

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLAB - BLIDA 1



FACULTE DE MEDECINE
DEPARTEMENT DE PHARMACIE



**THESE DE FIN D'ETUDE PRESENTEE EN VUE
DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Session Septembre 2019

Thème

**SYNTHESE ET VALORISATION DANS LE
DOMAINE MEDICAL DES NANOCOMPOSITES
DE « Ag-TiO₂ »**

Présenté par :

- AGGOUNE Ferial
- AHMED BENYAHIA Chemissa

Sous la direction de :

- Dr. IMOUDACHE. H Maitre assistant en Chimie Minérale Pharmaceutique.

Devant le jury :

- Président : Pr. DJERMOUNNE. S Professeur en Pharmacie Galénique.
- Examineur : Dr. MAHFOUD. M Maitre assistant en Microbiologie.
- Examineur : Dr. AZZOUZ. L Maitre assistante en Chimie Analytique.

Année universitaire : 2018 - 2019.

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier le Bon Dieu, le tout puissant et miséricordieux, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous voudrions remercier toute personne ayant participé de près ou de loin, à l'élaboration de ce travail :

En premier notre promoteur Dr.IMOUDACHE HICHAM : Maitre-assistant en chimie Minérale qui a toujours été à notre écoute pour nous orienter et nous conseiller. Nous avons eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, veuillez trouver dans ce modeste travail l'expression de notre haute considération, sincère reconnaissance et notre profond respect.

A Madame MAKAOUI NASSIMA de département de chimie de nous avoir accueillis au niveau des laboratoires du centre de recherche et développement du GROUPE SAIDAL. Ses orientations, son aide et ses conseils étaient très enrichissants pour nous. Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et remerciements pour votre accompagnement dans ce travail.

A toute l'équipe de laboratoire de laboratoire de chimie analytique, microbiologie et pharmacotoxicologie du CRD SAIDAL.

Aux membres du jury de thèse :

Pr.DJARMOUNE.S qui nous a fait honneur par sa présence en qualité : présidente de jury.

Dr.MAHFOUD.M et Dr.AZZOUZ.L qui ont accepté de faire partie de ce jury, d'examiner ce travail et consacré de leur temps pour son évaluation.

Nous tenons à remercier chaleureusement, nos très chers parents, qui on toujours été là pour nous, ainsi que nos sœurs et nos frères pour leurs encouragements afin d'accomplir ce travail.

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents : aux êtres les plus précieux au monde et ma première école dans cette vie, vous m'avez encouragé tout au long de mes années d'étude, vous avez été une source de force et de bonheur, que Dieu vous garde et procure santé, bonheur et long vie.

A mes adorables sœurs Romaiassa, Amira et mes deux braves frères Djaafar et Akram : vous avez toujours été à mes côtés, vous n'avez pas cessé de croire en moi et en mes capacités. Je vous souhaite un avenir plein de joie, de bonheur et de réussite. Puisse Dieu vous protéger, garder et renforcer notre fraternité.

A toute ma famille.

A mon binôme Chemissa qui brille avec son sourire comme son prénom et sa famille.

A Chaanane Lamia « tu es formidable », et à sa famille et que la coïncidence a bien fait les choses.

A mes très chères amies, en souvenir de notre sincère amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble. Merci pour votre soutien et votre humeur.

A toute personne qui m'a inespéré et soutenu.

A vous tous, je dédie ce modeste travail.

Feriel

Dédicace

Je dédie ce mémoire :

A mes très chers parents : aucune dédicace, aucun mot ne pourrait exprimer à leur juste valeur la gratitude et l'amour que je vous porte. Je mets entre vos mains, le fruit de longues années d'études, de longs mois de distance de votre amour de votre tendresse, de long jour d'apprentissage. Votre soutien et votre encouragement m'ont toujours donné de la force pour préserver et pour prospérer dans la vie. Chaque ligne de cette thèse chaque mot et chaque lettre vous exprime la reconnaissance, le respect, l'estime et le merci d'être mes parents.

