C_6 and C_6-C_2 . The major compound is tyrosol. A biosynthetic pathway based on the main precursor shikimic acid was proposed to explain the presence of the different identified phenolic compounds. Silver nanoparticles were synthesized under optimized conditions using the polar fraction as a reducing and stabilizing agent. Their characterization was performed by UV-Visible spectrophotometry with a characteristic band around 435 nm. FT-IR analysis revealed a broad $-OH$ band in the polar fraction, attenuated after synthesis, indicating the involvement of polyphenols in the reduction of Ag^+ ions. A new band at 435 cm^{-1} in the AgNPs spectrum confirms the formation of $Ag-O$ bonds.

XRD analysis of the silver nanoparticles showed their crystalline nature, with a face-centered cubic structure and an estimated diameter of 42,19 nm.

DLS analysis revealed an average particle size of 61,8 nm with a polydispersity index of 1.3.

Antibacterial activity was evaluated for the crude acetate extract, the polar fraction, and the synthesized nanoparticles against four pathogenic strains. MIC values of AgNPs ranged between 0,156 mg/mL and 0,321 mg/mL, significantly higher than those of the polar fraction and acetate extract, with an improvement ratio (CMIf-P/CMNPAg) reaching up to 64-fold. These findings support their potential use as natural antibacterial agents.

Keywords : Silver nanoparticles, Margine, polar fraction, phenolic compounds, green synthesis, antioxydant activity, antibacterial activity.

ملخص

تتناول هذه الدراسة التخليق الأخضر لجسيمات الفضة النانوية باستخدام الكسر القطبي المستخلص، وفقاً لطريقة Bligh & Dyer المعدلة، من مستخلص المارجين. أظهر التحليل الكمي للبوليفينولات والفلافونويدات الكلية محتوى من المركبات الفينولية الكلية (TPC) قدره 331,5 قدره للمستخلص الخام و802,75 للكسر القطبي، بوحدة ملغ مكافئ حمض الغاليك لكل غرام من المستخلص الجاف. بلغ محتوى الفلافونويدات الكلية 1,834 للمستخلص الخام و11,35 للكسر القطبي، بوحدة ملغ مكافئ كيرسيتين لكل غرام من المستخلص الجاف. أظهرت النشاطات المضادة للأكسدة، التي تم تقييمها بطريقة DPPH، قيم IC₅₀ تساوي 0,192 ملغ/مل و0,048 ملغ/مل للمستخلص الأسيتاتي والكسر القطبي على التوالي، مما يدل على قدرة عالية مضادة للأكسدة للكسر القطبي. كشف تحليل الكسر القطبي بواسطة الكروماتوغرافيا الغازية المقترنة بمطياف الكتلة (GC/MS) عن وجود 28 مركباً، تم تحديد 9 منها. جميع المركبات المحددة ذات طبيعة فينولية، من النوعين C6 و-C6-C2 بشكل رئيسي. المركب الرئيسي هو التيروسول. تم اقتراح مسار تخليقي يعتمد على حمض الشيكيميك كمركب أولي رئيسي لتفسير وجود هذه المركبات الفينولية. تم تخليق جسيمات الفضة النانوية في ظروف مثالية باستخدام الكسر القطبي كعامل اختزال وتثبيت. تم توصيفها بواسطة مطياف الأشعة فوق البنفسجية المرئية مع شريط مميز حول 435 نانومتر، كما كشف تحليل FT-IR عن شريط OH- واسع في الكسر القطبي، تم تخفيفه بعد التفاعل، مما يدل على تورط البوليفينولات في اختزال أيونات الفضة. Ag⁺ وظهرت شريط جديد عند 435 سم⁻¹ في طيف AgNPs، مما يؤكد تكوّن روابط Ag-O. أظهر تحليل حيود الأشعة السينية (XRD) للطبيعة البلورية لجسيمات الفضة النانوية هيكلًا مكعبًا مركزي الوجه وقطرًا مقدّرًا بـ 42,19 نانومتر. أظهر تحليل DLS متوسط حجم للجسيمات قدره 61,8 نانومتر ومعامل تشتت قدره 1,3. تم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا للمستخلص الخام الأسيتاتي، الكسر القطبي، والجسيمات النانوية المصنعة ضد أربع سلالات ممرضة. تراوحت قيم CMI لجسيمات الفضة النانوية بين 0,156 و0,321 ملغ/مل، وكانت أكثر فاعلية بكثير من الكسر القطبي والمستخلص الأسيتاتي، بنسبة تحسين (CMIf-P/CMNPag) وصلت إلى 64 مرة. تؤكد هذه النتائج أهمية استخدامها كعوامل مضادة للبكتيريا من أصل طبيعي.

الكلمات المفتاحية: جسيمات الفضة النانوية، المارجين، الكسر القطبي، المركبات الفينولية، التخليق الأخضر، النشاط المضاد للأكسدة، النشاط المضاد للبكتيريا.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	I
DÉDICACES.....	II
RÉSUMÉ.....	IV
ملخص.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTE DES FIGURES.....	VII
LISTE DES TABLEAUX.....	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
PARTIE 01 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	
Chapitre 01 : Généralités sur les nanoparticules.....	3
1. Définition.....	3
2. Types des Nanoparticules.....	4
2.1 Nanoparticules organiques.....	4
2.1.1 Nanoparticules polymères de type cœur-couronne.....	4
2.1.2 Nanoparticules d'Inspiration biologique.....	4
2.2 Nanoparticules à base de carbone.....	4
2.2.1 Graphène	4
2.2.2 Nanotubes de carbone	4
2.3 Nanoparticules inorganique.....	4
3. Classification des nanoparticules.....	6
4. Paramètres influençant la formation des nanoparticules.....	7
5. Importance des nanoparticules	8
6. Toxicité des nanoparticules	9
7. Caractérisation.....	10
7.1 Spectroscopie UV-visible.....	10
7.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)	10
7.3 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier	10
7.4 Diffraction des Rayons X (DRX).....	11
7.5 Microscope électronique à balayage (MEB).....	11
8 Nanoparticules d'argent	11

8.1	Définition.....	11
8.2	Propriétés des nanoparticules d'argent.....	12
Chapitre 02 : Méthodes de synthèse des nanoparticules		13
1	Introduction	13
2	Méthodes chimiques.....	15
3	Méthodes physiques.....	15
4	Synthèse verte.....	15
4.1	Plante.....	17
4.2	Bactéries.....	17
4.3	Champignons.....	17
4.4	Algues.....	17
5	Mécanisme de formation	18
6	Activités antioxydante et antibactérienne	19
6.1	Activités antioxydante.....	19
6.2	Activités antimicrobienne.....	19
Chapitre 03 : Généralités sur les margines.....		21
1	Définition.....	21
2	Extraction.....	21
3	Préparation extrait de margine	23
4	Propriétés physico-chimiques.....	23
PARTIE 02 : ÉTUDE EXPÉRIMENTALE		
1	Introduction.....	24
2	Origine et traitement de la margine.....	24
3	Matériel et réactif	24
3.1	Mesure du pH.....	24
3.2	Centrifugation.....	24
3.3	Spectrophotométrie UV-Visible.....	24
3.4	Lecteur Élisa	25
3.5	Réactifs utilisé.....	25
4	Procédure Expérimentale.....	26
5	Préparation des échantillons	27
5.1	Préparation de l'extrait de la margine.....	27
5.1.1	Rendement de l'extraction.....	27

5.2	Préparation de la fraction polaire par la méthode de Bligh & Dyer modifiée.....	28
5.2.1	Principe	28
5.2.2	Protocole.....	28
6	Analyses quantitatives des extraits.....	29
6.1	Détermination de la teneur en phénols totaux (TPC).....	29
6.1.1	Principe.....	29
6.1.2	Préparation de la série d'étalonnage.....	29
6.1.3	Préparation des extraits.....	30
6.2	Dosage des flavonoïdes totaux.....	30
6.2.1	Principe.....	30
6.2.2	Préparation des solutions.....	31
6.2.3	Préparation de la série d'étalonnage.....	31
6.2.4	Préparation des extraits.....	31
7	Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	32
8	Évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait et de la fraction polaire.....	33
8.1	Principe.....	33
8.2	Préparation des solutions.....	34
8.2.1	Solution de DPPH.....	34
8.2.2	Solution de l'acide ascorbique.....	34
8.2.3	Préparation de la série.....	34
9	Synthèse verte des nanoparticules d'argent et caractérisation.....	35
9.1	Expériences préliminaires.....	35
9.2	Synthèse dans les conditions optimales.....	35
9.3	Caractérisation des nanoparticules d'argent.....	36
9.3.1	Spectrophotomètre UV-Visible.....	36
9.3.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	37
9.3.3	Mesure de la taille des particules (DLS).....	38
9.4	Activité antibactérienne.....	38
9.4.1	Microorganismes testés.....	38
9.4.2	Préparation du milieu de culture.....	38
9.4.3	Préparation des précultures.....	39
9.4.4	Test de la CMI par micro dilution.....	39

PARTIE 03 : RÉSULTAT ET DISCUSSION

1	Caractéristiques organoleptiques des échantillons.....	40
2	Rendement d'extraction.....	40
3	Analyse quantitative des extrait.....	40
3.1	Teneur en composé phénolique totaux (TPC).....	40
3.2	Teneur en flavonoïdes totaux.....	42
4	Activité antioxydante.....	43
5	Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)...	45
6	Synthèse des nanoparticules d'argent.....	49
6.1	Caractérisation.....	50
6.1.1	UV-Visible.....	50
6.1.2	Spectrophotomètre FT-IR.....	51
6.1.3	Diffraction des rayons X	52
6.1.4	Diffusion Dynamique de la Lumière (DLS).....	53
6.2	Activité antibactérienne.....	53
6.2.1	Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate	53
6.2.2	Activité antibactérienne de la fraction polaire.....	53
6.2.3	Activité antibactérienne des nanoparticules.....	54
6.2.4	Evaluation comparative de l'activité antibactérienne entre la fraction polaire et les nanoparticules d'argent	54
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	59
	RÉFÉRENCES.....	61
	ANNEXES.....	71

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Différents types des nanoparticules.....	5
Figure 2 :	Distribution des produits contenant des nanoparticules en fonction de leurs domaines d'application.....	8
Figure 3 :	Déférentes Méthodes de Synthèse des Nanoparticules.....	14
Figure 4 :	Synthèse verte des NPs métallique provenant différents organismes Vivants.....	16
Figure 5 :	Mécanisme de formation des nanoparticules métallique.....	18
Figure 6 :	Principaux systèmes d'extraction de l'huile d'olive.....	22
Figure 7 :	Diagramme général de la procédure expérimentale des nanoparticules.....	26
Figure 8 :	Extraction liquide-liquide.....	27
Figure 9 :	Extrait d'acétate d'éthyle.....	27
Figure 10 :	Agitation par vortex.....	28
Figure 11 :	Extraction de la fraction polaire	28
Figure 12 :	Série d'étalonnage de l'acide gallique.....	30
Figure 13 :	Série d'étalonnage de la quercétine.....	32
Figure 14 :	Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH.....	33
Figure 15 :	Résultat de l'activité antioxydante.....	35
Figure 16 :	Montage de la synthèse des nanoparticules.....	36
Figure 17 :	Spectrophotomètre UV-Visible.....	36
Figure 18 :	Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier-ATR.....	37
Figure 19 :	Préparation de la préculture.....	39
Figure 20 :	Variation de l'absorbance d'acide gallique en fonction de la concentration.....	41
Figure 21 :	Coloration de l'extrait par le réactif de F-C.....	41
Figure 22 :	Solutions de l'acide gallique avec le réactif de F-C à différentes concentration.....	41
Figure 23 :	Variation de l'absorbance de Quercétine en fonction de la concentration.....	42
Figure 24 :	Variation de pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique en fonction de la concentration.....	43
Figure 25 :	Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait d'acétate et la fraction polaire en fonction de la concentration.....	44
Figure 26 :	Interconnexion des voies de biosynthèse des composé chimiques présentes dans la fraction polaire.....	48
Figure 27 :	Différents essaie de la synthèse des nanoparticules.....	49
Figure 28 :	Etape de l'ajout de NaOH	49
Figure 29 :	Milieu réactionnel des nanoparticules après centrifugeuse.....	50

Figure 30 :	Nanoparticules d'argent.....	50
Figure 31 :	Spectres UV-Visible des nanoparticules d'argent.....	50
Figure 32 :	Spectres FTIR de la fraction polaire et des nanoparticules d'argent	51
Figure 33 :	Spectre de diffraction des rayons X des nanoparticules d'argent.....	52
Figure 34	Profil DLS de la distribution de taille des nanoparticules d'argent synthétisées....	53
Figure 35 :	Microplaque illustrant l'activité antibactérienne sur les différente souches	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Classification des nanoparticules.....	6
Tableau 2 :	Caractéristique des nanoparticules d’argent.....	12
Tableau 3 :	Principales propriétés physico-chimiques de caractérisation de la margine.....	23
Tableau 4 :	Souches bactérienne utilisées.....	38
Tableau 5 :	Caractéristiques organoleptiques des échantillons.....	40
Tableau 6 :	Composition chimique de la fraction polaire de la margine.....	45
Tableau 7 :	Activité antibactérienne de l’extrait d’acétate, la fraction polaire et des nanoparticules (CMI en mg/ml)	54

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Å :	Angström ($1 \text{ Å} = 10^{-9} \text{ m}$)
ADN :	Acide désoxyribonucléique
Ag :	Argent
AlCl ₃ :	Chlorure d'Aluminium
ATCC :	Américain Type Culture Collection
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
Cu :	Cuivre
DBO ₅ :	Demande Biochimique en Oxygène
DCO :	Demande Chimique en Oxygène
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
DPPH :	2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EAG :	Equivalents Acide Gallique
EQ :	Equivalents Quercétine
F-C :	Folin-Ciocalteu
4-HPAA :	4-hydroxy phényl acétate
4-HPP :	4-hydroxy phényle pyruvate
IC ₅₀ :	Concentration inhibitrice, à laquelle le radical est réduit de 50%
KBr :	Bromure de potassium
LB :	Milieu Luria-Bertani
Na ₂ CO ₃ :	Carbonate de sodium
NADH :	Nicotinamide adénine dinucléotide
NaOH :	Hydroxyde de sodium
NPs :	Nanoparticules
pH :	Potentiel d'Hydrogène
PI :	Pourcentage d'Inhibition
PEP :	Phosphoénol pyruvate
ROS :	Espèces Réactives de l'Oxygène
SPR :	Résonance Plasmonique de Surface
TFC :	Teneurs en flavonoïde totaux
TPC :	Teneur en phénols totaux
Zn :	Zinc

I. Introduction générale

La nanotechnologie est un domaine scientifique qui se concentre sur la fabrication et l'utilisation de matériaux, dispositifs et systèmes à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire à des dimensions inférieures à 100 nanomètres. À cette échelle, les propriétés des matériaux changent par rapport à celles des mêmes matériaux à une échelle plus grande. Ces changements peuvent concerner des caractéristiques comme la résistance, la conductivité électrique, ou encore la réactivité chimique [1].

Les nanomatériaux peuvent être fabriqués à partir de divers types de substances, notamment des métaux, des céramiques, des polymères, des carbonates, ou des silicates. Les nanoparticules de métal, par exemple, sont souvent utilisées dans des applications catalytiques, dans la médecine pour la délivrance ciblée de médicaments, ou dans des matériaux composites légers et résistants [2]. D'autres types de nanomatériaux, comme les nanotubes de carbone ou les nanoparticules d'argent, sont utilisés dans des domaines comme l'électronique, la détection ou la purification de l'eau [3].

Grâce à leur taille extrêmement petite, ces matériaux présentent des propriétés uniques qui peuvent être exploitées dans de nombreux secteurs, de la médecine à l'électronique, en passant par l'environnement. Cette diversité de propriétés ouvre la voie à des innovations technologiques et scientifiques importantes [2].

La synthèse des nanoparticules (NPs) repose sur différentes méthodes physiques et chimiques. Cependant, ces méthodes de production sont généralement coûteuses, à forte intensité de main-d'œuvre et potentiellement dangereuses pour l'environnement et les organismes vivants [4].

Le développement de méthodes de synthèse de nanoparticules respectueuses de l'environnement, et donc non toxiques, s'avère de plus en plus nécessaire. Les travaux de recherche menés dans le domaine des matériaux ont abouti à la mise au point de méthodes alternatives, moins nocives, telles que l'utilisation d'extraits végétaux [5].

Dans ce contexte, la margine, un sous-produit liquide issu de l'extraction d'huile d'olive, riche en composés phénoliques, constitue une ressource intéressante. Elle peut être utilisée à la fois comme agent réducteur et comme stabilisant dans la synthèse de nanoparticules métalliques, notamment d'argent. Cette approche permet de valoriser un déchet agroalimentaire tout en réduisant l'impact environnemental de la synthèse [6].

Ainsi, dans le cadre de cette étude, nous nous sommes intéressés à la problématique suivante :
Peut-on utiliser la fraction polaire de la margine comme agent réducteur et stabilisant dans une approche de synthèse verte de nanoparticules d'argent, tout en assurant une efficacité comparable aux méthodes conventionnelles et en valorisant durablement ce sous-produit agro-industriel ?

La présente étude est structurée en trois parties principales :

- La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique qui comprend trois chapitres :

Le premier chapitre porte sur les généralités concernant les nanoparticules, en abordant leurs définitions, classifications et principales propriétés.

Le deuxième chapitre traite des différentes méthodes de synthèse des nanoparticules, en mettant en évidence les approches physiques, chimiques et vertes.

Le troisième chapitre est consacré aux généralités sur la margine, notamment sa composition, ses sources et sa méthode d'extraction.

- La deuxième partie concerne la partie expérimentale. Elle expose en détail les équipements utilisés ainsi que les protocoles utilisés pour réaliser les différentes étapes expérimentales.
- La troisième partie est dédiée à l'interprétation et à la discussion des résultats obtenus au cours de l'étude.

Nous terminons cette étude par une conclusion générale.

PARTIE 01
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 01 : Généralités sur les nanoparticules

1. Définition

Les nanoparticules sont des particules extrêmement petites, dont la taille est comprise entre 1 et 100 nanomètres. À cette échelle, elles se situent à la frontière entre le monde atomique, moléculaire et le monde macroscopique. Leur petite taille confère des propriétés uniques différentes de celles des matériaux à plus grande échelle. Ces propriétés incluent une surface spécifique très élevée, des comportements physiques inhabituels, comme des effets quantiques, et une réactivité chimique accrue [7].

Les nanoparticules peuvent être naturelles produites par l'activité volcanique, les réactions de photosynthèse ou encore l'activité marine. On peut en retrouver dans les poussières désertiques.

Les nanoparticules peuvent être artificielles sont produites intentionnellement à l'échelle industrielle par l'homme. À l'aide de différents matériaux tels que des métaux (Or, Argent ou Zinc), des oxydes métalliques (Oxyde de zinc, Dioxyde de titane), des polymères et des lipides.

Les nanoparticules peuvent également être accidentelles, résultant de procédés thermiques tels que les feux de bois, les gaz d'échappement des véhicules ou freinage [8].

Elles sont de forme sphérique, tubulaire, ou encore irrégulière, selon leur méthode de fabrication et leur utilisation finale. La morphologie des nanoparticules peut également influencer leur toxicité, deux nanoparticules de même surface mais de formes différentes peuvent avoir une activité bactéricide différente [9].

Leur importance réside dans leurs propriétés exceptionnelles :

- **Grande surface spécifique** : Plus elles sont petites, plus leur surface disponible pour interagir avec d'autres molécules est importante, ce qui améliore leur réactivité chimique.
- **Effets optiques uniques** : Elles peuvent interagir avec la lumière de manière spécifique, ce qui les rend utiles dans des applications comme les capteurs ou les écrans.
- **Propriétés mécaniques et électriques améliorées** : À l'échelle nanométrique, certains matériaux deviennent plus solides, plus flexibles, ou même conducteurs d'électricité.

Les nanoparticules ne sont pas simplement des versions miniatures de matériaux classiques, elles sont des outils révolutionnaires dotés de propriétés inédites, offrant des solutions innovantes pour répondre aux défis technologiques, environnementaux et médicaux de notre époque [10].

2. Types des Nanoparticules

2.1 Nanoparticules organiques

2.1.1 Nanoparticules polymères de type cœur-couronne

Les premières nanoparticules polymériques ont été développées par Couvreur dans les années 1980. Différents polymères ont ensuite été utilisés avec succès pour former des nanoparticules. Elles sont composées de trois éléments : une enveloppe externe (polymère qui confère leur stabilité aux composés chimiques constituant l'enveloppe interne), une enveloppe interne (qui peut être constituée de molécules résistant à l'eau) et le noyau central, qui contient des agents antimicrobiens ou des médicaments anticancéreux [11].

2.1.2 Nanoparticules d'Inspiration biologique

Elles sont très diversifiées mais regroupent des structures dans lesquelles une substance biologique est encapsulée, emprisonnée ou absorbée à la surface, formée à partir de composants naturels comme les lipides, les protéines ou les sucres. Parmi les exemples les plus courants figurent les liposomes (à base de lipides), les nanoparticules d'albumine (protéiques) et celles à base de chitosane ou d'alginate (polysaccharides) [12].

2.2 Nanoparticules à base de carbone

2.2.1 Graphène

Elles se composent d'une seule couche d'atomes de carbone reliés par des liaisons covalentes. Ces atomes forment une structure en nid d'abeille d'une finesse remarquable. Elles possèdent une résistance à la traction exceptionnellement élevée. De plus, elles sont un excellent conducteur d'électricité et de chaleur, mieux que presque toutes les autres substances sur terre [13].

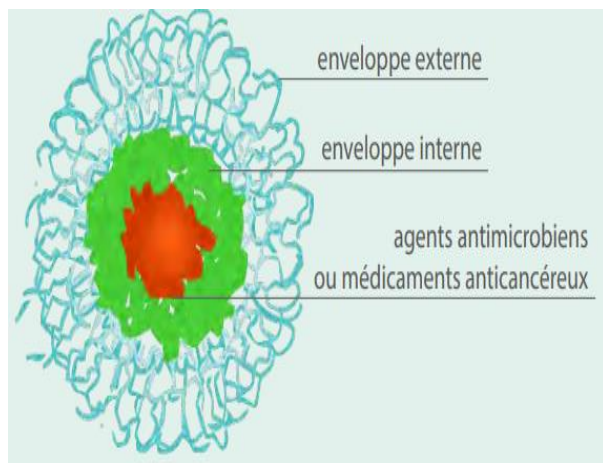
2.2.2 Nanotubes de carbone

Ce sont des structures creuses en forme de tube, composées d'atomes de carbone liés entre eux. Ils se distinguent par leur diamètre nanométrique et leur longueur impressionnante entre 0,4 nm et 40 nm [14].

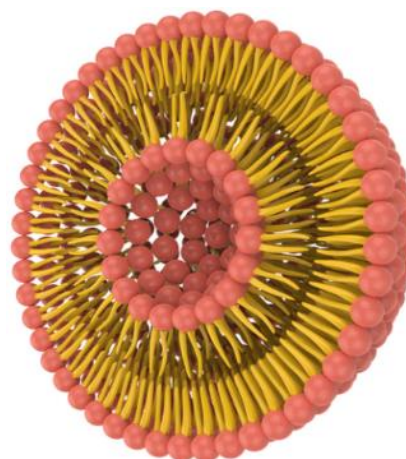
2.3 Nanoparticules inorganiques

Elles ont la même structure de base que les NPs organiques, avec un noyau aux propriétés fluorescentes, magnétiques ou optiques et une couche protectrice organique en surface. À cette pellicule de surface peuvent être attachées des molécules vectrices.

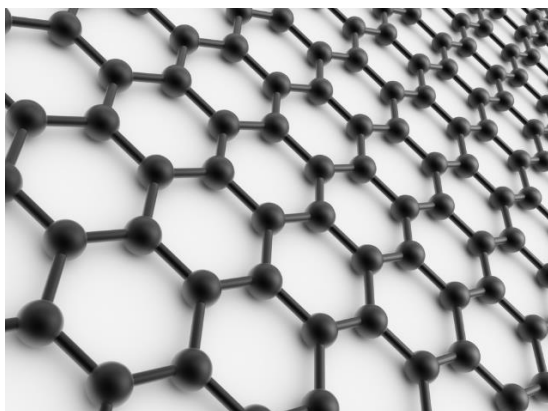
Par exemple, les Ag NPs sont célèbres pour leurs effets antimicrobiens, tandis que les Au NPs se distinguent par leurs propriétés optiques et électriques impressionnantes [15].



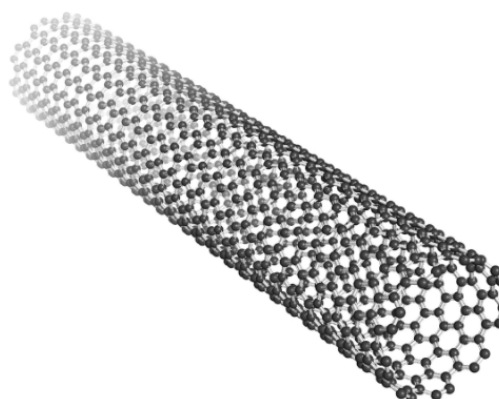
NPs polymère



NPs d'inspiration biologique



NPs de graphène



Nano tube de carbone

Figure 1 : Différents types des nanoparticules

3. Classification des nanoparticules

Les nanoparticules sont classées en fonction de leur forme d'utilisation, leur composition chimique et leurs sources [16], selon le tableau 1.