Puisse allah tout puissant vous préserver et vous procurer santé et bonheur.

A mes sœurs Hassina, Fatima zahra, Razika et mon frère Mohamed : En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance pour votre encouragement et votre soutien morale, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A ma tante Fadhila et ma grande mère Yamina : qui m'ont toujours gâté tant et m'ont accompagné par ses prière, ses douceurs, puisse Dieu leur prêter une longue vie et beaucoup de santé et de bonheur. Avec toute ma tendresse et mon tendresse et mon affection.

A toute ma famille.

A mon binôme FERIEL et tout sa famille : qui m'a donné le soutien.

A ma moitié mon fiancé chérif : qui m'a encouragé et m'a donné le soutien et l'amour.

A mes très chères amies : qui m'ont toujours souhaité le meilleur, En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passé ensemble. Veuillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincères.

Chemissa

Table des matières

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Partie théorique

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES NANOPARTICULES.....	4
I.1 Historique	4
I.2 Définitions	5
I.2.1 Nanoparticules.....	5
I.2.2 Définition des composites et nanocomposites	6
I.2.2.1 Composites.....	6
I.2.2.2 Nanocomposites	7
I.2.2.3 Classification des nanocomposites	7
I.3 Synthèse des nanoparticules	8
I.3.1 Méthodes physiques.....	8
I.3.1.1 Evaporation/condensation.....	8
I.3.1.2 La pyrolyse laser.....	8
I.3.1.3 Méthode aérosol	9
I.3.1.4 Implantation ionique.....	9
I.3.2 Méthodes chimiques	9
I.3.2.1 Méthode sol-gel.....	10
I.3.2.2 Transfert de phase liquide-liquide	11
I.3.2.3 Voie micellaire inverse	12
I.3.2.4 Synthèse radiolytique.....	12
I.3.2.5 Réduction de sels métalliques	13
I.3.2.6 Décomposition de précurseurs organométallique	13
I.3.2.7 Réduction électrochimique	13
I.3.3 Synthèse biologique.....	14
I.4 Propriétés des nanocomposites	14
I.4.1 Propriétés catalytiques	15
I.4.2 Propriétés antimicrobiennes	15
I.4.3 Propriétés magnétiques	16
I.4.4 Propriétés optiques	17
I.5 Caractérisation des nanoparticules.....	18

I.5.1	Mesure de la taille et du degré d'agrégation	18
I.5.1.1	La microscopie électronique à transmission ou à balayage	19
I.5.1.2	La spectroscopie UV-visible	19
I.5.1.3	La diffusion dynamique de lumière (DLS)	19
I.5.1.4	La polarisation par fluorescence.....	20
I.5.1.5	La diffraction aux rayons X (DRX).....	20
I.5.1.6	La diffusion de lumière laser multi-angle MALLS	20
I.5.1.7	La spectrométrie de masse ICP-MS	20
	CHAPITRE II : NANOPARTICULE DE TiO₂/ Ag	21
II.1	Dioxyde de titane (TiO ₂).....	21
II.1.1	Origine du TiO ₂	21
II.1.2	Structures et propriétés du TiO ₂	21
II.1.2.1	Propriétés optiques	23
II.1.2.2	Propriétés électroniques	23
II.1.3	Utilisations dans le domaine cosmétologique et pharmaceutique	24
II.1.3.1	Utilisation pour les cosmétiques et crèmes solaires	24
II.1.3.2	Utilisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique	24
II.1.3.3	Activité antibactérienne de l'oxyde de titane.....	24
II.2	Argent.....	24
II.2.1	Etat naturel.....	25
II.2.2	Structures et propriétés du l'argent	25
II.2.3	Nanoparticule d'argent	26
II.2.4	Activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent	26
II.2.5	Nanoparticules d'argent : bénéfiques et risques	27
II.2.5.1	Prévention des infections dans le domaine biomédical	27
II.2.5.2	Applications dans le domaine agro-alimentaire et le traitement de l'eau	28
II.2.5.3	Risques liés à l'utilisation de nanoparticules d'argent	28
II.3	Généralité sur les bactéries étudiées.....	29
II.3.1	Escherichia coli (E. coli)	29
II.3.2	Staphylococcus aureus (S. aureus).....	29
II.3.3	Pseudomonas aeruginosa	30
II.3.4	Bacillus subtilis	30