Tableau 1 : Classification des nanoparticules

Forme d'utilisation	Composition chimique	Source
Matériaux de dimension 0 Matériaux sous forme dispersée, aléatoire ou organisée, comme dans les cristaux colloïdaux pour l'optique ou les fluides magnétique	Matériaux à base de carbone Matériaux à base de carbone qui ont soit une forme sphérique ou tubulaire	Origine naturelle Biologique (ADN, Virus, bactéries, minérales ou environnementale. La fraction fine du sable de désert, les fumées originaires d'activité volcanique, feux de forêt et certaines poussières atmosphériques.
Matériaux de dimension 1 Matériaux sous forme de nano fils ou de nanotubes.	Matériaux à base de métaux Matériaux ayant un élément chimique métallique.	Origine humaine Sont des nanomatériaux fabriqués dans un but d'application technologique (noir de carbone, fumée de silice, fumée d'huile, le « smog » et les particules Diesel
Matériaux de dimension 2 Matériaux sous forme de couche mince, comme dans les dépôts d'agrégats ou de revêtements épais obtenus par projection ou voie électrochimique.	Matériaux composites Matériaux résultant d'une combinaison entre des NPs et un autre matériau à la nano-échelle.	/
Matériaux de dimension 3 Matériaux sous forme compacte, comme dans les céramiques et les métaux nanostructures.	Dendrimères Polymères assembles de façon intérieure vide	/

4. Paramètres influençant la formation des nanoparticules

a. Concentration des réactifs

- Une forte concentration favorise la nucléation rapide, produisant des nanoparticules plus petites, mais peuvent accélérer l'agglomération.
- Une faible concentration permet une croissance contrôlée, aboutissant à des particules plus grandes [17].

b. Température

- Une température élevée favorise une cinétique de réaction rapide, conduisant à une nucléation plus rapide et augmente le taux de réduction et des particules plus petites et plus uniformes.
- Une température basse favorise une croissance lente et peut conduire à une agrégation et une polydispersité [18].

c. Temps de réaction

- Un temps court limite la croissance des particules, résultant en de petites tailles.
- Un temps prolongé favorise l'agglomération et la croissance des nanoparticules [3].

d. pH du milieu

- Le pH influence la solubilité des précurseurs métalliques et les réactions de réduction.
- En milieu acide : Formation rapide mais parfois instabilité des particules (peut provoquer des agrégation).
- En milieu basique : Croissance plus lente, formation des nanoparticules plus petites et donnant des nanoparticules plus stables [5].

e. Agents stabilisants

- Les nanoparticules ont tendance à s'agglomérer en raison de leurs forces de surface élevées.
- Des stabilisants (ex. polymères, protéines, surfactants) sont utilisés pour empêcher cette agglomération et stabiliser les nanoparticules en solution [19].

f. Source du précurseur métallique

- Différents sels métalliques (chlorures, nitrates, sulfates) influencent la morphologie et la structure cristalline des nanoparticules [20].

g. Atmosphère de réaction

- La présence d'une atmosphère réductrice (comme hydrogène) ou oxydante (comme l'oxygène) affecte la composition chimique et la stabilité des nanoparticules [21].

5. Importance des nanoparticules

Les nanoparticules jouent un rôle essentiel dans de nombreux domaines en raison de leurs petites tailles et de leurs caractéristiques physiques et chimiques particulières, telles qu'une grande surface spécifique et une réactivité accrue.

Dans le cadre de la bioréhabilitation des milieux pollués, les nanoparticules ont fait l'objet d'études approfondies quant à leur capacité à éliminer les polluants environnementaux.

Ainsi, selon une étude menée par Zhuang et Gentry en 2011 [22], les nanoparticules sont susceptibles d'agir sur des métaux lourds présents dans l'eau ou des contaminants organiques du sol. À titre d'illustration, les nanoparticules d'argent ont la capacité de dégrader avec efficacité certains polluants, tels que les colorants et composés organiques présents dans les eaux usées.

Les nanoparticules sont utilisées comme catalyseurs dans diverses réactions chimiques, notamment dans la production de biocarburants ou dans des processus de remédiation environnementale. Elles sont également employées pour catalyser la conversion de la biomasse en carburants tels que l'éthanol ou le biodiesel. À titre d'illustration, les nanoparticules de platine ont fait l'objet d'une exploration pour une utilisation dans la production de biocarburants, en raison de leur capacité avérée à catalyser la conversion de la biomasse en carburants [23].

Ces nanoparticules peuvent être employées dans des contextes biomédicaux, notamment dans le traitement du cancer [24], l'imagerie biologique [25], la détection chimique et l'administration de médicaments.

Elles ont la capacité d'administrer des médicaments à des zones corporelles spécifiques, permettant ainsi un traitement plus ciblé et plus efficace. À titre d'illustration, les nanoparticules d'argent ont été explorées pour une utilisation dans l'administration de médicaments en raison de leur stabilité et de leur capacité à s'accumuler dans certains types de tumeurs cancéreuses [26].

Les nanoparticules d'oxyde de zinc ont également fait l'objet d'explorations pour l'administration de médicaments, en raison de leur capacité à cibler sélectivement les cellules cancéreuses [27].

Il a été démontré que les Cu NPs présentent des propriétés antimicrobiennes et sont explorées pour l'administration de médicaments afin de traiter les infections bactériennes [28].

Les nanoparticules ont la capacité d'être utilisées en tant qu'agents d'imagerie afin d'aider à visualiser des zones corporelles spécifiques. Par exemple, les nanoparticules d'oxyde de fer ont été employées en tant qu'agents de contraste d'imagerie par résonance magnétique (IRM) pour faciliter la visualisation des tissus et des organes.

Elle a un intérêt particulier porté sur les propriétés antimicrobiennes de certaines nanoparticules, telles que les nanoparticules d'argent (Ag NPs) et les nanoparticules de cuivre (Cu NPs). Ces dernières sont en effet étudiées pour une potentielle utilisation dans une variété de produits médicaux, tels que les pansements et les dispositifs médicaux [29].

Les nanoparticules ont la capacité de détecter et d'éliminer les agents pathogènes dans les produits alimentaires. Cette propriété permet d'améliorer la sécurité alimentaire et de réduire le risque de maladies d'origine alimentaire. Les nanoparticules peuvent également jouer un rôle dans la purification de l'eau d'irrigation, contribuant ainsi à la réduction du risque de contamination des cultures et à l'amélioration de leur rendement [29].

Elles ont la capacité d'accroître l'efficacité et les performances des opérations de transformation des aliments, à l'instar du broyage, du mélange et du séchage. Également, les nanoparticules d'argent ont été employées comme agent antimicrobien naturel dans les opérations de transformation des aliments, contribuant à la prévention de la croissance des bactéries et d'autres micro-organismes [30].

En outre, les NPs sont utilisées pour l'optimisation des performances des matériaux employés dans les emballages alimentaires, les rendant plus résistants aux polluants tels que l'humidité et les gaz.

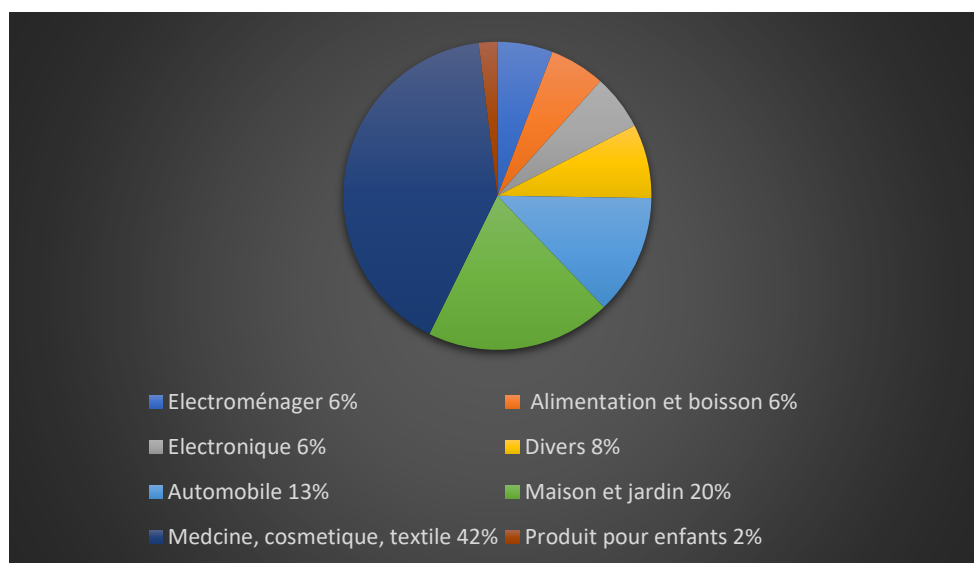


Figure 2 : Distribution des produits contenant des nanoparticules en fonction de leurs domaines d'application

6. Toxicité des nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) présentent une toxicité multifactorielle, étroitement liée à leurs caractéristiques physico-chimiques telles que la taille, la forme, la charge de surface, la solubilité ou encore leur nature chimique. Une des voies majeures de toxicité est le stress oxydatif, causé par la génération excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), entraînant des réactions inflammatoires et, dans certains cas, la mort cellulaire programmée (apoptose) [31]. Ensuite, leur petite taille leur permet de franchir les barrières physiologiques, comme la barrière hémato-encéphalique, ce qui renforce leur toxicité systémique. De plus, certaines nanoparticules peuvent s'accumuler dans les tissus, provoquer des troubles respiratoires, rénaux ou neurologiques, altérer l'ADN en causant des mutations, et perturber les fonctions cellulaires en interagissant avec les protéines. Certaines nanoparticules métalliques, comme celles à base de cuivre, ont également montré des effets toxiques aigus *in vivo*, entraînant des lésions au niveau des organes chez l'animal [32].

Sur le plan environnemental, la toxicité écologique des nanoparticules est également préoccupante. Libérées dans les milieux aquatiques et terrestres, elles interfèrent avec les microorganismes, les plantes et les animaux, perturbant des fonctions écologiques essentielles comme la photosynthèse, la fixation de l'azote ou la biodégradation. Ces effets ont été observés notamment chez les bactéries du sol et les organismes aquatiques, menaçant ainsi la biodiversité [33].

Face à ces dangers, plusieurs méthodes de traitement ont été développées. Ainsi, la filtration par membranes fines, l'adsorption sur charbon actif ou encore la bioremédiation par des plantes ou micro-organismes permettent de piéger ou dégrader ces particules dans les milieux contaminés. Par ailleurs, dans l'organisme, leur élimination reste partielle, ce qui pousse les chercheurs à proposer des agents chélateurs pour faciliter leur excrétion, ou des antioxydants pour réduire leur toxicité [32]. Ensuite, une autre approche consiste à modifier la surface des nanoparticules : des revêtements en silice ou en polymères peuvent limiter la libération d'ions métalliques et la formation de radicaux libres. Le revêtement par polyéthylène glycol (PEG) est également utilisé pour masquer les nanoparticules au système immunitaire, bien qu'il puisse provoquer des réactions allergiques. En alternative, des nanoparticules enrobées de membranes de globules rouges offrent un camouflage plus sûr et moins immunogène. Enfin, pour les nanoparticules naturelles ou accidentelles, il est recommandé de limiter l'exposition grâce à des antioxydants ou à des équipements de protection, comme les masques, afin de réduire les risques pour la santé [34].

7. Caractérisation

7.1 Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie UV-visible est une technique d'analyse qui permet de mesurer la quantité de lumière absorbée par un échantillon à différentes longueurs d'onde, situées dans les domaines de l'ultraviolet (200-400 nm), du visible (400-750 nm) [35]. Lorsqu'une substance absorbe cette lumière, l'énergie photonique reçue peut provoquer des transitions électroniques, un ou plusieurs électrons passent d'un état énergétique bas à un état excité, plus élevé, et ce phénomène se manifeste par un pic d'absorption caractéristique dont la position dépend de la taille, de la forme et de la concentration des nanoparticules. Ainsi, la spectroscopie UV-Visible est un outil rapide, sensible et non destructif pour surveiller la synthèse et évaluer certaines propriétés physico-chimiques des nanoparticules [36].

7.2 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

C'est une technique largement utilisée pour analyser la taille moyenne et la distribution des particules en suspension dans un liquide, notamment dans le domaine des nanoparticules. Elle permet d'évaluer l'homogénéité d'une solution, de détecter la formation d'agrégats et d'optimiser les conditions de cristallisation.

Le principe repose sur la mesure des fluctuations aléatoires de l'intensité lumineuse diffusée, provoquées par le mouvement brownien des particules, c'est-à-dire le déplacement aléatoire des particules sous l'effet de l'agitation thermique. Cette méthode rapide, non destructive et adaptée aux particules comprises entre 1 nm et 1 μ m. Elle est largement utilisée pour évaluer la stabilité, la taille et l'homogénéité des suspensions de nanoparticules, notamment dans les domaines de la nanomédecine, de la formulation pharmaceutique et des matériaux avancés [37].

7.3 Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier

La spectrométrie FT-IR est définie comme une méthode extrêmement précise et fiable, capable de produire un excellent rapport signal/bruit. Elles sont utilisées pour identifier les biomolécules impliquées dans la synthèse des nanoparticules. Elle permet de détecter de faibles variations d'absorbance, ce qui est idéal pour étudier les interactions entre molécules et matériaux à l'échelle nanométrique [38].

La FTIR mesure l'absorption de la lumière infrarouge par les liaisons chimiques d'une molécule, elle permet ainsi d'identifier les groupes fonctionnels présents et de détecter la formation ou la modification des nanoparticules. Cette technique permet de suivre à la fois les

modifications chimiques et les réponses biologiques des cellules qui sont en contact avec des nanoparticules [39].

7.4 Diffraction des Rayons X (DRX)

C'est une méthode essentielle pour analyser la structure cristalline des nanoparticules. En plus d'identifier les phases présentes dans l'échantillon, elle permet d'estimer la taille des cristallites. À l'échelle nanométrique, les pics de diffraction deviennent plus larges, ce qui est directement lié à la petite taille des particules [40].

Les rayons X sont des ondes électromagnétiques dont la longueur d'onde ($\sim 1 \text{ \AA}$) est comparable à la distance entre les atomes dans les nanoparticules. Lorsqu'un faisceau de rayons X frappe les nanoparticules, ils interagissent avec les plans atomiques du réseau cristallin, provoquant une diffraction due à la dispersion cohérente des rayons par les électrons des atomes. Si les ondes diffusées sont bien alignées (en phase), elles forment alors un faisceau diffracté. Cela permet d'identifier la structure des nanoparticules et d'estimer leur taille. La DRX est donc un outil indispensable pour caractériser les nanoparticules, car elle offre une vision directe de leur structure interne et de leurs propriétés cristallines, essentielles pour comprendre leur comportement physique, chimique et biologique [41].

7.5 Microscope électronique à balayage (MEB)

Le MEB est un outil puissant permettant de produire des images de haute résolution et de fournir des caractéristiques morphologiques. Si celui-ci est équipé de systèmes d'analyse d'énergie, il permet également d'effectuer des analyses de composition élémentaire permettant de déterminer la composition chimique des nanoparticules [42].

Le principe du MEB, issu des travaux de Max Knoll et Manfred Von Ardenne dans les années 1930 [Knoll 1931 ; Ruska 1987], repose sur l'interaction d'un faisceau d'électrons primaires avec la surface de l'échantillon. Ces interactions génèrent divers signaux qui sont détectés pour fournir des informations sur la morphologie, la topographie et, dans certains cas, la composition élémentaire de l'échantillon. Le MEB est largement utilisé dans les domaines des sciences des matériaux, de la nanotechnologie, de la biologie et de l'industrie [43].

8. Nanoparticules d'argent

8.1 Définition

L'argent, métal de transition de symbole chimique Ag et de numéro atomique 47, est un élément chimique classé au groupe 11 du tableau périodique. Il se présente sous la forme d'un métal

blanc brillant, très ductile et malléable. Il présente une conductivité électrique et thermique exceptionnellement élevée. Dans le contexte de laboratoire ou industriel, cette substance se présente sous forme de poudre fine blanche à grisâtre, ou de cristaux métalliques.

Les nanoparticules d'argent sont des particules extrêmement fines d'argent métallique dont la taille varie communément entre 1 et 100 nanomètres. Ces nanoparticules métalliques sont parmi les plus répandues dans les secteurs de la recherche et de l'industrie, en raison de leurs caractéristiques physiques, chimiques et biologiques distinctives comme leurs propriétés antimicrobiennes, antioxydantes, catalytiques et optiques [44].

Les nanoparticules d'argent, sous forme colloïdale, sont constituées d'un mélange d'ions argent (Ag^+) dissous dans l'eau et de particules d'argent métallique (Ag^0). Il est communément admis que près de 80 % de cette solution est sous forme d'ions, tandis que les 20 % restants correspondent aux nanoparticules elles-mêmes [45]. Cette configuration leur confère la capacité d'interagir de manière efficace avec les membranes cellulaires, les protéines et l'ADN.

8.2 Propriétés des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent présentent des caractéristiques qui varient selon les conditions de synthèse, influençant notamment leur taille, forme, structure cristalline et leur couleur en solution ainsi que leur réactivité chimique. Le tableau 2 suivant synthétise les principales propriétés rapportées dans la littérature.

Tableau 2 : Caractéristiques des nanoparticules d'argent

Taille	Généralement dans l'intervalle de 2 à 50 nm	[3] [46]
Forme	Sphérique, triangulaire, cubique, hexagonale, selon les conditions de synthèse	[46] [48]
Structure cristalline	Cubique a faces centrées (CFC)	[48] [49]
Couleur en solution	Jaune a brune en fonction de taille et ce concentration	[46]
Résonance plasmonique	Pic d'absorption entre 420 – 450 nm visible par UV-Visible	[48] [49]
Réactivité chimique	Capacité a libéré des ions Ag^+ responsable a des effet antimicrobiens	[3] [49]
Surface spécifique	Très élevée, ce qui augmente les interactions avec les cellules et les protéines	[3] [50]

Chapitre 02 : Méthodes de synthèse des nanoparticules**1. Introduction**

Les nanoparticules, grâce à leur taille nanométrique, présentent des caractéristiques uniques qui les rendent très utiles dans plusieurs domaines, notamment la médecine, l'électronique et l'environnement. Il est crucial de maîtriser leur synthèse pour tirer pleinement profit de leur potentiel. Les techniques de synthèse des nanoparticules se divisent généralement en deux grandes catégories : ascendante (Bottom-up) et descendante (top-down) (Figure 3).

a. Approche Descendante (Top-Down)

Cette méthode consiste à partir d'un matériau en vrac et à le fragmenter progressivement en nanoparticules à l'aide de différentes techniques mécaniques ou physiques. C'est une approche de réduction de taille où l'on diminue la structure macroscopique en particules nanométriques.

b. Approche Ascendante (Bottom-Up)

Cette méthode commence à partir d'atomes ou de molécules individuels qui s'assemblent pour former des nanoparticules. C'est une approche d'auto-assemblage où des réactions chimiques ou biologiques permettent la formation progressive des nanoparticules [51].

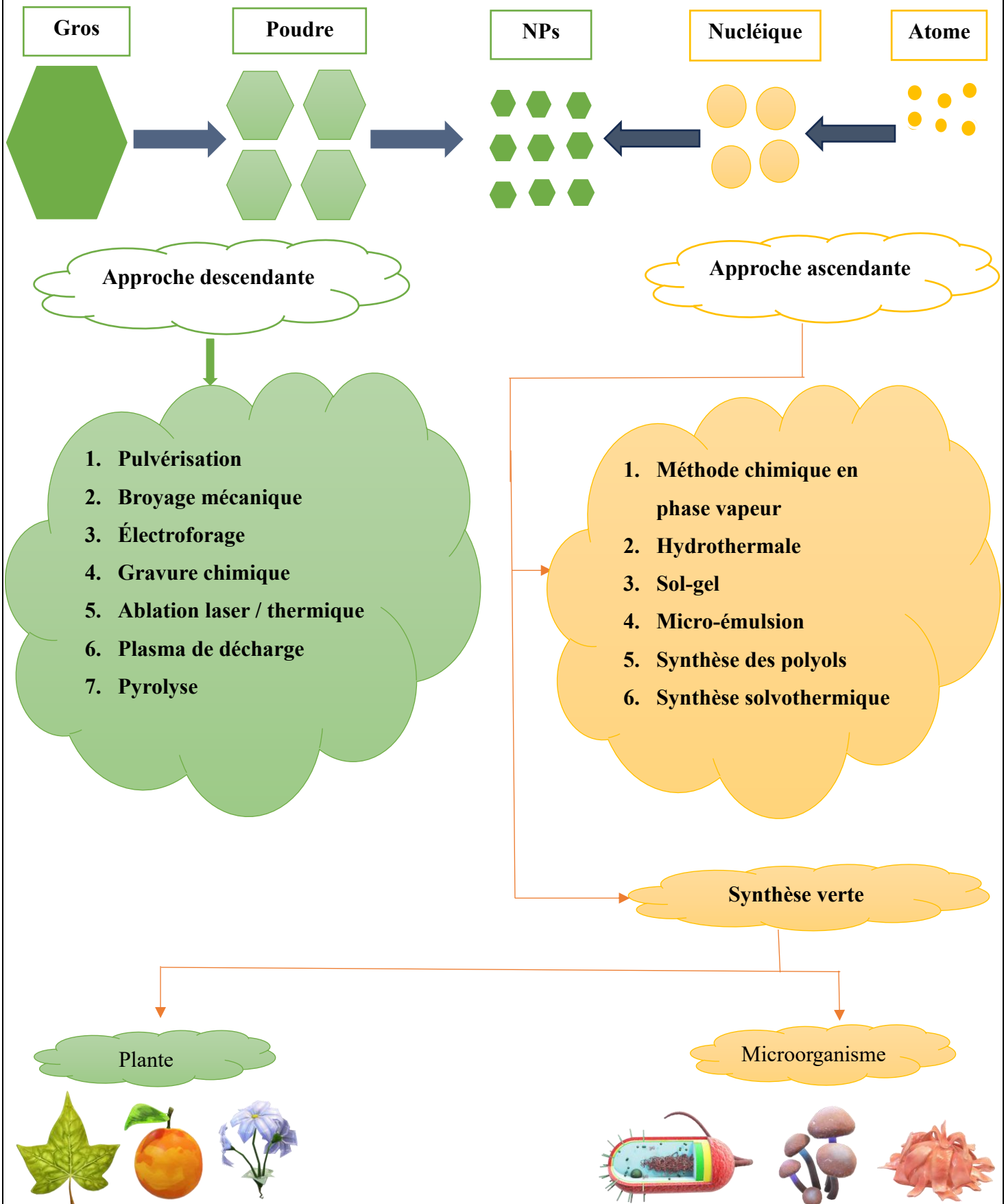


Figure 3 : Différentes méthodes de synthèse des nanoparticules

2. Méthodes chimiques

La synthèse chimique des nanoparticules est un processus clé qui utilise des agents réducteurs, soit inorganiques soit organiques, pour convertir les ions métalliques en particules métalliques. Ce processus induit la formation de noyaux métalliques, suivi de leur agglomération en clusters oligomériques. Le processus de formation des nanoparticules colloïdales métalliques implique la transformation des agrégats précurseurs.

Afin de prévenir cette agglomération excessive, l'utilisation d'agents protecteurs (ou agents stabilisants) est préconisée ; ces agents se fixent à la surface des nanoparticules, évitant ainsi leur agrégation. Leur rôle est donc crucial pour garantir une dispersion et une stabilité optimales des nanoparticules.

Dans cette synthèse, plusieurs méthodes peuvent être employées notamment la synthèse assistée par micro-onde, la synthèse hydrothermale, la synthèse polyol, les techniques de micro-émulsion, la synthèse solvothermale, la méthode sol-gel, la synthèse plasma et la synthèse par vapeurs chimiques. Chacune de ces méthodes présente des caractéristiques spécifiques et conduit à des résultats particuliers en termes de taille, forme, structure cristalline et stabilité des nanoparticules obtenues [51].

3. Méthodes physiques

La synthèse physique des nanoparticules repose sur des procédés " top-down" qui consistent à fragmenter un matériau massif en particules de taille nanométrique. Elles utilisent diverses sources d'énergie thermique, mécanique ou électromagnétique, pour provoquer l'évaporation, l'abrasion ou la condensation du matériau. Contrairement aux méthodes chimiques, elles ne nécessitent pas de solvants ni de réactifs, ce qui les rend plus respectueuses de l'environnement. Parmi les techniques les plus répandues, on retrouve l'ablation laser, le broyage mécanique, l'évaporation-condensation, la pulvérisation cathodique ou encore la décharge plasma. Ces approches permettent d'obtenir des nanoparticules de haute pureté, avec une bonne homogénéité de taille et de forme. Elles sont souvent utilisées dans les domaines de la catalyse, de l'électronique et de la médecine pour leurs performances spécifiques [52].

4. Synthèse verte

La synthèse verte des nanoparticules représente une approche novatrice et respectueuse de l'environnement pour la production de matériaux nanométriques. Contrairement aux méthodes

traditionnelles qui utilisent souvent des produits chimiques nocifs et consomment beaucoup d'énergie, cette technique privilégie des procédés durables.

Elle s'appuie sur des ressources naturelles, telles que les extraits des plantes riches en polyphénols, les micro-organismes (comme les bactéries et les champignons) ou encore les déchets agricoles (comme les coques et les épluchures).

Ces éléments jouent un double rôle en tant qu'agents réducteurs (transformant les ions métalliques en nanoparticules) et stabilisants (prévenant l'agrégation des particules).

Le principe clé de cette méthode est de réduire l'impact écologique en minimisant les déchets toxiques, en limitant la consommation d'énergie et en remplaçant les produits chimiques dangereux par des alternatives biodégradables et renouvelables. Elle s'inscrit dans les objectifs de développement durable en promouvant la protection de l'environnement, la sécurité des chercheurs et la préservation des ressources naturelles. Ainsi, cette méthode se présente comme une alternative prometteuse pour produire des nanoparticules de manière responsable et écologique [53].

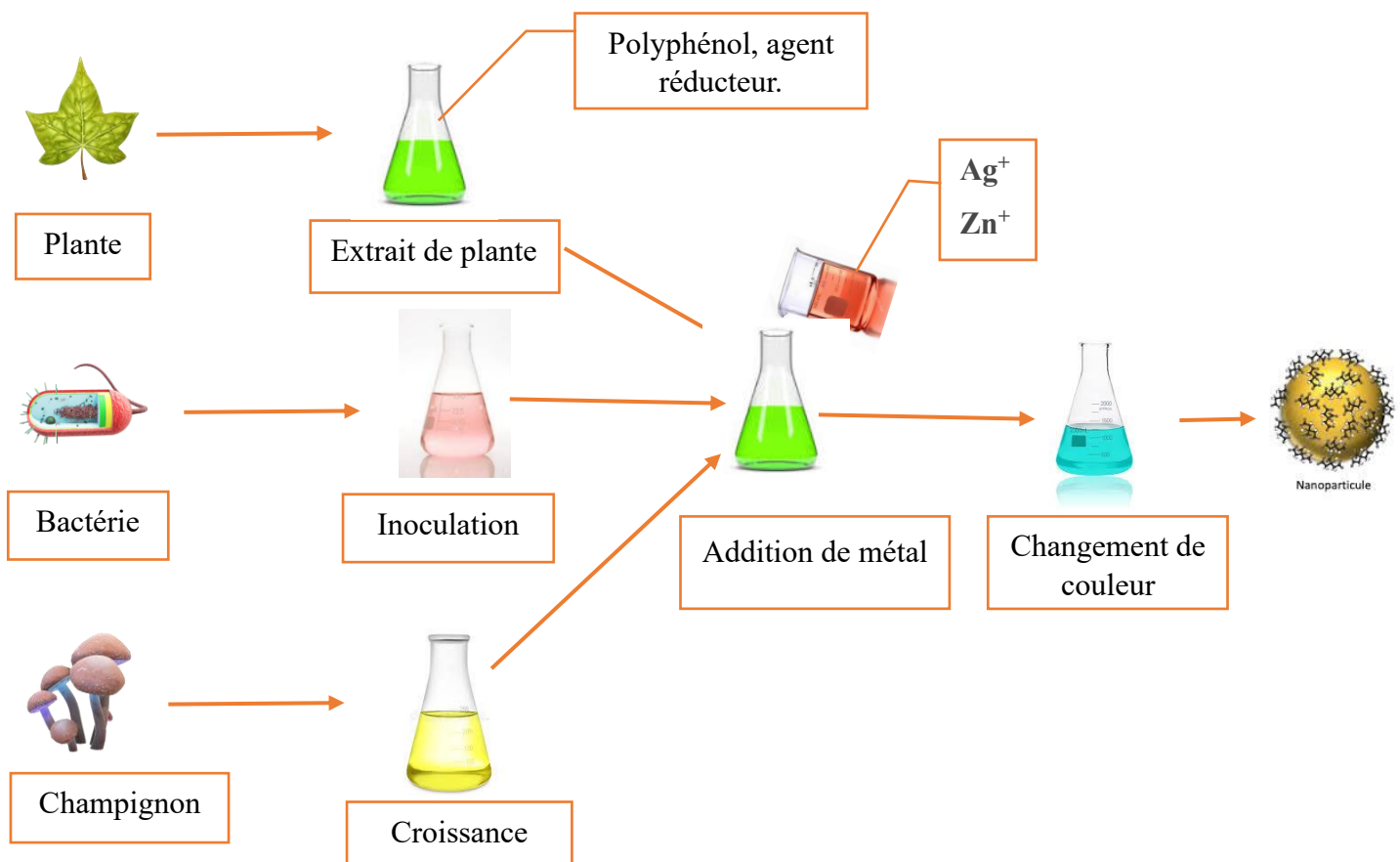


Figure 4 : Synthèse verte des NPs métallique provenant de différents organismes vivants

4.1 Plantes

Les plantes constituent l'un des agents biologiques les plus étudiés pour la synthèse verte des nanoparticules, en raison de leur abondance, de leur diversité et de la richesse de leurs métabolites secondaires. Les extraits végétaux contiennent une grande variété de composés bioactifs tels que les flavonoïdes, les alcaloïdes, les phénols, les tanins, les terpènes, les enzymes et les protéines. Ces composés jouent un double rôle dans la réduction des ions métalliques (comme l'Argent, l'Or, le Zinc) et la stabilisation des nanoparticules formées [54]. La synthèse s'effectue généralement par simple mélange d'un extrait végétal aqueux avec une solution métallique, dans des conditions douces, sans recourir à des produits chimiques toxiques. Cette méthode respectueuse de l'environnement est rapide, peu coûteuse et permet d'obtenir des nanoparticules aux propriétés variables selon la plante utilisée [55].

4.2 Bactéries

Les bactéries font partie des microorganismes les plus étudiés pour la synthèse verte de nanoparticules. Grâce à des enzymes spécifiques telles que la nitrate réductase, elles peuvent réduire des ions métalliques pour former des nanoparticules à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule (synthèse extracellulaire ou intracellulaire) et des espèces telles que *Pseudomonas*, *Bacillus* et *Escherichia coli* sont couramment utilisées pour la production des nanoparticules d'Or, d'Argent et d'Oxyde de zinc [56].

4.3 Champignons

Également appelée mycosynthèse, ils présentent une capacité remarquable à synthétiser des nanoparticules grâce à leur sécrétion abondante d'enzymes et de métabolites extracellulaires. Leur croissance rapide, leur tolérance aux métaux et leur capacité à produire de grandes quantités de biomolécules en font des systèmes efficaces pour réduire les ions métalliques en nanoparticules de taille contrôlée [57].

4.4 Algues

Ce sont des organismes photoautotrophes aquatiques classés selon leur pigmentation en algues brunes (phaeophytes), rouges (rhodophytes) et vertes (chlorophytes). Grâce à leur croissance rapide, leur facilité de culture et une production de biomasse bien supérieure à celle des plantes terrestres. Elle contient des polysaccharides, des protéines, des phénols, ces composés peuvent réduire les ions métalliques en nanoparticules [58].

5. Mécanisme de formation

La formation des nanoparticules métalliques, notamment d'argent (AgNPs), suit généralement trois étapes principales : la nucléation, la croissance et le mûrissement. Ces étapes sont influencées par divers paramètres, tels que la concentration du précurseur métallique, la température, le pH, la nature du réducteur et la présence de stabilisants [59].

1. Nucléation

La première étape consiste à réduire les ions Ag^+ , souvent issus du nitrate d'argent (AgNO_3), en atomes d'argent (Ag^0) sous l'action d'un agent réducteur, comme les polyphénols présents dans les extraits végétaux ou la margine. Une fois la concentration d' Ag^0 atteint un niveau critique, des noyaux se forment par collisions aléatoires entre atomes. Ce phénomène, appelé nucléation homogène, marque le début de la formation des nanoparticules.

2. Croissance

Les noyaux formés lors de l'étape précédente continuent à croître par l'ajout progressif d'atomes d'argent restants dans la solution. Cette croissance est thermodynamiquement favorable tant que la solution reste sursaturée. La vitesse de croissance dépend de la concentration en Ag^0 et de la température. Si un agent stabilisant est présent, il empêche l'agrégation incontrôlée en se fixant sur la surface des particules.

3. Mûrissement

Une fois que la majorité des atomes en solution ont été incorporés dans les nanoparticules, le système évolue en phénomène de mûrissement d'Ostwald : les plus petites particules, thermodynamiquement instables, se dissolvent lentement, et les atomes migrent vers les plus grosses particules, plus stables. Cela conduit à l'élargissement de la taille moyenne des particules et à une distribution plus homogène.

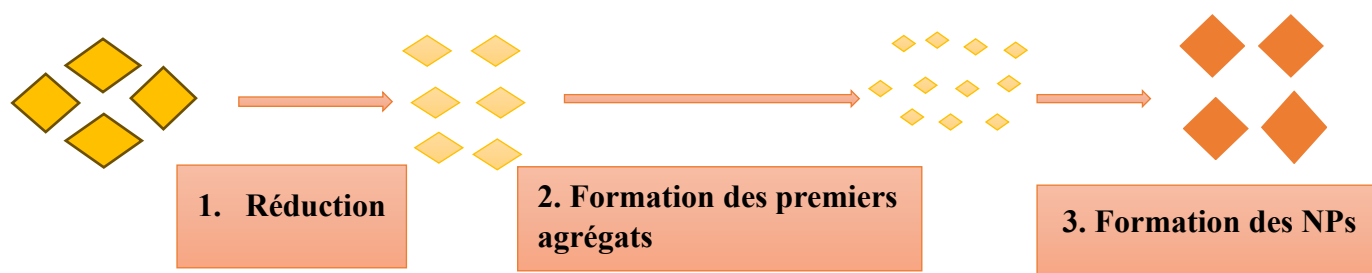


Figure 5 : Mécanisme de formation des NPs métalliques

6. Activités antioxydante et antibactérienne

6.1 Activité antioxydante

Les antioxydants sont des molécules naturellement présentes dans divers aliments, en particulier les fruits, légumes, graines et certaines plantes médicinales. Ces molécules jouent un rôle essentiel dans la neutralisation des radicaux libres, des espèces réactives de l'oxygène (ROS) générées soit par le métabolisme cellulaire, soit en réponse à des facteurs externes tels que la pollution, le rayonnement UV, le tabac ou le stress oxydatif [60]. Ces radicaux libres sont susceptibles d'altérer les composants cellulaires, notamment l'ADN, les lipides et les protéines, ce qui peut conduire à un vieillissement prématuré et à la survenue de diverses pathologies chroniques telles que les cancers, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives [61].

L'activité antioxydante correspond à la capacité d'une molécule à inhiber ou à ralentir les réactions d'oxydation, notamment en capturant ou en neutralisant les radicaux libres avant qu'ils ne causent des dommages [62]. Cette activité a pour effet de protéger les cellules et les tissus biologiques contre les effets délétères de l'oxydation.

Les antioxydants sont des composés qui comprennent des substances endogènes, c'est-à-dire produites naturellement par l'organisme, telles que le glutathion, la superoxyde dismutase ou la catalase, ainsi que des composés exogènes, c'est-à-dire apportés par l'alimentation. Les antioxydants exogènes comprennent notamment les vitamines A, C et E, les polyphénols, les flavonoïdes et les caroténoïdes [63]. En effet, en renforçant les défenses de l'organisme contre le stress oxydatif, ces molécules jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre cellulaire et de la santé globale.

6.2 Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne désigne la capacité d'un agent à inhiber la croissance ou à provoquer la mort des bactéries pathogènes. Elle peut être exercée par des composés naturels, semi-synthétiques ou synthétiques, et repose sur divers mécanismes d'action. Les substances antibactériennes naturelles sont présentes dans de nombreuses plantes médicinales, champignons, micro-organismes ou produits dérivés (extraits, huiles essentielles, métabolites secondaires). Ces composés agissent notamment en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne, en inhibant la synthèse des protéines ou des acides nucléiques, ou encore en interférant avec le métabolisme bactérien [64].

Face à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques, les composés naturels représentent une alternative thérapeutique prometteuse. Les flavonoïdes, les tanins, les alcaloïdes, les saponines et les peptides antimicrobiens sont capables de combattre les infections bactériennes en inhibant la croissance bactérienne, en perturbant la formation de biofilms et en réduisant la résistance aux antibiotiques [65]. Leur efficacité varie toutefois en fonction de la concentration, de la souche bactérienne et des conditions environnementales. Ces agents naturels peuvent compléter les traitements classiques dans les domaines médicaux, agroalimentaires et pharmaceutiques [64].

Chapitre 03 : Généralités sur les margines

1. Définition

Les margines, aussi appelées eaux de végétation, sont des effluents visqueux et acides produits lors de l'extraction de l'huile d'olive. Elles contiennent une grande quantité de matière organique, notamment des sucres, des acides organiques, des graisses, des tannins, des polyalcools, des pectines et des substances azotées, ainsi que des sels minéraux tels que Potassium, Sodium ou Magnésium [66].

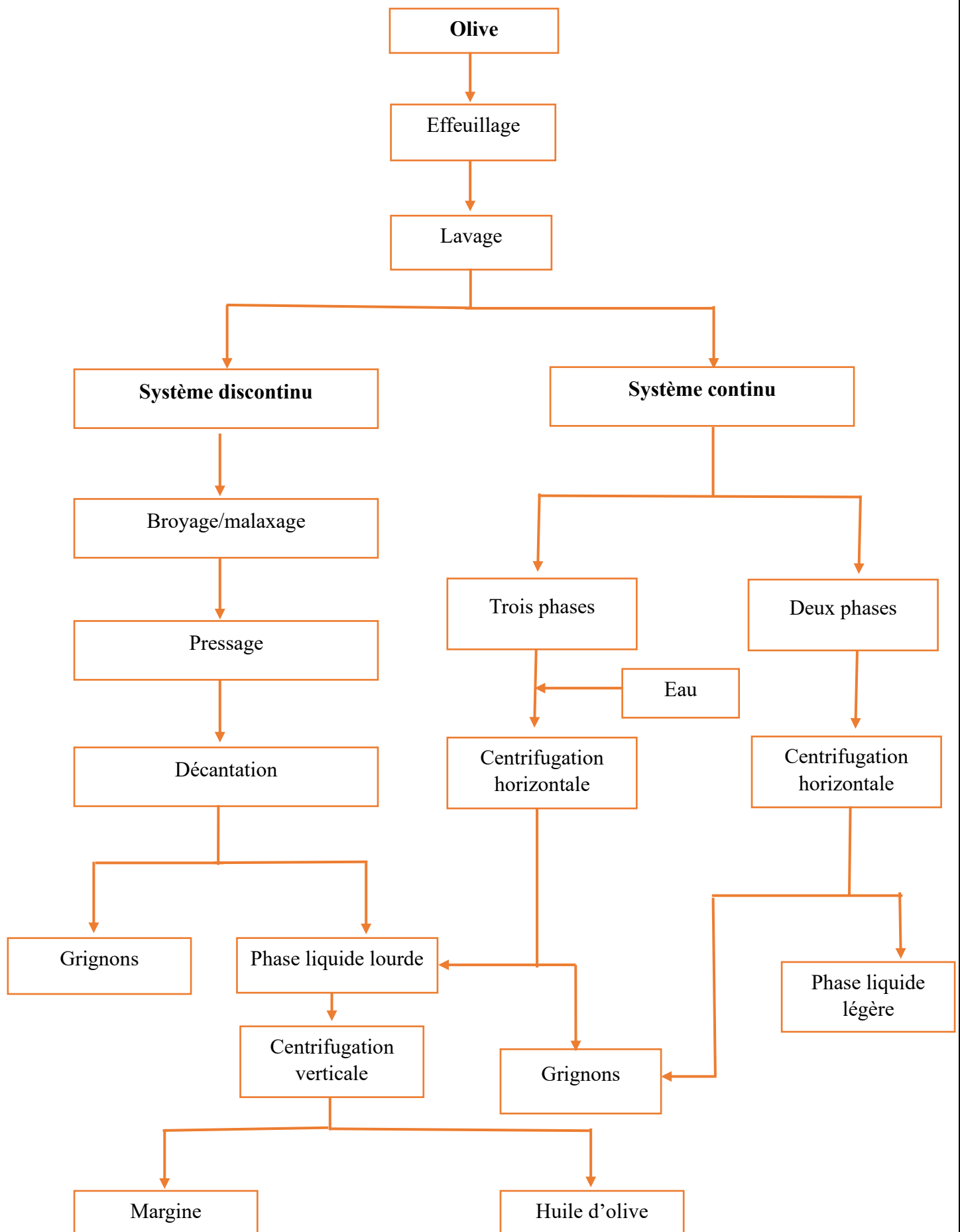
Ils sont également acides, avec un pH généralement compris entre 4 et 5, présentent un défi majeur dans les régions méditerranéennes en raison de leur charge organique élevée et de leur acidité, les rendant particulièrement polluantes pour l'environnement [67]. Cependant, ces effluents ne sont pas seulement nuisibles, ils sont également riches en antioxydants naturels, tels que des polyphénols, qui présentent des propriétés bénéfiques, comme des effets antimicrobiens et hypolipidémiques [68].

Ces substances proviennent de l'eau présente naturellement dans les olives, ainsi que de l'eau ajoutée lors des étapes de broyage et de trituration durant le processus d'extraction. En fonction de la méthode utilisée pour extraire l'huile, de la variété des olives, de la saison de récolte, du niveau de maturation des fruits et des conditions climatiques, la qualité et la quantité des margines peuvent varier, par exemple, les méthodes traditionnelles d'extraction génèrent environ 400 à 500 litres de margines par tonne d'olives, tandis que les techniques modernes, comme celles en deux phases, produisent jusqu'à 1 000 litres de margines par tonne d'olives [69].

2. Extraction

Différents systèmes d'extraction d'huile d'olive ont été développés [70] :

1. **Unités de trituration avec un système en presse** : Ces unités exercent une pression de 100 à 400 kg/cm selon qu'elles soient traditionnelles, semi-modernes ou modernes, pour extraire l'huile d'olive.
2. **Unités de trituration à chaînes continues à deux phases** : Ces unités utilisent une centrifugation pour séparer l'huile et les grignons humidifiés par les eaux de végétation.
3. **Unités de trituration à chaînes continues à trois phases** : Ces unités emploient deux centrifugeuses pour séparer d'abord les grignons et l'huile, puis l'huile et les margines.

**Figure 6 :** Principaux systèmes d'extraction de l'huile d'olive

3. Préparation de l'extrait de margine

La margine, en tant que sous-produit liquide issu de l'extraction de l'huile d'olive, est riche en composés bioactifs tels que les polyphénols, les sucres et les acides organiques. Pour valoriser ces composés, une préparation préalable de l'extrait est nécessaire. Celle-ci débute par une acidification de la margine jusqu'à un pH égal à 2 afin de stabiliser les composés phénoliques et faciliter leur extraction. Une étape de délipidation est ensuite réalisée à l'aide d'hexane, dans le but d'éliminer les matières grasses interférentes. Après centrifugation, la phase aqueuse est récupérée et soumise à une extraction liquide-liquide à l'aide d'acétate d'éthyle, permettant d'isoler les composés d'intérêt. La phase organique est ensuite séchée avec du sulfate de sodium anhydre pour éliminer les traces d'eau, puis filtrée. Les extraits obtenus peuvent être conservés tant qu'ils sont, ou concentrés par évaporation pour une utilisation ultérieure.

4. Propriétés physico-chimiques

Les margines, effluents générés lors de l'extraction de l'huile d'olive, sont des sous-produits complexes, riches en matière organique, sels dissous, polyphénols et matières grasses [71]. Ils présentent des propriétés physico-chimiques spécifiques : pH acide, forte demande biochimique en oxygène (DBO₅ et DCO), une haute conductivité électrique et une teneur élevée en polyphénols. Ces caractéristiques sont essentielles pour évaluer leur potentiel de pollution et les possibilités de valorisation. Une gestion appropriée de ces paramètres permet de traiter ou d'utiliser de manière productive les margines. Le tableau récapitulatif des principales propriétés chimiques utilisées pour caractériser ces sous-produits [72].

Tableau 3 : Principales propriétés physico-chimiques de caractérisation de la margine

	Valeurs	
	Minimum	Maximum
PH	4,7	5,7
Conductivité (ms/cm)	5	41
DBO (g /L)	41,3	46
DCO (g/L)	16,5	190
Matière organique (g /L)	16,7	81 ,6

PARTIE 02
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

1. Introduction

Cette partie expérimentale a été réalisée au sein du laboratoire de recherche « Chimie des Substances Naturelles et Biomolécules (LCSNBioM) » de la Faculté des Sciences de l'Université Saad Dahleb de Blida.

Notre recherche porte sur deux axes, l'étude chimique et microbiologique de l'extrait de margine et de sa fraction polaire, ainsi que sur la synthèse et la caractérisation des nanoparticules d'argent issues de cet extrait. Elle comprend la préparation de l'extrait brut par extraction liquide-liquide, de la fraction polaire selon la méthode de Bligh and Dyer modifiée, l'analyse de la composition par CG/MS, la détermination des teneurs en composés phénoliques et flavonoïdes totaux, ainsi que l'évaluation des activités antibactériennes et antioxydantes. Enfin, la synthèse verte des nanoparticules d'argent est réalisée, suivie de leur caractérisation.

2. Origine et traitement de la margine

La margine utilisée dans cette étude a été collectée auprès de la SARL Arbea Huilerie, située dans la région de Larbaa (Blida, Algérie ; Lat. 36.33054, Long. 3.90563), au cours de la campagne oléicole 2024/2025, durant le mois de novembre. Ce sous-produit, issu d'un procédé d'extraction de l'huile d'olive à trois phases, a été soumis à une filtration afin d'éliminer les particules solides.

3. Matériel et réactifs

3.1 Mesure du pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre de type HANNA Instruments modèle 210.

3.2 Centrifugation

La séparation des phases a été réalisée à l'aide d'une centrifugeuse réfrigérée de marque Sigma, avec contrôle de température (réglable de -10 °C à +40 °C) et vitesse programmable jusqu'à 4500 tr/min.

3.3 Spectrophotométrie UV-Visible

Les analyses UV-Visible ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre de type Rayleigh UV-2601, couvrant une plage de longueurs d'onde de 200 à 800 nm.

3.4 Lecteur ELISA

Les mesures d'absorbance dans les tests biochimiques ont été réalisées à l'aide d'un lecteur de microplaques ELISA de type URIt-660.

3.5 Réactifs utilisés

Les solvants utilisés pour les différentes étapes expérimentales étaient le méthanol, l'acétate d'éthyle et l'hexane. Les réactifs chimiques mis en œuvre comprenaient le sulfate de magnésium anhydre, le chlorure d'aluminium (AlCl_3), le réactif de Folin-Ciocalteu, le carbonate de sodium (Na_2CO_3), 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH), l'acide ascorbique, l'acide gallique, la quercétine, le diméthylsulfoxyde (DMSO) ainsi que l'eau distillée. L'ensemble des solvants et réactifs employés étaient de grade analytique.

4. Procédure Expérimentale

Nous allons présenter dans ce qui suit la procédure expérimentale de la différente étape de cette étude de la préparation de l'extrait jusqu'à la caractérisation des nanoparticules.