II.4	Généralité sur les champignons et les levures étudiés	31
II.4.1	Candida albicans	31
CHAPITRE III : TOXICITE DES NANOPARTICULES		32
III.1	Cadre de l'exposition.....	32
III.2	Mécanismes à l'origine de leur toxicité	33
III.2.1	Effet de la taille (surface de contact).....	35
III.2.2	Voie de pénétration	35
III.3	Impacts sur la santé	36
III.3.1	Études chez l'animal	37
III.3.2	Études chez l'homme	38
III.4	Métrologie, réglementations et recommandations	39
III.5	Cancérogénicité.....	40

Partie pratique

Chapitre I : Matériels et méthodes.....		42
I.1	Matériels et réactifs	42
I.1.1	Appareillage	43
I.1.2	Verreries.....	43
I.1.3	Consommables	43
I.1.4	Autres.....	44
I.1.5	Réactifs et matières.....	44
I.1.5.1	Réactifs utilisés pour la synthèse des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	44
I.1.5.2	Matières premières utilisées pour la formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	46
I.2	Protocole de synthèse	47
I.2.1	Préparation des solutions	47
I.2.1.1	Préparation de la solution d'acide chlorhydrique 0,5M.....	47
I.2.1.2	Préparation de la solution d'ammoniaque 1M	47
I.2.1.3	Préparation de la solution d'acide nitrique 1M	47
I.2.2	Protocole de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	47
I.2.2.1	Test limite des chlorures	49
I.2.3	Protocole de synthèse des nanoparticules de TiO ₂	50
I.3	Caractérisation des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	50
I.3.1	Diffusion Dynamique de la lumière (DLS).....	50

I.3.1.1	Principe de mesure de la taille des particules.....	50
I.3.1.2	Mode opératoire	50
I.3.2	Microscope électronique à balayage (MEB).....	51
I.3.3	Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie, analyse EDX	51
I.3.3.1	Mode opératoire	51
I.3.4	Diffraction des rayons X (DRX)	52
I.3.4.1	Mode opératoire	52
I.3.5	Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge	52
I.3.5.1	Mode opératoire	52
I.4	Formulation de la pommade	53
I.4.1	Mode opératoire.....	53
I.5	Etude de l'effet antibactérien des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	53
I.5.1	Choix des souches microbiennes.....	54
I.5.1.1	Mode opératoire	55
I.5.2	Préparation des solutions des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'AgTiO ₂	56
I.5.3	Dépôt des disques et incubation	57
I.5.4	Lecture des résultats	57
I.6	Evaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (Tests in vivo)	58
I.6.1	Test de toxicité	58
I.6.1.1	Mode opératoire	59
I.6.1.2	Observations.....	60
I.7	Effet irritant.....	61
I.7.1	Principe	61
I.7.2	Préparation des animaux	61
I.7.3	Mode opératoire.....	61
I.7.4	Essai d'irritation cutanée initial et confirmatoire (in vivo).....	62
I.7.4.1	Période d'observation	62
I.7.4.2	Observations cliniques et cotation des réactions cutanées.....	63
	Chapitre II : Résultats et discussions	65
II.1	Synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ et des NPs de TiO ₂	65
II.1.1	Aspect des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	66
II.2	Caractérisation des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	67
II.2.1	Diffusion dynamique de la lumière (DLS).....	67