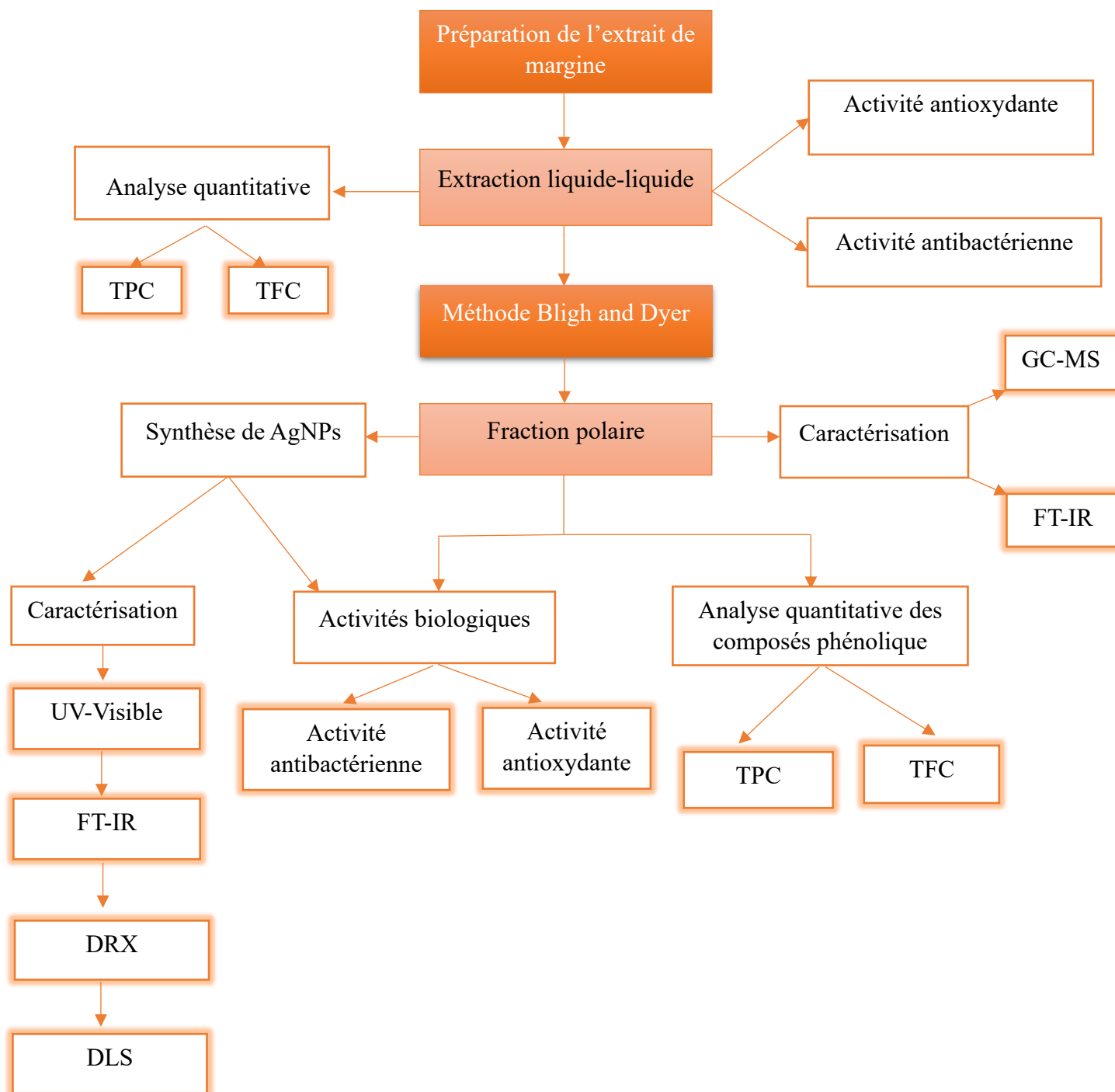


Figure 7 : Diagramme général de la procédure expérimentale

5. Préparation des échantillons

5.1 Préparation de l'extrait de la margine

Nous avons ajusté le pH initial (4,63) à 2,0 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,5 mol/L, dans un volume de 1L de margine. Ensuite, une première extraction liquide-liquide a été réalisée avec 200 mL d'hexane, suivie d'une agitation, deux phases ont été obtenues une phase supérieure hexanique contenant des lipides et une phase inférieure quasiment aqueuse contenant les composés phénoliques et autres. Une deuxième extraction de la phase aqueuse a été extraite avec 200 mL d'acétate d'éthyle, suivie d'une centrifugation à 4500 tr/min pendant 20 minutes à 4 °C. Ensuite les phases ont été récupérées, filtrées, et concentrées à l'aide d'un évaporateur rotatif afin d'éliminer le solvant.



Figure 8 : Extraction liquide-liquide



Figure 9 : Extrait d'acétate d'éthyle

5.1.1 Rendement de l'extraction

Le rendement en extrait est estimé par le rapport de la masse d'extrait brut obtenue à la masse de la margine utilisée. Il est exprimé en pourcentage (%) et calculé selon la formule 1.

$$R = \frac{m_{ext}}{m_{mar}} * 100 \quad (1)$$

R (%) : Rendement de l'extrait (%).

m_{ex} : Masse de l'extrait brute (g).

m_{mar} : Masse de la margine utilisée (g).

Ce paramètre permet d'évaluer l'efficacité du procédé d'extraction, en indiquant la proportion de matière extraite par rapport à la matière première utilisée.

5.2 Préparation de la fraction polaire par la méthode de Bligh & Dyer modifiée

5.2.1 Principe

La méthode de Bligh & Dyer modifiée permet de fractionner l'extrait en fraction polaire et apolaire (méthanol, chloroforme, eau). Un prétraitement de l'extrait à l'eau permet d'éliminer une teneur résiduelle en sucre. Ensuite, l'ajout d'un mélange de méthanol, chloroforme et eau pour obtenir deux phases distinctes ; une phase chloroformique, et une phase plus polaire méthanolique contenant les composés phénoliques [73].

5.2.2 Protocole

Dans un premier temps, un prétraitement a été réalisé afin d'éliminer les sucres : pour cela, 5 g d'extrait d'acétate d'éthyle sec, ont été mélangés à 50 ml d'eau dans une ampoule à décanté. Après séparation des phases, la phase organique a été récupérée. Ensuite, nous avons ajouté 20 ml de méthanol et 10 ml de chloroforme, le mélange a été ensuite agité vigoureusement pendant 2 minutes à l'aide d'un vortex. Par la suite, 10 ml de chloroforme et 18 ml d'eau ont été ajoutés, suivis d'une nouvelle agitation de 2 minutes. Le mélange obtenu a été transféré dans une ampoule à décanter afin de permettre la séparation des phases. Deux phases distinctes ont été obtenues ; une phase organique (chloroforme), dans laquelle les lipides ont été extraits, et une phase polaire (méthanol+ eau) qui est riche en produits phénoliques.

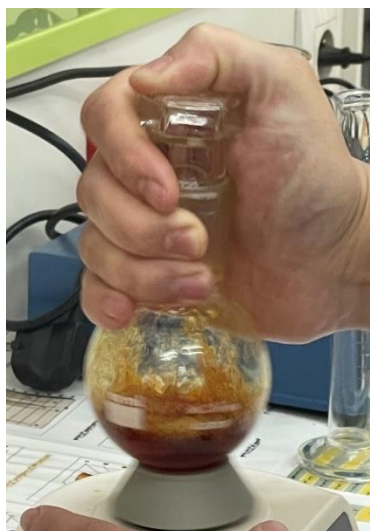


Figure 10 : Agitation par vortex



Figure 11 : Extraction de la fraction polaire

6. Analyses quantitatives des extraits

6.1 Détermination de la teneur en phénols totaux (TPC)

Elles ont été déterminées selon la méthode développée par Vasquez Roncero (1973) qui utilise le réactif Folin-Ciocalteu et l'acide gallique comme standard [74].

6.1.1 Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide jaune composé d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3Mo_{12}O_{40}P$). Lors de l'oxydation des substances phénoliques, le réactif est réduit en mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène. La coloration obtenue après la réaction est proportionnelle à la concentration de polyphénols présents dans l'extrait [75].

Le calcul de la teneur en mg EAG par gramme d'extrait sec par la relation 2

$$T = \frac{C \times V}{M} \quad (2)$$

T : Taux des composés phénoliques (mg EAG/g d'extrait sec).

C : Concentration d'extrait équivalente à l'acide gallique.

V : Volume total de milieu réactionnel (ml).

M : Poids sec de l'extrait (g).

6.1.2 Préparation de la série d'étalonnage

Pour chaque tube à essai, nous avons introduit 500 μ l de méthanol, 2.5 ml d'eau distillée et 3 ml de solution de carbonate de sodium (Na_2CO_3) à 7.5 %. Le premier tube contenait 2 ml de la solution mère d'acide gallique à une concentration de 1 mg/ml. À partir de la solution mère, nous avons effectué une série de dilutions en transférant successivement 500 μ l de chaque tube dans le suivant, après agitation. Cette opération a été poursuivie jusqu'à l'obtention de toutes la série de dilution. Par la suite, 500 μ l de réactif de Folin-Ciocalteu a été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été incubés à 25 °C, à l'abri de la lumière, pendant 30 minutes. L'absorbance de chaque solution a été mesurée à 770 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant le méthanol comme un blanc.



Figure 12 : Série d'étalonnage de l'acide gallique

6.1.3 Préparation des extraits

2 mg de chaque échantillon (extrait d'acétate et la fraction polaire) ont été dissous dans 4 mL de méthanol. Un volume de 0,5 mL de cette solution a été introduit dans un tube à essai contenant 2,5 mL d'eau distillée et 3 mL de solution de carbonate de sodium. Après homogénéisation, 0,5 mL de réactif de Folin-Ciocalteu a été ajouté. Le mélange a ensuite été incubé pendant 30 minutes à température ambiante, à l'abri de la lumière.

La concentration en composés phénoliques totaux des échantillons est calculée à partir de la courbe d'étalonnage de l'acide gallique, et les résultats sont exprimés en mg équivalent d'acide gallique par g d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait).

6.2 Dosage des flavonoïdes totaux (TFC)

6.2.1 Principe

Le dosage des flavonoïdes totaux s'effectue par la formation d'un complexe entre les ions Al^{3+} et les groupements hydroxyles des flavonoïdes, cette réaction génère une coloration jaune mesurable à 444 nm [76].

Le calcul de la teneur en mg EQ par gramme d'extrait sec par la relation 3

$$T = \frac{C \times V}{M} \quad (3)$$

T : Teneur en flavonoïdes totaux (mg EQ/g d'extrait sec).

C : Concentration d'extrait équivalente à la quercétine.

V : Volume total de milieu réactionnel (mL).

M : Poids sec d'extrait (g).

6.2.2 Préparation des solutions

➤ Solution de quercétine

Une solution de quercétine a été préparé à une concentration de 0,5 mg/mL.

➤ Solution de chlorure d'aluminium

Une masse de 2 g de chlorure d'aluminium (AlCl_3) a été pesée et introduite dans une fiole jaugée de 100 mL. Nous avons ajouté du méthanol suivi d'une agitation jusqu'à dissolution complète du sel. La solution préparée correspond à une concentration de 2 % (m/v).

6.2.3 Préparation de la série d'étalonnage

Nous avons préparé une série de dix tubes à essai numérotés de C1 à C10. Le tube n° 1 a été obtenu en introduisant 4 ml de la solution mère de quercétine, à une concentration de 0,5 mg/mL. Nous avons ensuite réalisé une dilution successive en transférant 2 ml du contenu du tube n°1 dans le tube n°2, préalablement rempli de 2 mL de méthanol. Après agitation, le même procédé a été appliqué successivement jusqu'au tube n°10, afin d'obtenir une gamme de concentrations étalons. Nous avons ajouté 2 mL de la solution de chlorure d'aluminium dans chaque tube. Les tubes ont été agités, puis laissés à température ambiante pendant 10 minutes. Les absorbances ont été mesurées à 444 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible, en utilisant le méthanol comme blanc.

6.2.4 Préparation des extraits

Dans un tube à essai, 2 mL de chaque échantillons (extrait d'acétate et la fraction polaire) sont mélangés avec 2 mL de la solution de chlorure d'aluminium (AlCl_3 à 2 %), le mélange est agité puis incubé à température ambiante pendant 10 minutes, l'absorbance est ensuite mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible à une longueur d'onde de 444 nm.

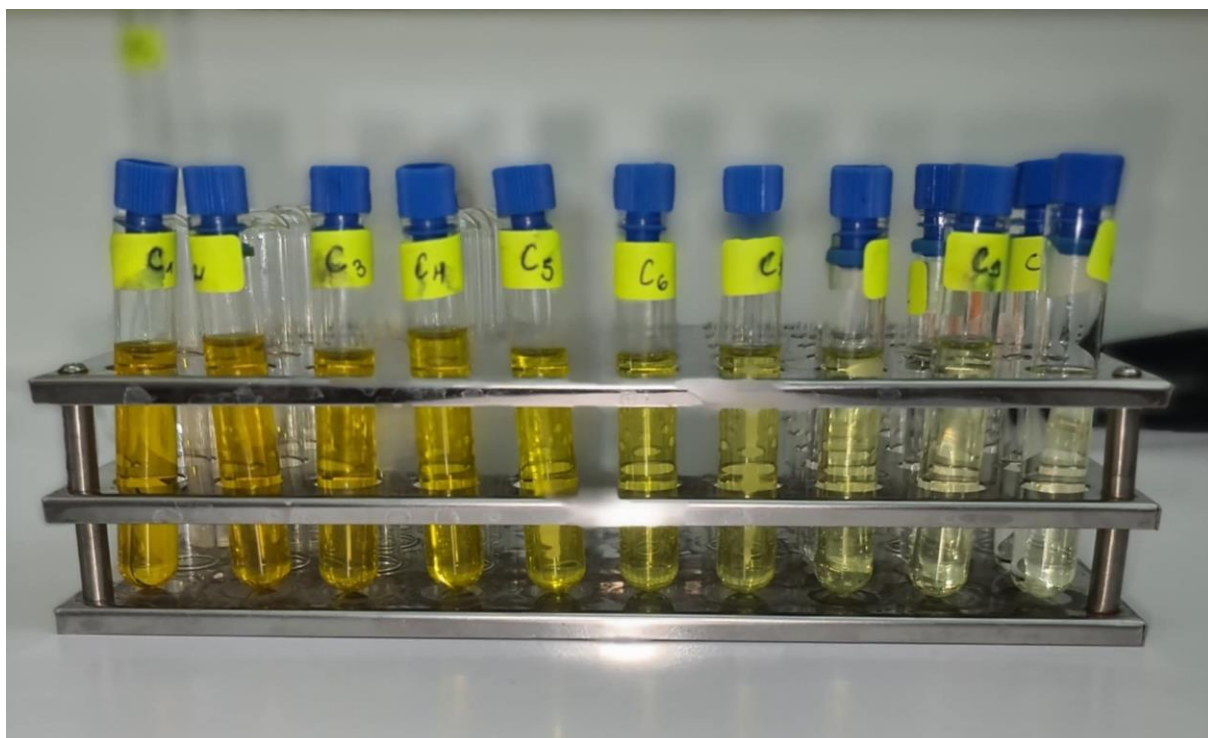


Figure 13 : Série d'étalonnage de la quercétine

7. Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'identification de la composition chimique de la fraction polaire de margine a été réalisée qualitativement par analyse chromatographique en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM).

Les analyses CG/SM ont été effectuées sur un système GC2010 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Le système d'analyse est équipé d'un injecteur à échantillonneur automatique et d'une colonne de séparation capillaire en silice fondue HP-5 (30 m x 0,25 mm i.d., df 0,25 μ m). L'hélium a été utilisé comme gaz vecteur à un débit constant de 28,8 ml/min et à une vitesse linéaire constante de 33,3 cm/s, ce qui correspond à une pression d'entrée de 43,6 kPa. La température de l'injecteur a été réglée à 250 °C. La température du four a été maintenue à 70°C pendant 5 minutes, puis augmentée à 250°C à une rampe de 3°C.min⁻¹. Les températures de l'interface et de la source d'ions étaient respectivement fixées à 250°C et 200°C. L'acquisition a été réalisée en mode balayage complet dans la gamme de masse 35 à 550 m/z, avec un intervalle de balayage de 0,2 s. L'extrait a été dissous dans le méthanol à une concentration de 10mg/mL puis 1 μ L a été injecté en mode division split avec un rapport de division (split ratio) de 1:50.

Le traitement des données est réalisé à l'aide du logiciel LabSolution ver. 5,97 (Shimadzu, Kyoto, Japon).

L'identification a été réalisée en appliquant deux filtres, une correspondance de similarité spectrale supérieure à 90 % et une correspondance de l'indice de rétention linéaire (IRL) calculée à l'aide d'une série d'homologues de n-alcanes saturés C7 et C40 (1000 g/ml, 49452-U) fournis par Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) avec une fenêtre de filtrage de ± 10 unités IRL. Une identification plus poussée a été réalisée sur la base des spectres de masse rapportés par des spécialistes [77]. Pour caractériser et identifier la composition chimique, les bases de données suivantes ont été utilisées : W11N17 (DB1) (Wiley11-Nist17, Wiley, Hoboken, NJ, USA ; et FFNSC 3.0 (DB2) (Shimadzu, Kyoto, Japon).

8. Évaluation de l'activité antioxydante de l'extrait et de la fraction polaire

8.1 Principe

Le test DPPH (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) est une méthode d'évaluation de l'activité antioxydante d'un extrait. Il consiste à mesurer sa capacité à neutraliser le radical libre DPPH[•], ce radical de couleur violette, subit une réduction en présence d'antioxydants, entraînant une décoloration vers le jaune. Cette diminution d'intensité de la couleur est proportionnelle à l'activité antioxydante, elle peut être quantifiée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 517 nm [78].

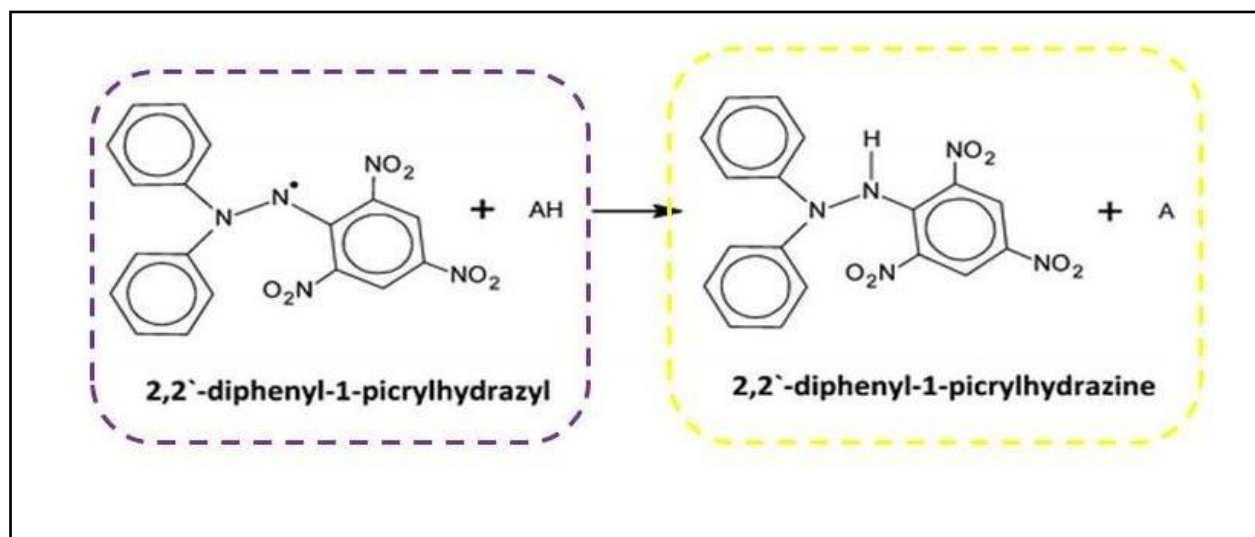


Figure 14 : Réaction d'un antioxydant avec le radical DPPH

L'activité antioxydante est définie par le pourcentage d'inhibition PI %, où l'absorbance du mélange réactionnel qui contient le radical libre et l'échantillon de l'antioxydant est reliée à l'absorbance du mélange sans aucun antioxydant avec l'équation 4

$$PI\% = \frac{\text{Abs blanc} - \text{Abs échantillon}}{\text{Abs blanc}} * 100 \quad (4)$$

Abs échantillon : Absorbance à 517 nm du mélange réactionnel (échantillon + DPPH).

Abs blanc : Absorbance à 517 nm (méthanol + DPPH).

8.2 Préparation des solutions

8.2.1 Solution de DPPH

Nous avons préparé une solution de DPPH à 4 % (4 mg dans 100 mL de méthanol). L'absorbance de la solution a été vérifiée à 517 nm et ajustée pour se situer entre 0,7 et 0,8. Toutes les étapes ont été réalisées à l'obscurité afin d'éviter toute dégradation photochimique du radical.

8.2.2 Solution de l'acide ascorbique

La solution de l'acide ascorbique a été préparée à une concentration de 1mg /mL dans le méthanol.

8.2.3 Evaluation de l'activité

Les échantillons testés ont été préparés à une concentration mère C1 égale à 1, 0.5, 0.25 mg/mL, pour l'acide ascorbique, l'extrait d'acétate et la fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée, respectivement. Chaque extrait a été réparti sur une ligne distincte d'une microplaque de 96 puits. Pour chaque échantillon, 140 µL de solution ont été déposés dans le premier puit, puis des dilutions sériées ont été réalisées à l'aide de méthanol. Ensuite, 280 µL de la solution de DPPH ont été ajoutés à chaque puit. Un blanc a été préparé en ajoutant uniquement du méthanol et du DPPH, sans échantillon. La microplaque a ensuite été incubée à l'obscurité pendant 30 minutes, et l'absorbance a été mesurée à 517 nm à l'aide d'un lecteur ELISA.

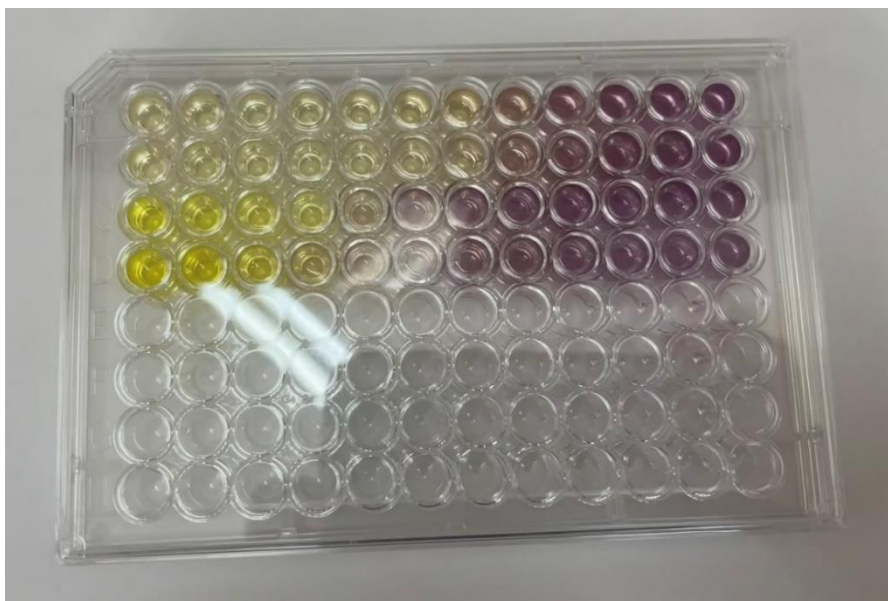


Figure 15 : Résultat de l'activité antioxydante

9. Synthèse verte et caractérisation des nanoparticules d'argent

9.1 Expériences préliminaires

Nous avons réalisé la synthèse des nanoparticules d'argent en testant deux concentrations de nitrate d'argent (AgNO_3) : 1 mM et 1 M, ainsi que deux concentrations de l'extrait végétal 1 mg/mL et 0,25 mg/mL. Pour chaque condition, une série de cinq tubes à essai a été préparée, chacun contenant un volume total fixe de 10 mL. Dans le tube 1, nous avons introduit 0,5 mL de l'extrait, complétés par 9,5 mL de la solution d' AgNO_3 . Le volume de l'extrait a ensuite été augmenté de 0,5 mL à chaque tube, jusqu'à atteindre 2,5 mL dans le tube 5, avec une diminution équivalente du volume d' AgNO_3 (7,5 mL). Chaque tube a été agité au vortex pendant 10 minutes. Ensuite, 500 μL d'une solution de NaOH ont été ajoutés dans chaque tube pour ajuster le pH à 11, suivis d'une agitation supplémentaire de 2 minutes au vortex.

La formation des nanoparticules a été suivie visuellement par le changement de couleur des solutions, afin de fixer les conditions optimales de synthèse.

9.2 Synthèse dans les conditions optimales

Dans un ballon rond à fond plat, nous avons introduit 5 mL d'un extrait aqueux à une concentration de 0,25 mg/mL. Parallèlement, 15 mL d'une solution de nitrate d'argent (AgNO_3) à 1 M ont été placés dans une ampoule à décanter. Le montage a été effectué de manière à permettre l'ajout goutte à goutte de la solution d' AgNO_3 dans le ballon sous agitation continue. Une fois toute la solution ajoutée, 500 μL de solution de NaOH ont été incorporés pour favoriser la formation complète des nanoparticules. Le suivi de la réaction a été réalisé par spectroscopie

UV-Visible afin de confirmer la formation des nanoparticules d'argent. La solution a ensuite été transférée dans des tubes et centrifugée pendant 30 minutes à 4500 tours par minute (rpm) à une température de 4 °C [79]. Le précipité obtenu a été lavé deux fois avec de l'eau distillée, puis séché dans une étuve à 50 °C pendant 24 heures. Enfin, les nanoparticules sèches ont été récupérées à l'aide d'une spatule à partir du verre de montre.



Figure 16 : Montage de la synthèse des nanoparticules

9.3 Caractérisation des nanoparticules d'argent

9.3.1 Spectrophotomètre UV-Visible

La réduction des ions Ag^+ a été évaluée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible. Pour cette analyse, 3 à 4 ml de la solution des nanoparticules ont été placés dans une cuvette en quartz avec un trajet optique de 1cm. L'absorbance a été mesurée sur une plage de longueurs d'onde de 300 à 600 nm.

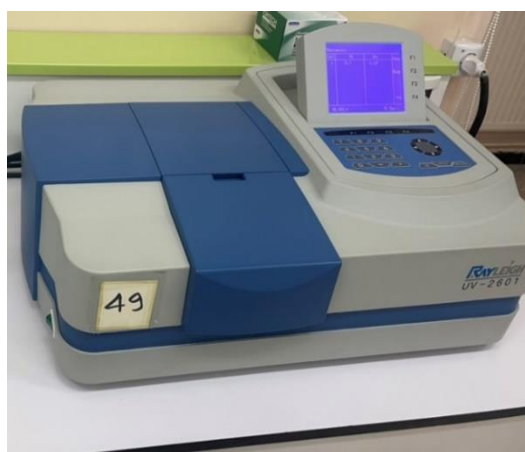


Figure 17 : Spectrophotomètre UV-Visible

9.3.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode ATR (Attenuated Total Reflectance) a été utilisée pour identifier les groupes fonctionnels présents dans la fraction polaire et les nanoparticules synthétisées. Cette technique rapide permet de déterminer la structure moléculaire en mesurant l'absorption du rayonnement infrarouge par les liaisons chimiques. Chaque groupe fonctionnel absorbe à une fréquence spécifique, produisant un spectre caractéristique en fonction du nombre d'ondes (cm^{-1}).