II.2.2	Analyse par EDX-MEB.....	68
II.2.3	Diffraction des rayons X (DRX).....	69
II.2.4	Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge	71
II.3	Etude de l'effet antibactérien des nanoparticules de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	75
II.3.1	Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
II.3.2	Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur l' <i>Escherichia Coli</i>	77
II.3.3	Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Staphylococcus aureus</i>	79
II.3.4	Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Bacillus subtilis</i> :	80
II.3.5	Étude comparative de l'effet antifongique des NPs de TiO ₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur la levure « <i>Candida albicans</i> »	81
II.4	Evaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (Test in vivo).....	83
II.4.1	Test de toxicité des nanocomposites d'Ag-TiO ₂	83
II.4.2	Effet irritant de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur la peau de l'animal	84
	Conclusion	87

Liste des abréviations

**AFM : Microscopie à Force
Atomique**

AgClO₄ : perchlorate d'argent

AgNO₃ : nitrate d'argent

**ATCC : American Type Culture
Collection**

**BPL : Bonnes Pratiques de
Laboratoire**

**CDTA : Centre de Développement
des Technologies Avancées**

**CMNC : Nano Composites à Matrice
Céramique**

Co : Cobalt

CO₂ : Le dioxyde de carbone

CoPt : Cobalt platine

DLS : Dynamic Light Scattering

DRX : X-Ray Diffraction

**EDX : Spectroscopie à ayons X à
Dispersion d'Energie**

**FTIR : Spectroscopie Infrarouge à
Transformée de Fourier (FTIR)**

**GALT : Gut-Associated Lymphoid
Tissue**

**ICP-MS : Inductively Coupled
Plasma Mass Spectrometry**

IR : Infrarouge

**MALLS : Multi-Angle Light Laser
Scattering**

**MEB : Microscopie Electronique à
Balayage**

MI : Micelles Inverses

**MMNC : Nano Composites à Matrice
Métallique**

Ni : Nickel

nm : nanomètre

NPs : Nanoparticules

**OCDE : Organisation de Coopération
et de Développement Economiques**

**OSHA : Occupational Safety and
Health Administration**

pH : potentiel Hydrogène

PM : Masse de Particules

PM : Particulate Matter

**PMNC : Nano Composites à Matrice
Polymère**

Pt : Platine

R : Radical organique

SAXS : Small Angle X-ray Scattering

Si : Silicium

**TEM : Microscopie Electronique en
Transmission**

Ti : Titane

TiO₂ : Dioxyde de titane

TOAB : tétraoctylammonium

UV : Ultraviolet

Vis : Visible

W : Tungstène

XPS : Spectroscopie

Photoélectronique à rayons X

XPS : Spectroscopie

Photoélectronique à rayons X

Zn : Zinc

γ : rayonnement ionisant

Liste de figures

Figure 1 Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologique [38]	6
Figure 2 : matériau composite	7
Figure 3 : représentation 3D des structures (a) rutile; (b) anatase,(c) brookite [54]	22
Figure 4 : représentation schématique des différences de hauteur de gap pour un métal, un semi-conducteur et un isolant.[54]	23
Figure 5 : Différentes étapes de synthèse des nanocomposites d'AgTiO ₂	49
Figure 6 : solutions utilisés pour l'étude de l'effet antibactérien	56
Figure 7 : Dépôt des disques sur les souches microbiennes	57
Figure 8 : Souris NMRI pour le test de toxicité.....	58
Figure 9: Administration de la dose à tester chez souris	60
Figure 10 : Etalement des deux pommades à base des nanocomposites d'AgTiO ₂	62
Figure 11: poudre des NPs de TiO ₂	66
Figure 12 : Poudre des nanocomposite d'AgTiO ₂ (aj).....	66
Figure 13: poudre des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (N)	67
Figure 14: EDX-MEB de TiO ₂ (NPs)	68
Figure 15 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj)	68
Figure 16: EDX-MEB des nancomposites d'Ag-TiO ₂ (N)	69
Figure 17 : DRX des nanocomposites d'AgTiO ₂ (N).....	70
Figure 18: DRX des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (cal)	70
Figure 19 : Spectre IR des NPs de TiO ₂ synthétisées	71
Figure 20: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj).....	72
Figure 21:Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj,cal)	73
Figure 22: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (N)	74
Figure 23: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (cal)	74
Figure 24: Activité antibactérienne des nanocomposites d'AgTiO ₂ sur le <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	76
Figure 25: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur l' <i>Escherichia Coli</i>	78
Figure 26: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>staphylococcus aureus</i>	79
Figure 27: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Bacillus subtilis</i>	81
Figure 28: Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>candida albicans</i>	82
Figure 29: Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites Ag-TiO ₂ (aj).....	84
Figure 30: Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ (aj,cal)	85