Toutes les mesures ATR-FTIR ont été réalisées à l'aide du spectromètre Nicolet iS10 équipé d'un accessoire Smart ITR avec cristal de diamant (Thermo Fisher Scientific, États-Unis).

Une petite quantité de la poudre des nanoparticules synthétisées, a été préalablement préparé dans le KBr, après directement déposée sur le cristal de l'ATR, tandis que, une petite quantité de la fraction polaire a été déposé directement sans traitement préalable. Le spectre infrarouge a ensuite été enregistré dans une gamme des nombres d'onde allant généralement de 4000 à 500 cm^{-1} , permettant l'identification des principales fonctions chimiques présentes dans les deux échantillons.



Figure 18 : Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier-ATR

9.3.3 Mesure de la taille des particules (DLS)

Le diamètre hydrodynamique des particules d'argent synthétisée à partir de la fraction volatile, et l'indice de polydispersité (PDI), ont été évalués à l'aide d'un appareil de diffusion dynamique de la lumière (HORIBA-[SZ-100], Japon). La taille des particules d'argent a été quantifiée par le diamètre moyen de la taille des particules dispersées (nm), tandis que la distribution des nanoparticules a été caractérisée par l'indice de polydispersité (PDI). Il est à noter que la mesure a été répétée deux fois.

Un traitement préalablement a été fait pour la mesure, consiste à faire dissoudre la poudre des nanoparticules d'argent dans le DMSO à une concentration de 0,1 mg/mL.

9.4 Activité antibactérienne

Dans ce travail, nous avons étudié l'efficacité antibactérienne de l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules d'argent. L'objectif est de voir si ces substances sont capables d'empêcher la croissance de certaines bactéries pathogènes. Pour cela, nous avons testé leur action sur quatre types de bactéries : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*. La méthode utilisée est celle de la micro-dilution en bouillon, qui permet de déterminer la plus faible concentration efficace (appelée CMI).

9.4.1 Microorganismes testés

Quatre souches bactériennes de référence ont été sélectionnées pour évaluer l'activité antibactérienne de l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules synthétisées. Ces souches, provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), ont été choisies en raison de leur importance en matière de santé publique et de leur capacité à représenter à la fois les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Leur identification est présentée dans le tableau 4 :

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées

Souches	Gram	Références (ATCC)
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	-	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	-	27853
<i>Staphylococcus aureus</i> (<i>S. aureus</i>)	+	25923
<i>Enterococcus faecium</i> (<i>E. faecium</i>)	+	29202

9.4.2 Préparation du milieu de culture

Le milieu de culture Luria-Bertani (LB) a été préparé en dissolvant 12.5 g de poudre LB dans 500 mL d'eau distillée sous agitation jusqu'à dissolution complète. Le pH a été ajusté à 7 à l'aide d'une solution de l'hydroxyde de sodium NaOH (1M), puis le milieu a été stérilisé par autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

9.4.3 Préparation des précultures

À partir des cultures jeunes préparées, nous avons prélevé quelques colonies bactériennes que nous avons transférées dans 50 mL de milieu de culture liquide LB stérile. Les inoculums ainsi préparés ont été incubés dans un agitateur orbital (shaker) à 37 °C pendant 24 heures. À l'issue de l'incubation, la densité optique de chaque suspension microbienne a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 625 nm. La densité obtenue correspond à une absorbance de 0.08, indiquant une concentration cellulaire optimale pour les tests à venir.

9.4.4 Test de la CMI par micro dilution

Les solutions mères de l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules ont été préparées à une concentration de 10 mg/mL dans du diméthyle sulfoxyde DMSO stérile. Ensuite nous avons rempli le premier puit de chaque ligne de la microplaque 96 puits avec 300 µL de bouillon LB. Les 11 puits suivants ont été remplis avec 150 µL de bouillon LB. 30 µL ont été retirés du premier puit, et remplacés par 30 µL de la solution testée (extrait d'acétate, fraction polaire et nanoparticules). Une série de dilutions successives au rapport (1/2) a été réalisée manuellement de puit en puit jusqu'au dixième, permettant d'obtenir une gamme de concentrations décroissantes. Le onzième puit a été utilisé comme contrôle négatif, contenant uniquement du milieu LB (Luria-Bertani), sans ajout d'extrait, ni des nanoparticules, ni de suspension bactérienne. Le douzième puit a servi de contrôle positif, contenant uniquement le milieu LB et la suspension bactérienne. Ensuite, nous avons ajouté 20 µL de la suspension bactérienne dans chaque puit. La plaque a été incubée à 37 °C pendant 24 heures. Ce protocole a été appliqué à chacune des souches bactériennes testées.



Figure 19 : Préparation de la préculture

PARTIE 03
RÉSULTATS ET DISCUSSION

1. Caractéristiques organoleptiques des échantillons

Dans cette étude, trois critères ont été pris en considération pour évaluer les caractéristiques organoleptiques des échantillons analysés : l'aspect, la couleur et l'odeur. Ces propriétés permettent une première évaluation visuelle et sensorielle des produits avant les analyses approfondies.

Tableau 5 : Caractéristiques organoleptiques des échantillons

Échantillon	Aspect	Couleur	Odeur
Extrait acétate	Liquide visqueux	Brun foncé	Odeur caractéristique
Fraction polaire	Liquide visqueux	Brun clair	Odeur caractéristique

2. Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction à l'acétate d'éthyle obtenu à partir de 1Kg de la margine brute est égale à 0.48 %. Cette valeur se trouve dans l'intervalle des valeurs rapportées par la littérature, à savoir 0.3 – 0.6 % [80].

Le rendement de la fraction polaire à partir de 5g d'extrait d'acétate est égale à 2%.

3. Analyse quantitative des extraits

3.1 Teneur en composés phénoliques totaux (TPC)

La détermination de la teneur en composés phénoliques totaux (TPC) des extraits obtenu a été effectuée selon la méthode de Folin-Ciocalteu, la quantification a été effectuée par comparaison avec une courbe d'étalonnage établie à partir de solution standard d'acide gallique (Figure 19), les résultats obtenus sont exprimés en milligrammes Équivalents Acide Gallique (EAG) par gramme d'extrait sec (mg EAG/g d'extrait).

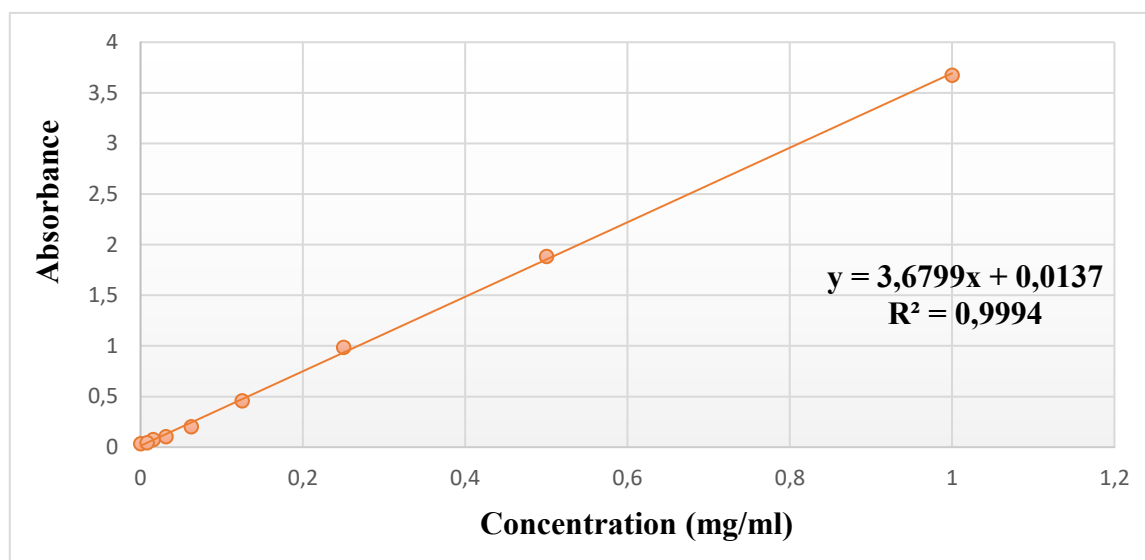


Figure 20 : Variation de l'absorbance d'acide gallique en fonction de la concentration

La concentration Équivalents Acide Gallique (mg EAG/g) a été obtenue par extrapolation de l'absorbance mesurée de la fraction polaire et de l'extrait d'acétate sur cette courbe, cette méthode permet ensuite le calcul de la teneur en mg EAG par gramme d'extrait sec.

Lors de l'analyse par le réactif de Folin-Ciocalteu, une différence visuelle nette a été observée entre les deux extraits. L'intensité de la couleur est un indicateur qualitatif fiable de la richesse en composés phénoliques. La fraction polaire obtenue selon la méthode de Bligh & Dyer modifiée a présenté une coloration bleu foncé intense, tandis que l'extrait de l'acétate d'éthyle a montré une teinte bleue plus claire et moins marquée. Cette différence de coloration reflète la concentration relative en composés phénoliques. Plus la couleur est foncée, plus l'extrait est riche en agents réducteurs (polyphénols).



Figure 21 : Coloration de l'extrait par le réactif de F-C

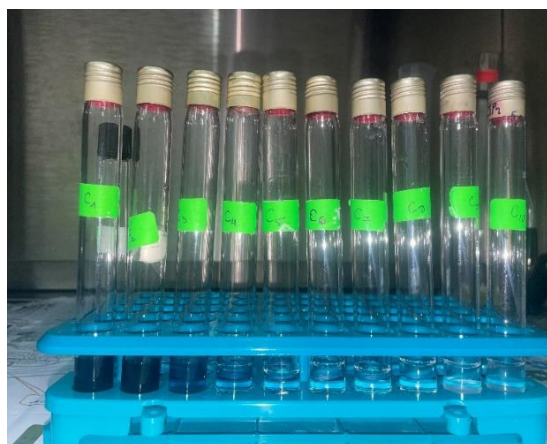


Figure 22 : Solutions de l'acide gallique avec le réactif de F-C à différentes concentrations

Ces observations sont confirmées par les résultats quantitatifs du contenu total en polyphénols (TPC). La fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée a présenté une valeur de 802.75 mg EAG/g d'extrait, tandis que celui obtenu par l'acétate d'éthyle a atteint seulement 331.5 mg EAG/g. Des travaux antérieurs sur des extraits de margines ont montré des valeurs de TPC de 291.25 mg EAG/g et 122.34 mg EAG/g [81], et 373.21 mg EAG/g [82]. La valeur obtenue dans notre étude est du même ordre de grandeur que dans le cas de certains travaux et nettement inférieure que celle d'autres. Il faut souligner que le TPC dépend de plusieurs paramètres, notamment la région de récolte des olives, la pluviométrie et le climat et la nature du sol [83]. Concernant la fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée, nous n'avons pas retrouvé dans la littérature des travaux similaires. Cette différence de TPC suggère que la fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée est majoritairement constituée de composés phénoliques, traduisant une extraction plus sélective des polyphénols. En revanche, l'extrait de l'acétate, issu d'un solvant semi-polaire, contient un mélange plus complexe de composés, incluant non seulement des polyphénols, mais également des acides gras, des tanins et d'autres métabolites secondaires. Cette composition mixte explique la différence des valeurs en TPC observée entre les deux extraits.

3.2 Teneur en flavonoïdes totaux (TFC)

La détermination de la teneur en flavonoïdes totaux (TFC) de l'extrait a été réalisée selon la méthode colorimétrique à l'aluminium, la quantification a été effectuée par comparaison avec une courbe d'étalonnage (Figure 22) établie à partir de solutions standards de quercétine. Les résultats sont exprimés en milligrammes équivalents de quercétine par gramme d'extrait sec (mg EQ/g d'extrait).

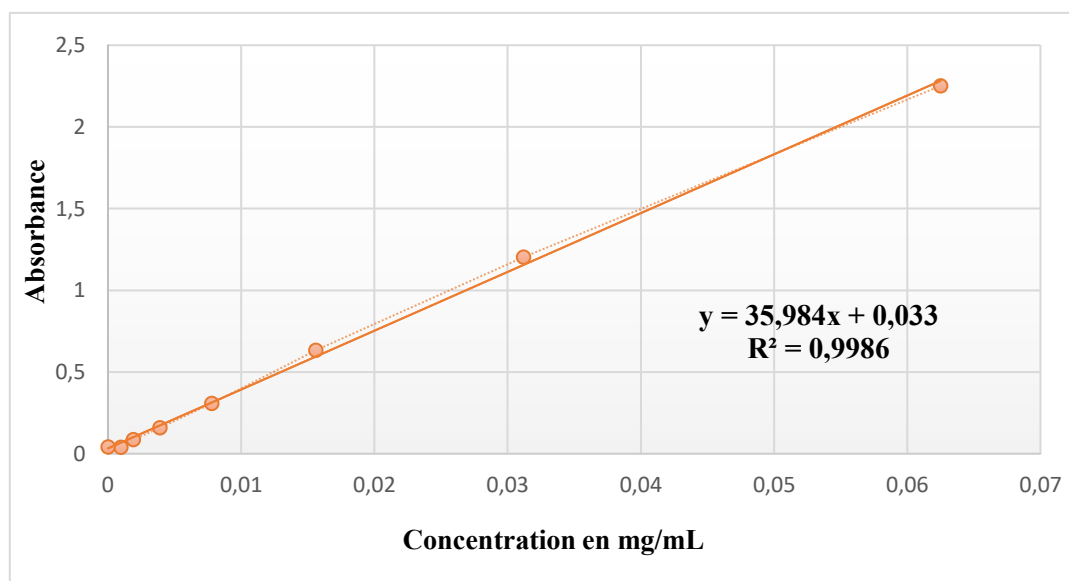


Figure 23 : Variation de l'absorbance de la quercétine en fonction de la concentration

La concentration en Équivalents Quercétine (mg EQ/g) a été obtenue par extrapolation de l'absorbance mesurée des extraits sur cette courbe, cette méthode permet ensuite le calcul de la teneur en mg EQ par gramme d'extrait sec.

L'analyse de la teneur en flavonoïdes totaux (TFC) a révélé une différence marquée entre l'extrait de margine et la fraction polaire. En effet, la fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée présente une teneur en flavonoïdes de 11.06 mg EQ/g d'extrait, nettement plus élevée que celle de l'extrait brut de l'acétate, dont la valeur est de 1.834 mg EQ/g d'extrait. Cette différence s'explique principalement par la nature des composés extraits par chaque méthode. La méthode de Bligh & Dyer modifiée, basée sur une extraction biphasique (chloroforme/méthanol/eau), est conçue pour isoler de manière efficace les composés polaires, notamment les polyphénols, dont les flavonoïdes constituent une sous-classe importante. Cela justifie à la fois la forte teneur en polyphénols totaux et la présence significative de flavonoïdes dans la fraction polaire. Cependant, l'extrait d'acétate est chimiquement plus complexe. Il contient un mélange hétérogène de composés, y compris des substances moins polaires, ce qui diminue la proportion relative des flavonoïdes. La littérature montre des valeurs de 80.6 et 75.8 [81] et 3.8 mg EQ/g [84]. Il est bien clair que les valeurs obtenues dans le présent travail sont relativement inférieures à celle de la bibliographie. Cette différence, notable, est liée à plusieurs facteurs comme rapportée précédemment.

4. Activité antioxydante

Les résultats du pourcentage d'inhibition du radical libre DPPH par extrait d'acétate et la fraction polaire sont illustrés dans la Figure 24. Ces résultats sont comparés aux pourcentages d'inhibition par un puissant antioxydant (acide ascorbique), utilisé dans cette étude comme standard (Figure 23).

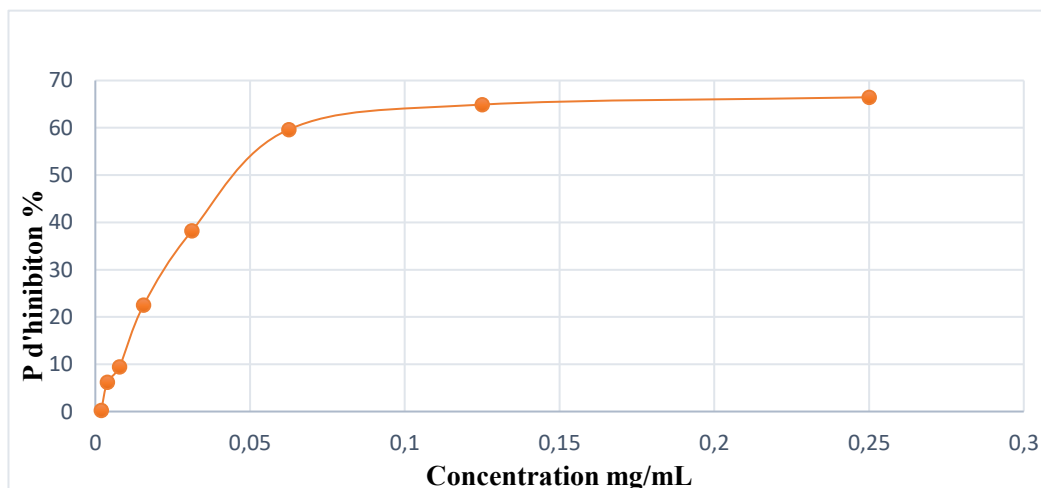


Figure 24 : Variation de pourcentage d'inhibition d'acide ascorbique en fonction de la concentration

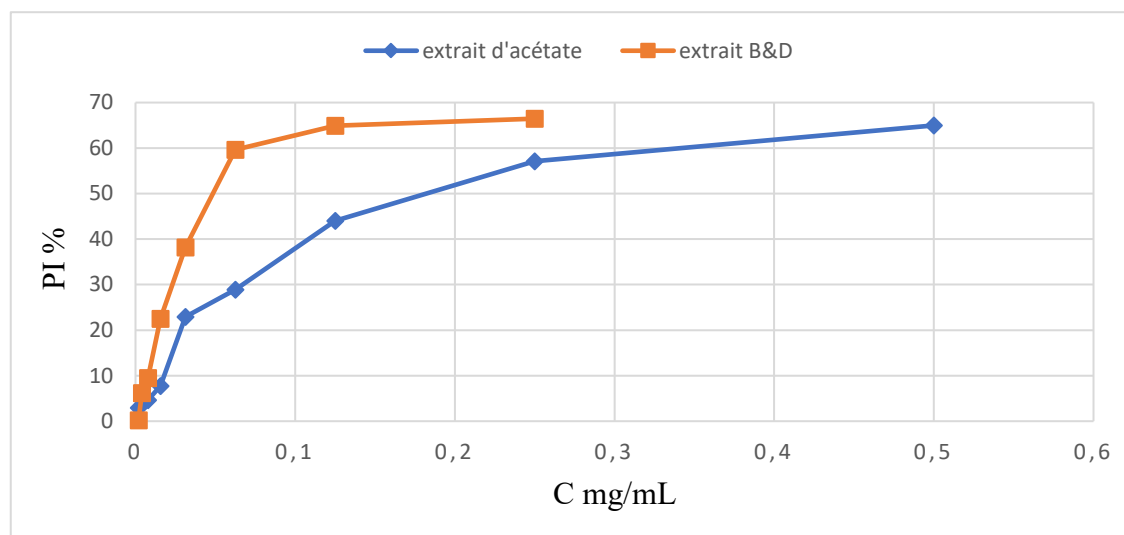


Figure 25 : Variation du taux de piégeage du DPPH• par l'extrait d'acétate et la fraction polaire en fonction de la concentration

L'évaluation comparative de l'activité antioxydante révèle des variations significatives en fonction du type d'extrait analysé. L'acide ascorbique, utilisé comme composé de référence, a démontré une IC₅₀ extrêmement faible et égale à 0.0147 mg/mL, indiquant ainsi une capacité antiradicalaire très élevée. Cette efficacité remarquable s'explique par plusieurs facteurs, notamment sa structure chimique simple, sa solubilité dans l'eau et sa capacité à céder rapidement des électrons ou des atomes d'hydrogène aux radicaux libres. La fraction polaire obtenue par la méthode de Bligh & Dyer modifiée a également présenté une bonne activité antioxydante avec une valeur de IC₅₀ = 0.048 mg/mL, ce qui s'explique par sa richesse en composés phénoliques polaires, notamment les polyphénols et les flavonoïdes, reconnus pour leur aptitude à piéger les radicaux libres grâce à leurs nombreux groupements hydroxyles. En revanche, l'extrait d'acétate présente une valeur de IC₅₀ plus élevée, 0.192 mg/mL, traduisant ainsi une activité antioxydante plus modeste. Cette différence des valeurs de la fraction polaire et d'extrait peut être attribuée à la composition chimique, l'extrait d'acétate d'éthyle contenant à la fois un mélange des composés semi-polaire tel que les tanins, les acides gras et d'autres métabolites secondaires, et certains de ces composés peuvent présenter une activité antioxydante moindre, ou interagir de manière défavorable avec le radical DPPH, réduisant ainsi l'efficacité globale de l'extrait. En effet, certaines études antérieures sur des extraits de margines par l'acétate ont rapporté des valeurs d'IC₅₀ allant de 0.03 à 0.09 mg/mL [81], Cette variabilité peut s'expliquer par les différences dans la composition chimique des extraits, influencée par les conditions d'extraction, la polarité du solvant et l'origine de la biomasse. Par ailleurs, un extrait méthanolique obtenu par macération a présenté une IC₅₀ de 0.16 mg/mL [85], valeur proche de celle obtenue avec l'extrait d'acétate, corroborant ainsi l'impact du choix du

solvant sur le profil bioactif et l'efficacité antioxydante. Ces observations soulignent l'importance cruciale de la sélection des procédés d'extraction pour maximiser la récupération des composés phénoliques et optimiser l'activité antioxydante des extraits.

5. Analyse par Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/SM)

Le tableau 6 regroupe les composés identifiés, les indices de rétention calculés et ceux fournis par la littérature, le pourcentage d'aires (% en masse), la formule brute, la masse molaire. Les produits non identifiés ont été décrits par le rapport m/z et le pourcentage de chaque fragment.

Tableau 6 : Composition chimique de la fraction polaire de la margine

Num	Composé	IR cal	IR lit	Aire %	Formule	Masse molaire
1	2-butoxyéthanol	908	905	0.61	C ₆ H ₁₄ O ₂	118
2	Catechol	1207	1197	3.10	C ₆ H ₆ O ₂	110
3	2,3-dihydrobenzofurane	1223	1226	0.89	C ₈ H ₈ O	120
4	4-ethylguaïacol	1320	1303	0.94	C ₉ H ₁₂ O ₂	152
5	4-Ethyl catechol	1391	1392	5.94	C ₈ H ₁₀ O ₂	138
6	Tyrosol	1434	1427	29.76	C ₈ H ₁₀ O ₂	138
7	NI 1	1415	0.67%	41(21.66%) 79(47.34%) 95(8.69%) 109(100%); 140(11.19%) 168(50%)		
8	3,5-Dimethylanisole	1451	1096	0.92	C ₉ H ₁₂ O	165
9	2,4-Di-tert-butylphénol	1517	1518	0.55	C ₁₄ H ₂₂ O	206
10	Alcool homovanillique	1537	1530	1.27	C ₉ H ₁₂ O ₃	168
11	NI 2	1656	5.52%	41(29.03%); 79(36.22%); 95(39.30%); 125(100%); 138(15.1%); 166(25.80%); 183(11.31%)		

12	NI 3	1707	1.02%	53(36.4%); 79(100%); 105(79.9%); 150(45.74%); 164(19.81%); 178(56.20%); 210(14.50%)
13	NI 4	1804	1.30%	41(40.92%); 67(100%); 95(42.02%); 125(62.78%); 138(43.94%); 166(77.62%); 184(11%)
14	NI 5	1827	1.48%	55(23.48%); 79(41.87%); 93(22.78%); 109(22.94%); 137(18.49%); 179(5.65%); 197(100%); 210(3.44%)
15	NI 6	1014	5.86%	55(75.48%); 79(100%); 95(56.62%); 125(94.23%); 151(38.82%); 178(29.96%); 182(46.56%); 210(16.62%)
16	NI 7	1933	2.49%	55(64.06%); 79(100%); 95(55.25%); 125(64.24%); 150(32.15%); 168(24.68%); 197(54.43%); 210(19.89%)
17	NI 8	1973	1.05%	55(67.40%); 79(100%); 95(67.57%); 108(56.94%); 137(51.15%); 168(29.02%); 196(11.51%)

IR lit : Indice de Rétention Linéaire rapporté dans la littérature, IR cal : Indice de Rétention Linéaire calculés par le logiciel, NI : Composé non identifié

L'analyse par CG/SM de la fraction polaire a permis d'identifier 9 composés, la majorité des composés appartiennent à la classe des polyphénols, notamment des dérivés du benzène substitué tels que le méthoxybenzène, le benzènediol et d'autres phénols alkylés, confirmant la richesse en composés phénoliques. La présence de dérivés de benzofurane ainsi que d'esters et d'alcools primaires a également été relevée, ce qui témoigne de la complexité chimique de la fraction polaire obtenue. Ce résultat pourrait être à l'efficacité de la méthode d'extraction employée pour cibler cette classe spécifique de métabolites secondaires. La présence majoritaire des polyphénols est particulièrement intéressante dans le cadre de la synthèse verte des nanoparticules d'argent. En effet, ces composés sont reconnus pour leur double rôle, d'une part en tant qu'agents réducteurs, capables de convertir les ions Ag^+ en argent métallique (Ag^0), et d'autre part comme agents stabilisants empêchant l'agrégation des nanoparticules et contribuant à leur stabilité colloïdale.

La composition chimique est dominée par le tyrosol, avec une aire d'environ 29.76 %. Ce composé appartient à la famille du type $\text{C}_6\text{-C}_2$, caractérisée par un noyau aromatique substitué par une chaîne à deux atomes de carbone. Le tyrosol, rencontré dans plusieurs huiles essentielles et extraits [86], est un antioxydant majeur, connu pour sa capacité à piéger les radicaux libres [87], protéger les membranes cellulaires et doté d'une forte activité antimicrobienne [88] et antiinflammatoire [89]. Sa biosynthèse passe par la tyrosine, un produit obtenu à partir du

chorismate, via une transamination, décarboxylation et une réduction jusqu'à la formation du tyrosol (Figure 25).

Plus du tyrosol, d'autres produits phénoliques ont été identifiés, à savoir : le catéchol (3.10 %), un dihydroxybenzène (C₆), à fort pouvoir antioxydant [90]. Le 4-Ethyl catéchol (5.9%) fait partie de la famille des catéchols, qui sont des composés comportant deux groupes hydroxyle sur les carbones adjacents d'un anneau de benzène, reconnu pour ses propriétés antioxydante, antiinflammatoire et anticancéreuses [91]. Le 4-ethyl-guaiacol (0.94 %), issu du métabolisme du coniféryl alcool, combine une structure de type C₆-C₂ avec un groupement méthoxy en position ortho, ce qui modifie ses propriétés électroniques et sa réactivité [92], il est doté d'activités antimicrobienne et antioxydante [93]. Le benzofurane-2,3-dihydro (0.89 %), composé hétérocyclique, bien que moins polaire, pourrait également contribuer à l'effet antimicrobien global [94]. Enfin, le 2-butoxyéthanol (0.61 %) est un éther aliphatique qui semble d'origine exogène ou résiduelle [95].

L'examen du tableau 6 révèle que la totalité des composés identifiés (1-6 & 8-10) sont de nature phénolique, appartenant majoritairement aux familles C₆, C₆-C₁ et C₆-C₂, dérivées de la voie du shikimate [96]. Cette composition reflète une orientation métabolique vers la production de métabolites secondaires bioactifs, dotés de fortes propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et protectrices.

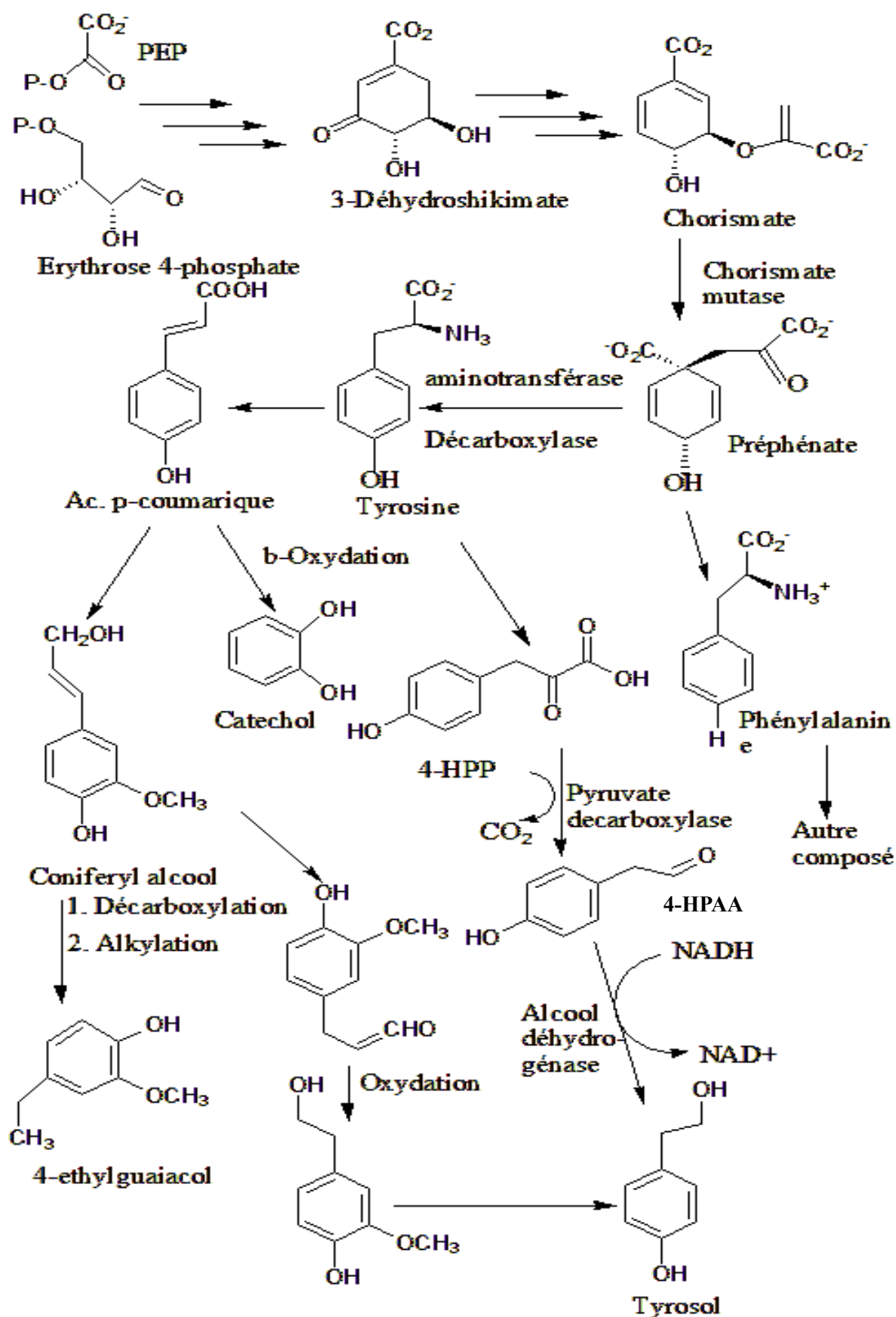


Figure 26 : Interconnexion des voies de biosynthèse des composé chimiques présentes dans la fraction polaire

6. Synthèse des nanoparticules d'argent

La synthèse des nanoparticules d'argent a été optimisée en testant différentes concentrations de la fraction polaire et de nitrate d'argent. Les conditions optimales ont été obtenus avec une concentration de 0.037 mg/mL d'extrait et 1 mol/L de AgNO_3 , dans un volume final de 10 mL, contenant 1.5 mL d'extrait et 8.5 mL de solution de nitrate d'argent. Avant l'ajustement du pH, le mélange réactionnel présente une couleur claire et une apparence colloïdale, indiquant que la réduction des ions Ag^+ n'a pas encore eu lieu de manière significative. L'ajout de l'hydroxyde de sodium permet d'augmenter le pH de la solution jusqu'à 11, condition essentielle pour activer les groupements réducteurs présents dans l'extrait végétal. Immédiatement après l'ajustement du pH [55], un changement de couleur notable a été observé : la solution vire de la couleur transparente à une teinte brun foncé, ce qui indique la formation des nanoparticules d'argent.



Figure 27 : Différentes essais de la synthèse des nanoparticules



Figure 28 : Etape de l'ajout du NaOH

Après la synthèse, les nanoparticules d'argent formées ont été récupérées par centrifugation, une étape essentielle pour séparer efficacement les nanoparticules solides du surnageant. Le lavage à l'eau distillée a ensuite éliminé les impuretés résiduelles, telles que les ions n'ayant pas réagis et les composés solubles de l'extrait végétal, améliorant ainsi la pureté des nanoparticules.



Figure 29 : Le milieu réactionnel des nanoparticules après centrifugeuse

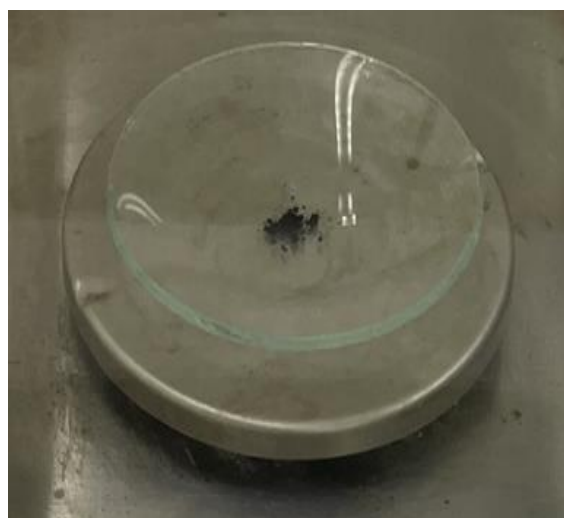


Figure 30 : Nanoparticules d'argent

6.1 Caractérisation structurale

6.1.1 UV-Visible

La formation des nanoparticules d'argent a été confirmée par spectrophotométrie UV-Visible (Figure 30), à travers l'apparition d'un pic d'absorbance large autour de 440 nm, caractéristique de la résonance plasmonique de surface (SPR). Ce résultat indique la réduction efficace des ions d'argents en nanoparticules d'argent (AgNPs) par la fraction polaire. Selon la littérature, les pics d'absorbance caractéristiques des nanoparticules d'argent apparaissent généralement dans la plage de 400 à 450 nm [97–98]. Cette variation dépend notamment de la taille et de la distribution des particules formées. Plusieurs études ont démontré que la synthèse d'AgNPs à partir de différents extraits végétaux entraîne la formation de particules de tailles diverses, influençant ainsi la position du pic SPR observé [55].

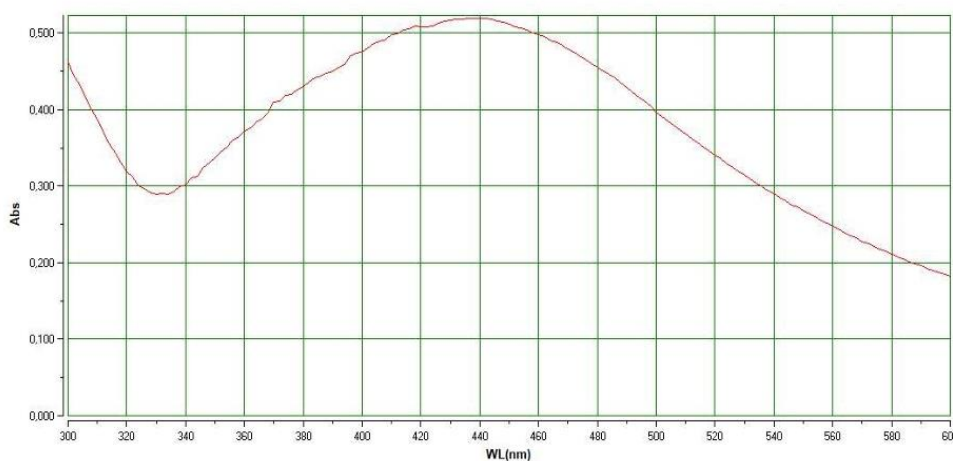
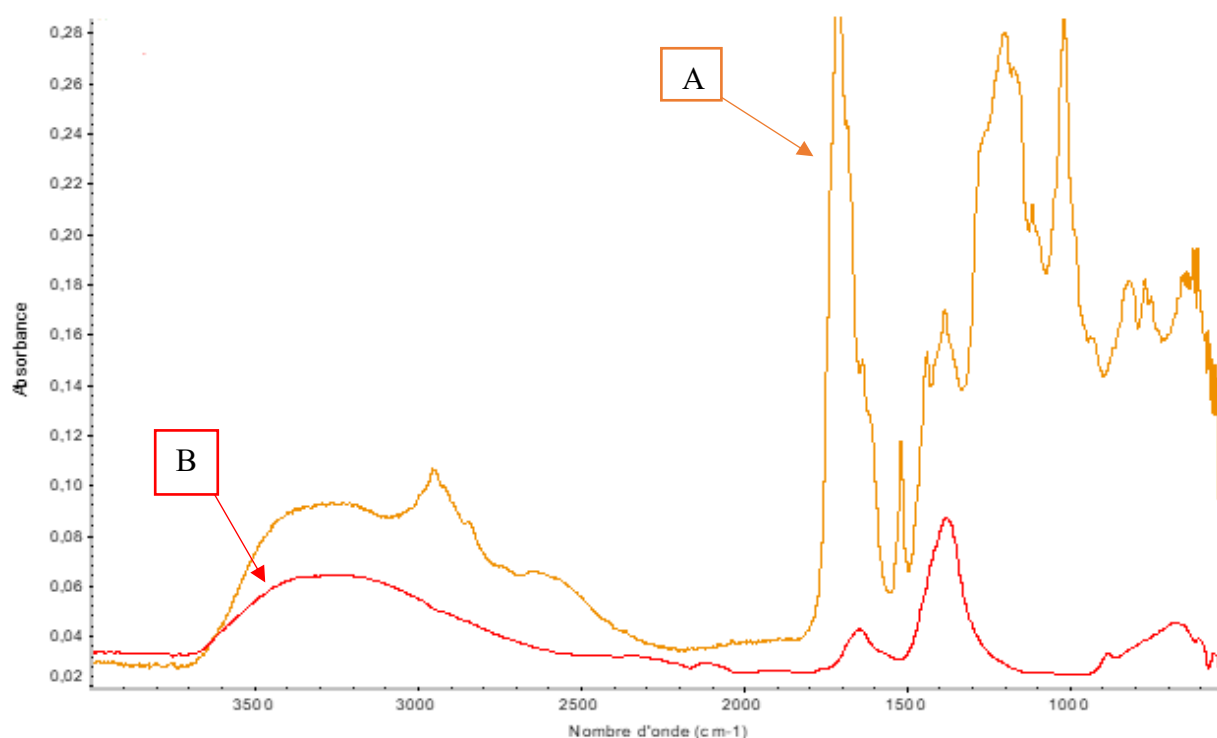


Figure 31: Spectres UV-Visible des nanoparticules d'argent

6.1.2 Spectrophotomètre FT-IR



A : Spectre de la fraction polaire

B : Spectre des nanoparticules d'argent

Figure 32 : Spectres FTIR de la fraction polaire et des nanoparticules d'argent

L'analyse comparative des spectres FTIR de la fraction polaire et des nanoparticules d'argent met en évidence plusieurs modifications structurales traduisant l'implication de biomolécules dans la synthèse des nanoparticules. La bande large autour de 3400 à 3448 cm^{-1} , attribuée aux vibrations d'élongation O–H (alcools, phénols), est plus intense dans la fraction polaire, cette intensité est moins marquée dans le spectre des nanoparticules, indique une consommation partielle de ces groupes, ce qui confirmant leur rôle en tant qu'agents réducteurs et stabilisants [99]. Les bandes situées entre 2920 et 2850 cm^{-1} , attribuées aux liaisons C–H aliphatiques, deviennent très faibles, suggérant des modifications des chaînes carbonées. La diminution de l'intensité de la bande située entre 1553 et 1854 cm^{-1} dans le spectre des nanoparticules, par rapport à celui de la fraction polaire, suggère une interaction directe entre les groupements carbonyles ($\text{C}=\text{O}$, COO^-) et l'argent comme le confirment des travaux antérieurs [100].

Les bandes situées entre 1495 et 1553 cm^{-1} apparaissent dans les deux spectres et sont attribuées aux vibrations d'élongation des doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ aromatiques. Leur présence confirme la

nature aromatique de certains composés présents dans la fraction polaire, notamment les flavonoïdes (TFC élevée), caractérisés par des noyaux benzéniques. Ces composés sont encore détectables dans le spectre des nanoparticules, suggérant qu'ils sont impliqués dans la stabilisation des NPs par adsorption à leur surface.

Les zones de 950 à 1300 cm^{-1} et 1000 à 1200 cm^{-1} sont bien marquées dans le spectre de la fraction polaire, témoignant de la richesse en composés oxygénés tels que les polyphénols ou les tanins. Leur disparition dans le spectre des nanoparticules d'argent indique leur implication directe dans la réduction des ions argent et/ou leur adsorption initiale à la surface des NPs, suivie d'un réarrangement ou d'une désorption après formation.

Enfin, les bandes caractéristiques situées à 618 cm^{-1} et 558 cm^{-1} , quasiment invisibles dans le spectre de la fraction polaire mais nettement visibles dans celui des nanoparticules, sont attribuées aux vibrations de liaison métal-oxygène (Ag-O). Ces bandes suggèrent la formation effective d'une interaction entre les groupements oxydés des biomolécules et les atomes d'argent réduits, constituant ainsi une preuve spectroscopique directe de la formation des nanoparticules d'argent [101].

6.1.3 Diffraction des Rayons X (DRX)

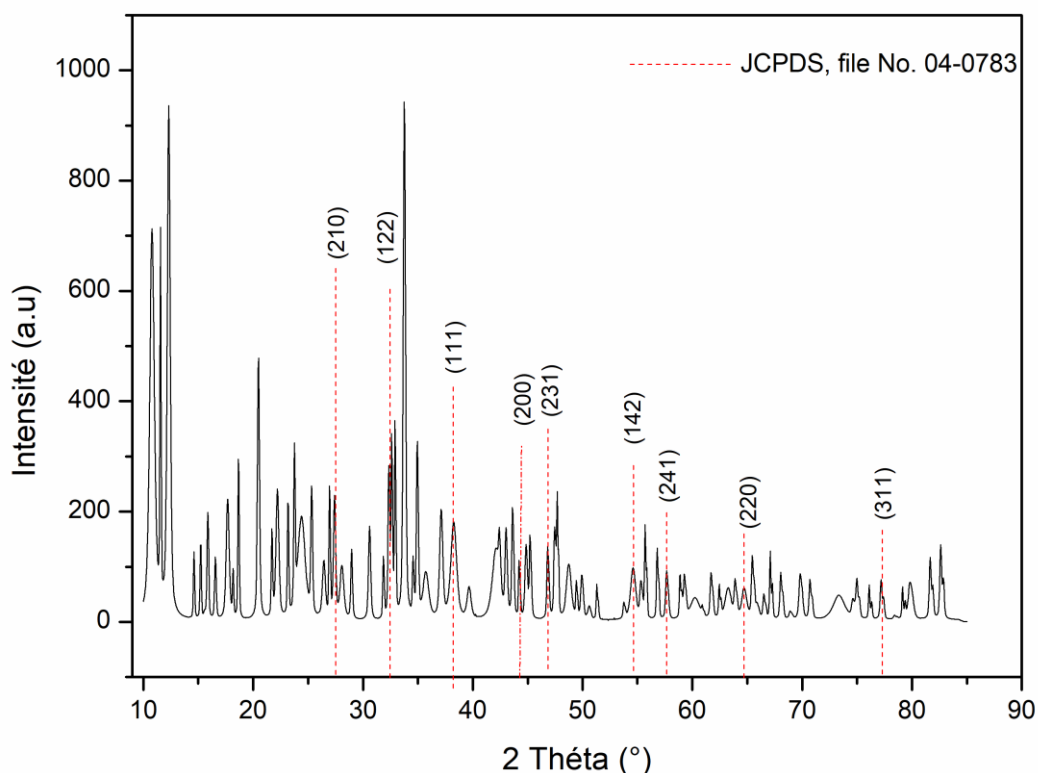


Figure 33 : Spectre de diffraction des rayons X des nanoparticules d'argent

La figure 33 représente le diffractogramme des rayons X des nanoparticules d'Argent réduites par la fraction polaire. On observe deux pics à 33° et 38° . Ces pics sont indexés respectivement aux plans réticulaires (122) et (111) de l'argent pur, ce qui confirme une structure cubique à faces centrées (CFC), conformément à la fiche JCPDS n° 04-0783 [102]. Les résultats de DRX démontrent clairement la nature cristalline des nanoparticules d'argent synthétisées par voie verte comme décrit précédemment.

La taille des nanoparticules d'argent a été calculée en utilisant l'équation de Debye-Scherrer :

$D = 0.9\lambda / (\beta \cos \theta)$, où D est la taille des cristallites, λ la longueur d'onde des rayons X, β la largeur à mi-hauteur du pic de diffraction, et θ l'angle de Bragg. La taille des nanoparticules d'argent obtenues est estimée à environ 42,19 nm, calculée à partir de la largeur du pic de réflexion le plus intense (122).

6.1.4 Mesure de la taille des particules (DLS)

La DLS est l'une des techniques les plus polyvalentes utilisées pour l'identification de la taille des nanoparticules. La distribution moyenne de la taille des particules d'argent synthétisées est indiquée dans la figure 35.

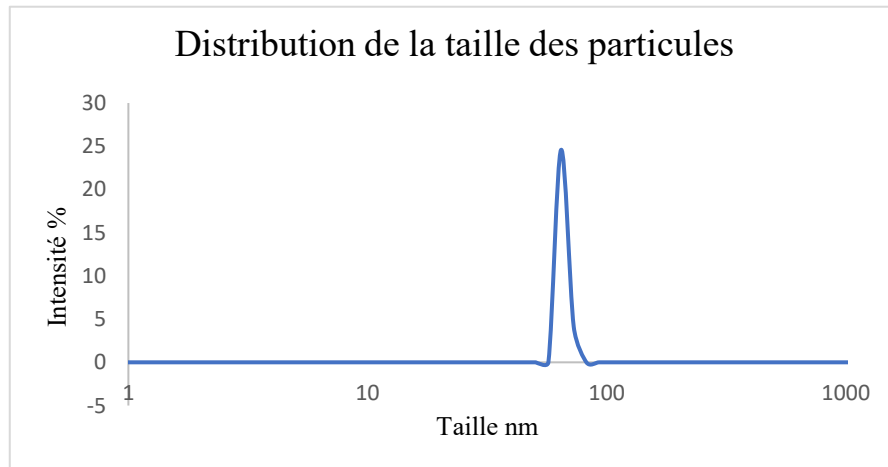


Figure 35 : Profil DLS de la distribution de taille des nanoparticules d'argent synthétisées.

L'étude menée par DLS a permis de mettre en évidence le fait que les nanoparticules d'argent, synthétisées à partir de la fraction polaire, s'inscrivent effectivement dans l'échelle nanométrique. En effet, la taille moyenne de ces particules a été déterminée à 61,8 nm, tandis que la valeur de l'indice de polydispersion s'est avérée égale à 1,3. Le pic unique indique la distribution uniforme des nanoparticules [103].

Les résultats obtenus présentent une faible concordance avec les estimations réalisées par le DRX, mais ils sont acceptables car la DLS ne mesure que le diamètre et non la taille réelle des nanoparticules. Cela peut inclure non seulement la particule elle-même, mais aussi une couche de solvant ou enrobage. La valeur de PDI élevée est probablement dû à une forte agrégation, et une hétérogénéité du système (mauvaise dispersion des nanoparticules dans le solvant).

6.2 Activité antibactérienne

6.2.1 Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate

L'extrait d'acétate a démontré une activité antibactérienne différenciée selon les souches testées. Les bactéries à Gram positif, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecium*, se sont révélées particulièrement sensibles, avec une concentration minimale inhibitrice (CMI) de 2,5 mg/mL, suggérant une bonne efficacité de l'extrait contre ces souches. À l'inverse, les bactéries à Gram négatif ont montré une résistance plus marquée. *Escherichia coli* a présenté une sensibilité modérée (CMI = 5 mg/mL), tandis que *Pseudomonas aeruginosa* a été la plus résistante, avec une CMI élevée de 10 mg/mL.

6.2.2 Activité antibactérienne de la fraction polaire

Les résultats montrent que la fraction polaire possède une activité inhibitrice variable selon la souche bactérienne testée. La meilleure efficacité a été observée contre *Staphylococcus aureus* (SA) et *Enterococcus faecium* (EF), toutes deux sensibles avec une CMI de 2.5 mg/mL, indiquant une sensibilité modérée de ces bactéries à l'extrait. *Pseudomonas aeruginosa* (PA) a présenté une CMI de 5 mg/mL, tandis que *Escherichia coli* (EC) a été la moins sensible, avec une CMI élevée de 10 mg/mL, traduisant une faible activité antibactérienne de la fraction polaire sur cette souche.

6.2.3 Activité antibactérienne des nanoparticules

Les nanoparticules synthétisées à partir de la fraction polaire des margines ont montré une activité antibactérienne marquée, avec des concentrations minimales inhibitrices (CMI) significativement plus faibles que celles de la fraction polaire. La meilleure activité inhibitrice a été observée contre *Staphylococcus aureus* (SA), une bactérie à Gram positif, avec une CMI de 0,078 mg/mL, indiquant une très forte sensibilité. *Enterococcus faecium* (EF), également à Gram positif, a montré une sensibilité marquée avec une CMI de 0.156 mg/mL, identique à celle observée pour *Pseudomonas aeruginosa* (PA), une bactérie à Gram négatif. Enfin,

Escherichia coli (EC) a présenté une CMI de 0.321 mg/mL, traduisant une efficacité inhibitrice toujours présente, bien que légèrement moindre.

6.2.4 Evaluation comparative de l'activité antibactérienne entre l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules d'argent

Le tableau 7, présente les valeurs de CMI obtenues pour l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules d'argent, testés contre différentes souches bactériennes.

Tableau 7 : Activité antibactérienne de l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules d'argent (CMI en mg/mL)

	Extrait d'acétate	Fraction polaire	Nanoparticules	Rapport d'amélioration (Extrait / NPs) (Fraction / NPs)
<i>Staphylococcus aureus</i> (SA)	2,5	2,5	0,078	32× (par rapport extrait) (par rapport fraction)
<i>Enterococcus faecium</i> (EF)	2,5	2,5	0,156	16× (par rapport extrait) (par rapport fraction)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA)	10	5	0,156	64× (par rapport extrait) 32× (par rapport fraction)
<i>Escherichia coli</i> (EC)	5	10	0,321	15× (par rapport extrait) 31× (par rapport fraction)

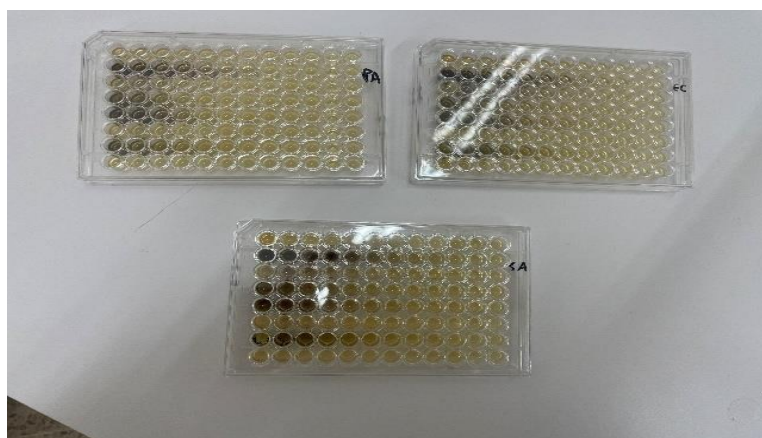


Figure 34 : Microplaques illustrant l'activité antibactérienne sur les différentes souches

L'évaluation comparative entre l'extrait d'acétate, la fraction polaire et les nanoparticules révèle des différences significatives en terme d'efficacité antibactérienne.

L'extrait d'acétate présente une activité antibactérienne significativement supérieure contre les bactéries à Gram positif, ce qui pourrait être attribuable à une accessibilité accrue de leur paroi cellulaire aux composés actifs. Cependant, les bactéries à Gram négatif, caractérisées par une membrane externe plus complexe et imperméable, limitent la pénétration des substances antibactériennes, ce qui explique leur résistance accrue et leur sensibilité moindre à cet extrait [104]. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature scientifique, qui ont démontré que des extraits organiques (notamment à l'acétate d'éthyle) issus de matrices végétales ou agroalimentaires ont une efficacité accrue contre des souches à Gram positif, en particulier *Staphylococcus aureus* [104]. Cette propriété est attribuée à la présence de composés phénoliques, flavonoïdes et acides gras, dont la lipophilie facilite la perturbation de la membrane cytoplasmique bactérienne [105].

Cependant, l'examen des résultats obtenus indique que la fraction polaire manifeste une activité inhibitrice modérée contre les souches bactériennes testées. Cette propriété est significativement plus marquée chez les bactéries à Gram positif que chez les bactéries à Gram négatif, ce qui est en accord avec les résultats de recherches antérieures. En effet, la membrane externe des bactéries à Gram négatif représente une barrière efficace qui limite la pénétration des composés hydrophiles présents dans cette fraction [105]. Par ailleurs, la distribution restreinte et la potentialité d'une altération chimique des composés polyphénoliques pourraient aboutir à une diminution de leur efficacité antibactérienne dans les contextes expérimentaux employés [106].

Dans le cadre de cette étude, l'analyse des nanoparticules d'argent synthétisées a révélé une inhibition significativement plus marquée contre *Staphylococcus aureus*, une bactérie à Gram positif, en comparaison avec l'extrait d'acétate et la fraction polaire. Cette sensibilité accrue est attribuable à la structure de la paroi des gram positifs, composée d'une quantité élevée de peptidoglycane, mais dépourvue de membrane externe, ce qui facilite la pénétration des nanoparticules [107]. Des recherches approfondies sur les nanoparticules d'argent ont révélé une efficacité remarquable contre diverses bactéries à Gram positives. Cette efficacité est attribuable à la capacité des nanoparticules d'argent de perturber la membrane bactérienne et de générer des espèces réactives de l'oxygène [108]. Cependant, il a été observé que les bactéries à Gram négatif présentent une sensibilité réduite. Cette propriété est attribuée à la membrane

externe protectrice qui caractérise ces bactéries. Cette membrane restreint la pénétration des nanoparticules, ce qui explique la moindre sensibilité des bactéries à Gram négatif par rapport aux autres types des bactéries. En outre, la synthèse des nanoparticules permet d'améliorer la stabilité des composés bioactifs extraits de la fraction polaire. Cette observation a été réalisée dans le contexte de l'encapsulation des polyphénols au sein des nanoparticules de margine. Cette encapsulation a pour effet de prolonger l'effet antibactérien et d'améliorer leur biodisponibilité [109].

Conclusion

Ce travail s'inscrit dans une démarche de valorisation des résidus agro-industriels, en particulier la margine, en tant que source de composés bioactifs pour la synthèse verte de nanoparticules d'argent. L'extraction par la méthode de Bligh & Dyer modifiée a permis d'isoler une fraction polaire riche en polyphénols avec un rendement de 2%.

Les teneurs en composés phénoliques totaux de l'extrait d'acétate et de la fraction polaire sont de 331.5 et 802.75 mg EAG/g, respectivement, indiquant une richesse en composés phénoliques.

Les teneurs en flavonoïdes totaux de l'extrait d'acétate et de la fraction polaire sont de 1.83 et 11.35 mg EQ/g, respectivement.

L'évaluation de l'activité antioxydante, réalisée par la méthode de DPPH, a révélé une IC_{50} de 0,192 mg/mL pour l'extrait d'acétate et de 0,048 mg/mL pour la fraction polaire, indiquant des propriétés antioxydantes notables.

L'analyse du profil chromatographique de la fraction polaire a révélé l'existence de vingt-huit pics distincts. Suite à une analyse approfondie des banques de données spectrales, et la similarité des indices de rétention, neuf produits ont été identifiés avec une précision optimale.

Les produits identifiés sont de nature phénolique, dont le composé majoritaire est le Tyrosol. Une voie de biosynthèse issue de l'acide shikimique, a été proposer pour faire le lien entre ces produits.

La synthèse des nanoparticules d'argent a été réalisé en utilisant la fraction polaire comme agent réducteur et stabilisant, dans des conditions optimisées. La formation et les propriétés des nanoparticules obtenues ont ensuite été confirmées par diverses techniques de caractérisation, notamment l'UV-Visible qui montre une bande d'absorption autour de 435 nm. L'analyse FT-IR a révélé une large bande –OH dans la fraction polaire, atténuée après la synthèse, indiquant l'implication des polyphénols dans la réduction des ions Ag^+ . Une bande nouvelle à 435 cm^{-1} dans le spectre des AgNPs atteste de la formation de liaisons Ag–O.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a montré que les nanoparticules d'argent présentent une efficacité significativement supérieure à celle des extraits seuls. Les valeurs de CMI des

AgNPs varient entre 0,156 mg/ml et 0,321 mg/ml contre les souches testées, avec un rapport d'amélioration ($CMI_{fr-P} / CM_{NP_{Ag}}$) atteignant jusqu'à 64 fois.

Ces résultats confirment l'intérêt de cette approche écoresponsable pour le développement de nanomatériaux bioactifs.

Il serait pertinent de poursuivre ce travail par l'évaluation de la cytotoxicité des nanoparticules d'argent synthétisées, ainsi que par l'étude approfondie de leurs mécanismes d'action, notamment au niveau cellulaire et moléculaire. En outre, le tyrosol, identifié comme composé majoritaire de la fraction polaire, demeure naturellement peu disponible. Ainsi, des études futures pourraient s'orienter vers le développement de procédés de purification sélective de ce composé à partir de la margine, en vue de son exploitation dans des applications pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires.

Référence

1. Prosie, F., Lesage, F.-X., & Deschamps, F. (2008). Nanoparticules : structures, utilisations et effets sur la santé. *La Presse Médicale*, 37(10), 1431–1437. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.04.003>
2. Chuto, G., Chaumet-Riffaud, P., & le Groupe Oncologie de la Société française de médecine nucléaire et imagerie moléculaire (SFNM). (2010). Les nanoparticules. *Médecine Nucléaire*, 34(6), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.mednuc.2010.03.003>
3. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83.
4. Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006>
5. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
6. Mechri, B., Attia, F., & Boujnah, D. (2023). Valorisation of olive mill wastewater (OMW) by recovery of phenolic compounds: a review of extraction methods and applications. *Journal of Environmental Management*, 345, 118585. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.114399>
7. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(7), 908-931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
8. Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 113(7), 823-839. <https://doi.org/10.1289/ehp.7339>
9. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. <https://doi.org/10.1126/science.1114397>
10. Moeinzadeh, S., & Jabbari, E. (2017). Nanoparticles and Their Applications. In B. Bhushan (Ed.), *Springer Handbook of Nanotechnology* (4e éd., pp. 335–361). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54357-3_12
11. Couvreur, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P., & Vauthier, C. (2002). Nanocapsule technology: A review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 19(2), 99–134. Dio : [10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v19.i2.10](https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v19.i2.10)

12. Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.001>
13. J.A. Elliott, Y. Shibuta, H. Amara, C. Bichara, E.C. Neyts, Modélisation atomistique de la synthèse CVD de nanotubes de carbone et de graphène, *Nanoscale*, 5, 6662–6676, 2013. <https://doi.org/10.1039/C3NR01925J>
14. Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354(6348), 56–58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>
15. Khanna, P., Kaur, A., & Goyal, D. (2019). Algae-based metallic nanoparticles: Synthesis, characterization and applications. *Journal of Microbiological Methods*, 163. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105656>
16. Buzea, C., & Pacheco, I. (2016). Nanomaterials and their classification. In *EMR/ESR/EPR spectroscopy for characterization of nanomaterials* (pp. 3-45). New Delhi: Springer India.
17. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 257–262. Dio. [10.1016/j.nano.2009.07.002](https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002)
18. Jain, D., Daima, H. K., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2009). Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using papaya fruit extract and evaluation of their antimicrobial activities. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 4(3), 557–563.
19. Phenrat, T., Saleh, N., Sirk, K., Tilton, R. D., & Lowry, G. V. (2007). Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environmental Science & Technology*, 41(1), 284–290. <https://doi.org/10.1021/es061349a>
20. Yang, P., & Xia, Y. (2004). Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. *Advanced Materials*, 16(17), 1355–1368. DOI: [10.1002/chem.200400927](https://doi.org/10.1002/chem.200400927)
21. Bore, S. K., & Lee, J. (2019). Thermal stability of oxide-supported gold nanoparticles. *Gold Bulletin*, 52(3), 157–165. <https://doi.org/10.1007/s13404-019-00259-9>
22. Zhuang, J., & Gentry, R. W. (2011). Environmental application and risks of nanotechnology: A balanced view. In S. Ripp & T. Henry (Eds.), *Environmental nanotechnology: Applications and impacts of nanomaterials* (41–67). Springer.
23. Lam, E., & Luong, J. H. (2014). Matériaux carbonés comme supports de catalyseurs et catalyseurs dans la transformation de la biomasse en carburants et produits chimiques. *ACS Catalysis*, 4(9), 3393–3410. <https://doi.org/10.1021/cs5008393>

24. Sun, T., Zhang, Y. S., Pang, B., Hyun, D. C., Yang, M., & Xia, Y. (2014). Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(46), 12320–12364. DOI: [10.1002/anie.201403036](https://doi.org/10.1002/anie.201403036)
25. Abdulle, A., & Chow, J. C. (2019). Nanoparticle-enhanced contrast for portal imaging in radiotherapy: A Monte Carlo phantom evaluation using flattening filter-free photon beams. *Nanomaterials*, 9(6), 920. DOI: [10.3390/nano9070920](https://doi.org/10.3390/nano9070920)
26. Siddique, S., & Chow, J. C. (2020). Gold nanoparticles for drug delivery and cancer therapy. *Applied Sciences*, 10(11), 3824. <https://doi.org/10.3390/app10113824>
27. Anjum, S., Hashim, M., Malik, S. A., Khan, M., Lorenzo, J. M., Abbasi, B. H., et al. (2021). Recent advances in zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) for cancer diagnosis, targeted drug delivery, and treatment. *Cancers*, 13(18), 4570. DOI: [10.3390/cancers13184570](https://doi.org/10.3390/cancers13184570)
28. Yuan, P., Ding, X., Yang, Y. Y., & Xu, Q. H. (2018). Metal nanoparticles for diagnosis and treatment of bacterial infection. *Advanced Healthcare Materials*, 7(13), 1701392. DOI: [10.1002/adhm.201701392](https://doi.org/10.1002/adhm.201701392)
29. Hoseinzadeh, E., Makhdoumi, P., Taha, P., Hossini, H., Stelling, J., & Kamal, M. A. (2017). A review on nano-antimicrobials: Metal nanoparticles, methods and mechanisms. *Current Drug Metabolism*, 18(2), 120–128. DOI: [10.2174/1389200217666161201111146](https://doi.org/10.2174/1389200217666161201111146)
30. Dangi, K., & Verma, A. K. (2021). Efficient and eco-friendly smart nanopesticides: New perspectives for agriculture. *Materials Today: Proceedings*, 45, 3819–3824. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.03.211>
31. Khanna, P., Ong, C., Bay, B. H., & Baeg, G. H. (2015). Nanotoxicity: An interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. *Nanomaterials*, 5(3), 1163–1180. <https://doi.org/10.3390/nano5031163>
32. Shao, Y., Wang, L., Mettenbrink, E. M., DeAngelis, P. L., & Wilhelm, S. (2021). Nanoparticle Toxicology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 61, 269–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-032320-110338>
33. Chen, Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Zhao, Y., Jia, G., ... & Fang, X. (2006). Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicology Letters*, 163(2), 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.003>
34. Zeyons, O. (2008). Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).

35. Gonçalves, M. G., et al. (2008). UV-Visible spectroscopy in the determination of metal nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8(5), 2324–2332. DOI: [10.1166/nnl.2012.1278](https://doi.org/10.1166/nnl.2012.1278)
36. Islam, S. S. (2015). UV-Vis spectroscopy. In *Nanoscience and nanotechnology I* (1–24). INFLIBNET Centre.
37. Montet, I. (2017). Caractérisation multi-angle des nanoparticules pour l'étude de leurs propriétés (Thèse de doctorat, Institut Universitaire des Sciences et Techniques d'Ingénieur - IUSTI). HAL Open Archive.
38. Eid, M. M. (2022). Characterization of nanoparticles by FTIR and FTIR-microscopy. In S. Mallakpour & C. M. Hussain (Eds.), *Handbook of Consumer Nanoproducts* (pp. 1–20). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-15-6453-6_89-1
39. Dasaradhu, Y., & Srinivasan, M. A. (2020). Synthesis and characterization of silver nanoparticles using co-precipitation method. *Materials Today: Proceedings*, 33, 720–723. doi.org/10.1016/j.matpr.2020.06.029
40. Kumar, M., Ranjan, R., Dandapat, S., Srivastava, R., & Sinha, M. P. (2022). XRD analysis for characterization of green nanoparticles: A mini review. *Global Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 555779. <https://doi.org/10.19080/GJPPS.2022.09.555779>
41. Wang, Z. L. (2000). Characterizing the Structure and Properties of Nanomaterials by X-ray Diffraction. *Advanced Materials*, 12(17), 1299–1303. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100040-3.00004-3>
42. Reimer, L. (2013). *Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis* (2nd ed.).
43. Goldstein, J. I., Newbury, D. E., Echlin, P., Joy, D. C., Fiori, C., & Lifshin, E. (2003). *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis* (3rd ed.).
44. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). 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*, 73(6), 1712–1720. DOI: [10.1128/AEM.02218-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06)
45. Lok, C. N., Ho, C. M., Chen, R., He, Q. Y., Yu, W. Y., Sun, H., Tam, P. K. H., Chiu, J. F., & Che, C. M. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924. DOI: [10.1021/pr0504079](https://doi.org/10.1021/pr0504079)

46. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* leaf extract. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.06.006>
47. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape? *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. DOI: [10.1128/AEM.02218-06](https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06)
48. Pradeep, T. (2009). *Nanoscale materials*. McGraw Hill Education.
49. Gurunathan, S., Park, J. H., Han, J. W., Kim, J. H., & Kim, J. H. (2014). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ganoderma* and their antimicrobial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 3275–3284. DOI: [10.2147/IJN.S37397](https://doi.org/10.2147/IJN.S37397)
50. Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–2353. DOI: [10.1088/0957-4484/16/10/059](https://doi.org/10.1088/0957-4484/16/10/059)
51. Afonso, I. S., Cardoso, B., Nobrega, G., Minas, G., Ribeiro, J. E., & Lima, R. A. (2024). Green synthesis of nanoparticles from olive oil waste for environmental and health applications: A review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 12, Article 114022. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114022>
52. Al-Harbi, N., & Abd-Elrahman, N. K. (2024). Physical methods for preparation of nanomaterials, their characterization and applications: A review. *Journal of Umm Al-Qura University for Applied Sciences*.
53. Riseh, R. S., & Vazvani, M. G. (2024). Green synthesis of metal nanoparticles using plant growth promoting rhizobacteria and application in agriculture. *Plant Nano Biology*, 10, Article 100123. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100111>
54. Singh, P., Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2016). Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 34(7), 588–599. DOI: [10.1016/j.tibtech.2016.02.006](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.006)
55. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
56. Fang, X., Wang, Y., Wang, Z., Jiang, Z., & Dong, M. (2019). Microorganism assisted synthesized nanoparticles for catalytic applications. *Energies*, 12(1), 190. DOI: [10.3390/en12010190](https://doi.org/10.3390/en12010190)
57. Sastry, M., Ahmad, A., Khan, M., & Kumar, R. (2003). Biosynthesis of metal nanoparticles using fungi and actinomycete. *Current Science*, 85(2), 162–170.

58. Chaudhary, R., Nawaz, K., Khan, A. K., Hano, C., Abbasi, B. H., & Anjum, S. (2020). An overview of the algae-mediated biosynthesis of nanoparticles and their biomedical applications. *Biomolecules*, 10(11), 1498. <https://doi.org/10.3390/biom10111498>
59. Srikar, S. K., Giri, D. D., Pal, D. B., Mishra, P. K., & Upadhyay, S. N. (2016). Green synthesis of silver nanoparticles: A review. *Advances in Sustainable Chemistry*, 6(1), 34–56. DOI: [10.4236/gsc.2016.61004](https://doi.org/10.4236/gsc.2016.61004)
60. Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine* (5th ed.). Oxford University Press.
61. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4(8), 118–126. DOI: [10.4103/0973-7847.70902](https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902)
62. Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M., & Ogiso, T. (1986). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 77(3), 605–617.
63. Young, I. S., & Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
64. Gómez, N. C., Ramírez-Castillo, F. Y., Zavala-Díaz de la Serna, F. J., García-García, A., Nevárez-Moorillón, G. V., & Rodríguez-Herrera, R. (2019). Antibacterial mechanisms of plant extracts against multidrug-resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1054. DOI: [10.1111/j.1464-5491.2011.03258.x](https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.2011.03258.x)
65. Nair, S., Sasidharan, A., Divya Rani, V. V., Menon, D., Nair, S., Manzoor, K., & Raina, S. (2010). Nanoparticulate material: A novel approach for controlling bacterial growth. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), 1460–1467. DOI: [10.1007/s10856-008-3548-5](https://doi.org/10.1007/s10856-008-3548-5)
66. Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., & Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3509–3514. DOI: [10.1021/jf000972g](https://doi.org/10.1021/jf000972g)
67. Abeer, A. (2013). Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois huileries marocaines. *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(1), 57–64.
68. Vitolo, S., et al. (1999). Caractérisation des margines issues d'une huilerie moderne et essais de leur traitement par coagulation-floculation par la chaux et le sulfate d'aluminium. *Revue des Sciences de l'Eau*, 21(1), 71–86. DOI: <https://doi.org/10.7202/017930ar>
69. Di Giovacchino, L., Solinas, M., & Miccoli, M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 71(11), 1189–1194.

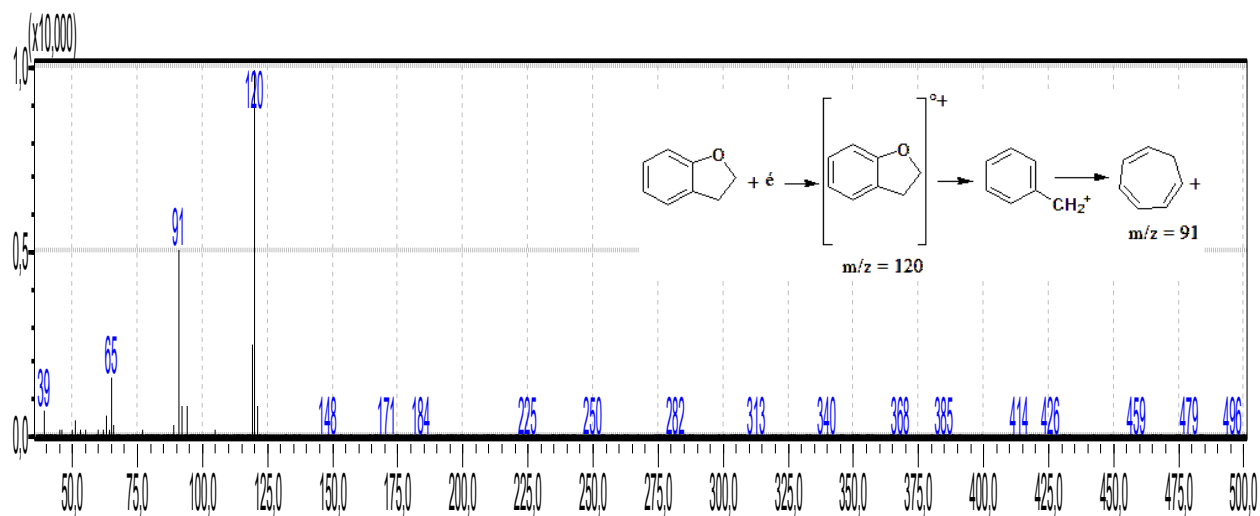
70. Morillo.J. A., Antisar -Ladisalo.B., Monteoliva-Sanchez M., Ramos- Cormenzana.A., Russelli.N.J , (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-millwastes. *AppliedMicrobiololgyBiotechnology*.82 : 25–39.
71. Ben Mansour, H., Yousfi, M., & Sayadi, S. (2015). Characterization and valorization of olive mill wastewater (margines): A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(5), 3367–3385.
72. Esmail, A., Abed, H., Firdaus, M., Chahboun, N., Mennane, Z., Berny, E. H., & Ouhssine, M. (2014). Étude physico-chimique et microbiologique des margines de trois régions du Maroc (Ouazzane, Fès Boulman et Béni Mellal). *Journal of Materials and Environmental Science*, 5(1), 121–126, 2028-2508.
73. Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Biochemistry and Cell Biology* 37, 911–917.
74. Vasquez Roncero A, Janer Del Valle C, Janer Del Valle ML. 1973. Determinacion de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24(6): 350–357.
75. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16: 144-158. DOI: [10.5344/ajev.1965.16.3.144](https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144)
76. Quettier-Deleu, C.; Gressier, B.; Vasseur, J.; Dine, T.; Brunet, C.; Luyckx, M.; Cazin, M.; Cazin, J. C.; Bailleul, F.; Trotin, F. Phenolic Compounds and Antioxidant Activités of Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench) Hulls and Flour. *Journal of Ethnopharmacology* 2000, 72(1–2), 35–42.
77. Adams, R.P., "Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry ", IL, USA, (2007). 4th edn, Allured publ, Carol Stream, IL, USA, (2007). 4th edn.
78. Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211–219.
79. Sithara, P. A., Nisa, S., & Warriar, K. G. K. (2020). *Green synthesis of silver nanoparticles from Moringa oleifera* leaf extracts and its antimicrobial potential. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 768, 022045. <https://doi.org/10.1088/2043-6254/aaabb2>
80. Ventura, G.; Calvano, C.D.; Abbattista, R.; Bianco, M.; De Ceglie, C.; Losito, I.; Palmisano, F.; Cataldi, T.R., "Characterization of bioactive and nutraceutical compounds occurring in olive oil processing wastes", *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, V. 33, (2019), 1670-1681.

81. Ait Si Said, C. (2024). Étude chimique et valorisation de l'activité biologique des polyphénols des margines (Thèse de doctorat, Université Saad Dahlab de Blida 1). Université de Blida.
82. Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants from olive mill wastewaters. *Biochemical Engineering Journal*, 19(2), 181–187.
83. Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K., & Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 823–837.
84. Ladhari, A., Zarrelli, A., Ghannem, M., & Ben Mimoun, M. (2020). Olive wastes as a high-potential by-product: Variability of their phenolic profiles, antioxidant and phytotoxic properties. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 5819–5831. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01256-2>
85. Gueboudji, Z., Kadi, K., & Nacer, K. (2021). Phytochemical screening and assessment of the antioxidant activity of bio-phenols of olive oil mill wastewater from the cold extraction of olive oil in Khenchela region, Eastern of Algeria. *Journal of Renewable Energies (CREAT)*, 21, 93–99. DOI : [10.54966/jreen.v1i1.1044](https://doi.org/10.54966/jreen.v1i1.1044)
86. Asfaw, M. D. (2022). Chemical composition of olive stems essential oil from Ethiopia. *Journal of Plant Science and Phytopathology*, 6, 57–61. <https://doi.org/10.29328/journal.ipsp.1001075>
87. Vlachogianni, T., Skenderidis, P., Efstathiopoulos, P., Dais, P., & Kortsaris, A. (2015). Antioxidant activity of tyrosol and its acetylated derivatives in human serum and linoleic acid oxidation assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(9), 2321–2329. DOI: [10.1016/j.foodchem.2014.12.092](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.092)
88. Stachys pilifera Benth. (2017). Antimicrobial effects of tyrosol against pathogenic bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, 203, 123–131. DOI : [10.1155/2022/7621599](https://doi.org/10.1155/2022/7621599)
89. Bucciantini, M., Testa, A., & Pieraccini, G. (2021). Anti-inflammatory potential of tyrosol and oleocanthal in chronic liver diseases. *Biology*, 10(10), 760. DOI: [10.3390/antiox10071044](https://doi.org/10.3390/antiox10071044)
90. Wang, Q., He, M., Wang, J., & Yan, H. (2021). Antioxidant activity and mechanism of catechol and its derivatives: A review. *Molecules*, 26(3), 559. <https://doi.org/10.3390/molecules26030559>
91. Davidson, P. M., & Taylor, T. M. (2007). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Doyle, M. P., & Beuchat, L. R. (Eds.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd ed. 713–745).

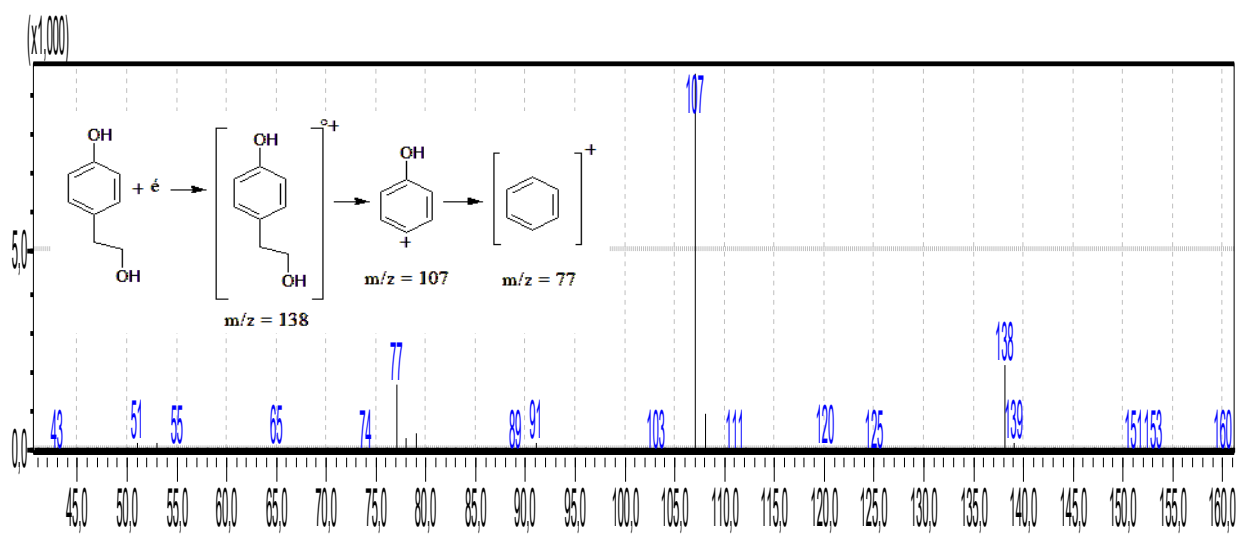
92. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J. N., & Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165–178.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740600205>
93. Jelen, H., & Gracka, A. (2015). Volatile phenolic compounds and their role in food flavor. *Food Reviews International*, 31(4), 411–427. <https://doi.org/10.3390/molécules27030783>
94. Ladeira, S. A., & Cruz, A. P. (2012). Biological activities of benzofuran derivatives: A review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12(13), 1198–1210. DOI : [10.1016/j.ejmech.2014.11.039](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.039)
95. European Chemicals Agency (ECHA). (2022). 2-Butoxyethanol – Substance information. Retrieved from <https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.003.434>
96. Ruan, X., Zhang, S., Song, W., Liu, J., Chen, X., Liu, L., & Wu, J. (2022). Efficient synthesis of tyrosol from L-tyrosine via heterologous Ehrlich pathway in *Escherichia coli*. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 47, 18–30.
<https://doi.org/10.1016/j.cjche.2021.05.026>
97. Bogireddy, N.K.R., Kiran Kumar, H.A., Mandal, B.K., 2016. Biofabricated silver nanoparticles as green catalyst in the degradation of different textile dyes. *J. Environ. Chem. Eng.* 4, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.11.004>.
98. De Aragaño, A.P., De Oliveira, T.M., Quelemes, P.V., Perfeito, M.L. G., Araújo, M.C., Santiago, J.D.A.S., Cardoso, V.S., Quaresma, P., De Souza De Almeida Leite, J.R., Da Silva, D.A., 2019. Green synthesis of silver nanoparticles using the seaweed *Gracilaria birdiae* and their antibacterial activity. *Arab. J. Chem.* 12, 4182– 4188.
<https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.04.014>
99. Kumar, V., & Yadav, S. K. (2013). Structural Characterization of Silver Nanoparticles Synthesized by Micro Emulsion Route. *International Journal of Engineering and Innovative Technology (IJEIT)*, 3(3), 344–348.
100. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., Tripathy, S. K., & Poinern, G. E. J. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 8(11), 7278–7308.
<https://doi.org/10.3390/ma8115377>
101. Ait Ali, A. (2018). Activité antibactérienne et antioxydante des polyphénols extraits de feuilles d'olivier et de margines.
102. Meng, Y. (2015). A Sustainable Approach to Fabricating Ag Nanoparticles/PVA Hybrid Nanofiber and Its Catalytic Activity. *Nanomaterials*, 5(2), 1124–1135.
<https://doi.org/10.3390/nano5021124>

103. Sharma, P., Pant, S., Rai, S., Yadav, R. B., & Dave, V. (2018). Green synthesis of silver nanoparticle capped with *Allium cepa* and their catalytic reduction of textile dyes: an ecofriendly approach. *Journal of Polymers and the Environment*, 26, 1795-1803.
104. Bouarab-Chibane, L. et al. (2019). Antibacterial properties of polyphenols: characterization and QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models. *Frontiers in Microbiology*, 10, 829.
105. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
106. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
107. Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
108. Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. (2009). Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002>
109. Zhang, L., Pornpattananankul, D., Hu, C. M., & Huang, C. M. (2010). Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current Medicinal Chemistry*, 17(6), 585–594. <https://doi.org/10.2174/092986710790416290>

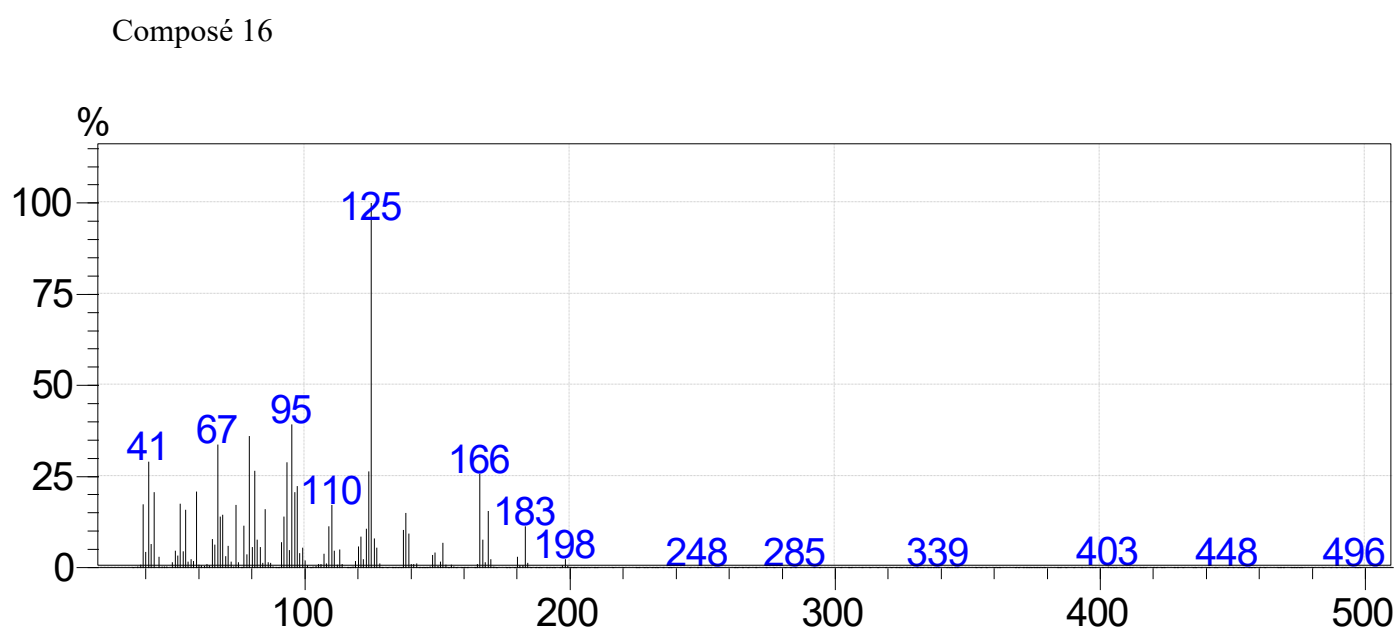
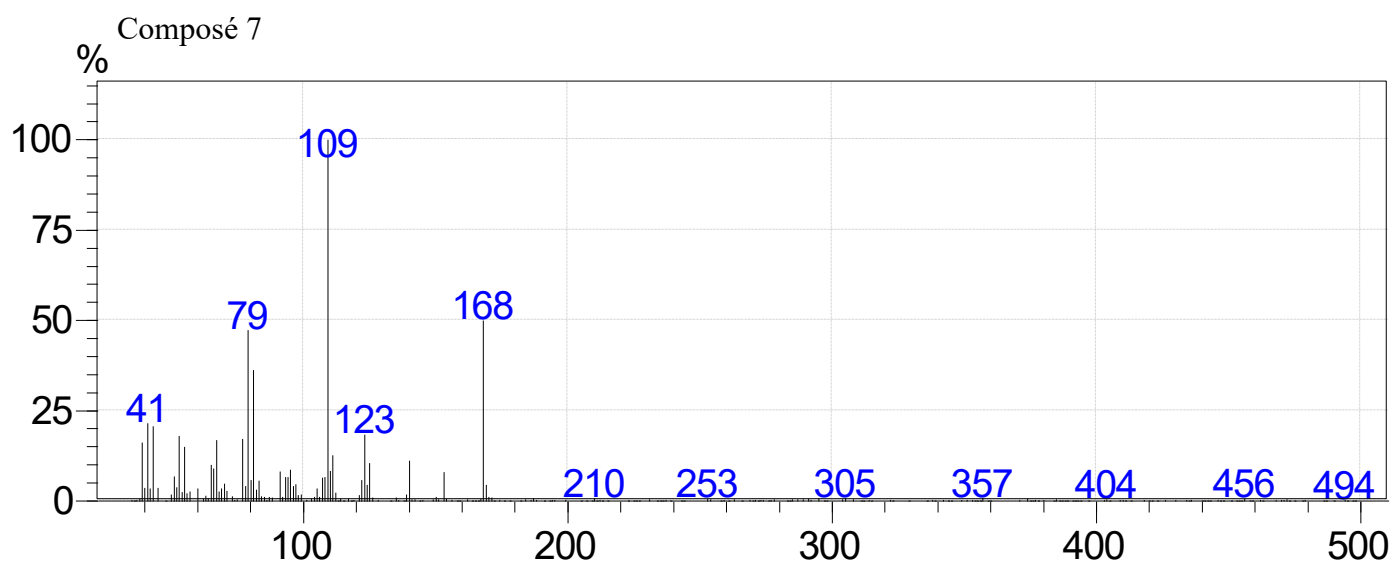
Composé 3



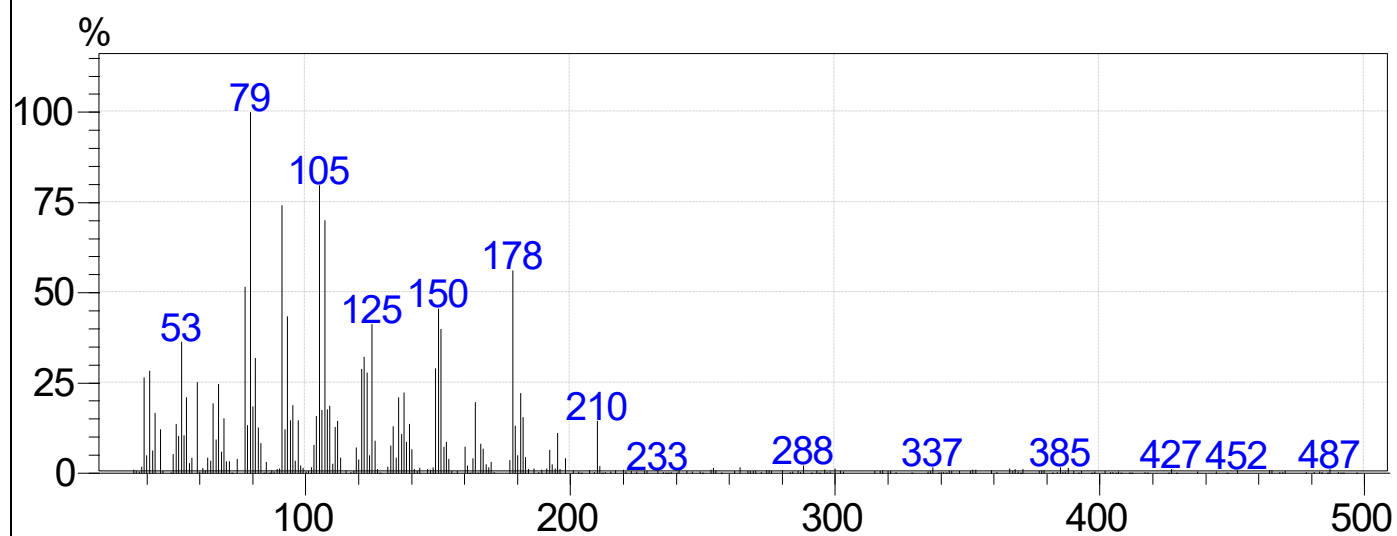
Composé 6



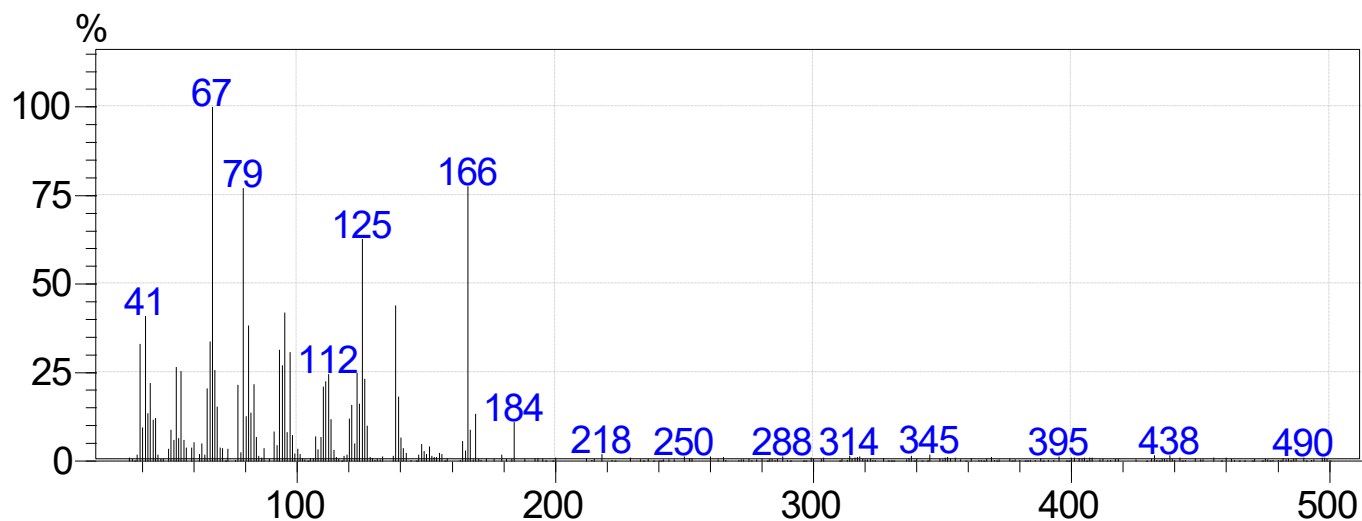
Annexe 3 : Spectre de masse des composés non identifiés (Tableau 25)



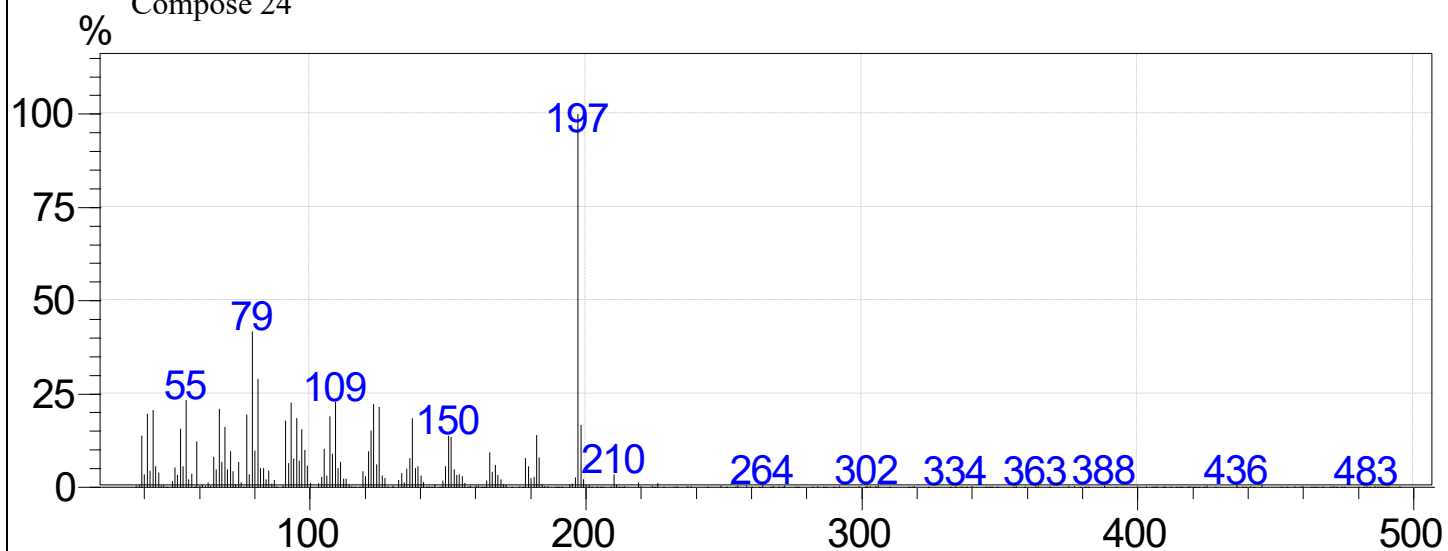
Composé 18



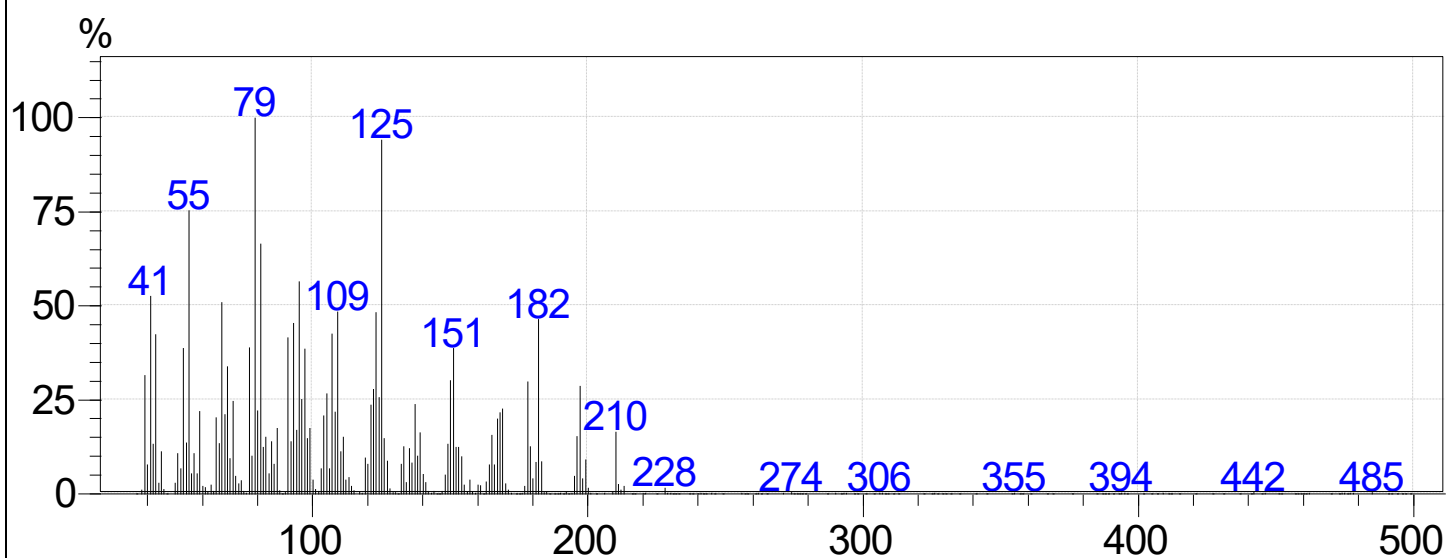
Composé 23



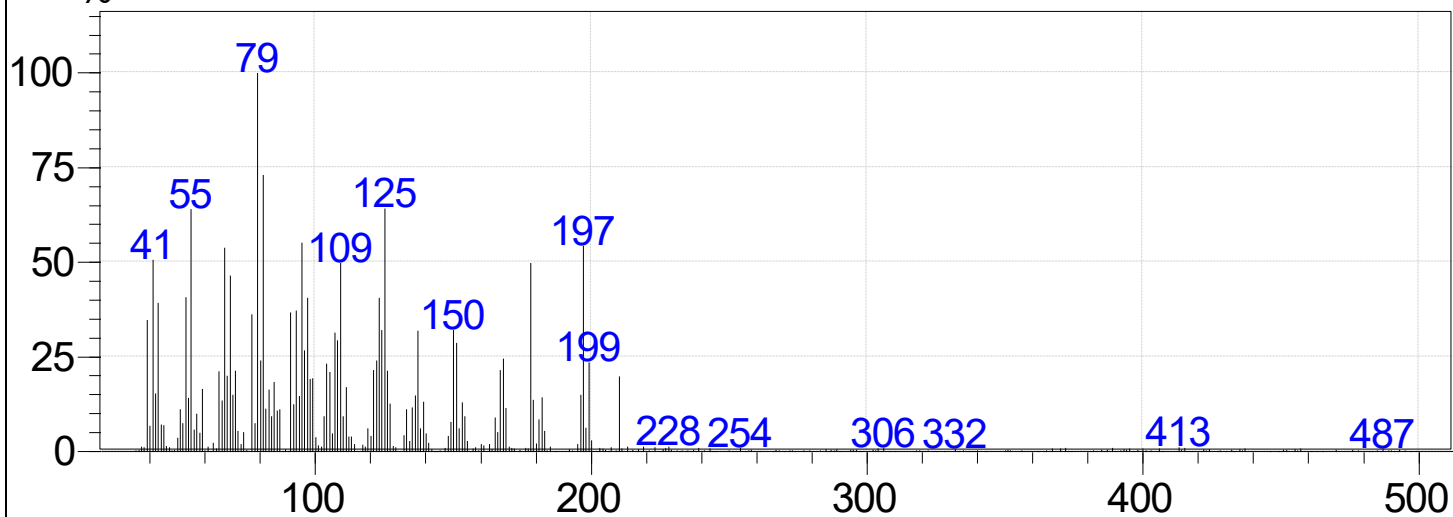
Composé 24



Composé 25



Composé 26



Composé 28