Liste des tableaux

Tableau 1: propriétés structurales des structures cristallines possibles du TiO ₂ [54]	21
Tableau 2: Indice de réfraction et valeur du gap énergétique des phases du TiO ₂	23
Tableau 3: Souches microbiennes utilisées	54
Tableau 4: Levure utilisé	54
Tableau 5: Résultats d'analyse par DLS.....	64
Tableau 6: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur le <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	67
Tableau 7: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO ₂ sur l' <i>Escherichia Coli</i>	76
Tableau 8: Activité antibactérienne des nanocomposites AgTiO ₂ sur le <i>Staphylococcus aureus</i>	77
Tableau 9: activité antibactérienne des nanocomposites d'AgTiO ₂ sur le <i>Bacillus subtilis</i>	79
Tableau 10: Activité antifongique des nanocomposites d'AgTiO ₂ sur le <i>Candida albicans</i>	80
Tableau 11: Cotation des réactions cutanées d'après l'OCDE [65]	81
Tableau 12: Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'AgTiO ₂ (aj).....	84
Tableau 13: Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'AgTiO ₂ (aj,cal)	85

Introduction

En raison de leurs propriétés biocides remarquables par effet de taille sur les bactéries, les nanoparticules métalliques et d'oxydes métalliques envahissent de plus en plus les domaines de recherches scientifiques notamment le domaine médical et ils donnent une grande dynamique pour l'élaboration de nouvelles structures médicamenteuses nanométriques qui ciblent les infections et fournissent plus de confort aux patients.

Parmi les problèmes de santé fréquents dont souffrent les malades on trouve les infections bactériennes au niveau des plaies, principalement pour les diabétiques, les poly traumatisés...qui sont difficiles à guérir surtout pour les infections causées par les bactéries ubiquitaires « *Escherichia coli* », les bactéries nosocomiales « *Pseudomonas aeruginosa* , *Staphylococcus aureus* ». Ces dernières ont commencés à s'adapter et à développer des résistances face aux antibiotiques à cause de leurs utilisations croissantes et parfois inappropriés.

A l'heure actuelle, les chercheurs développent deux axes principaux pour solutionner le problème : le développement de nouveaux antibiotiques efficaces, ou l'élaboration des alternatives aux antibiotiques mais la mise au point de nouveaux antibiotiques est particulièrement longue et couteuse, de plus les bactéries deviennent souvent résistantes peu après leurs commercialisation.

Une large gamme d'agents potentiellement dotés d'une activité antibactérienne a été étudiée, tel que les nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane.

L'argent a une longue histoire d'utilisation en médecine comme agent antimicrobien par son mécanisme d'attachement aux protéines comme les protéines de surface des bactéries, cependant l'amélioration de l'activité biocide de l'argent est un nouveau domaine de recherche en l'incluant dans un nanocomposite d'un oxyde métallique tel que l'oxyde de titane qui est connu par son utilisation dans les prothèses et les implants a cause de son pouvoir biocide, et il est l'un des oxydes les plus utilisés en raison de sa haute stabilité , son faible cout de fabrication et la disponibilité dans la nature des ingrédients de base pour sa synthèse.

Plusieurs travaux ont été réalisés sur le nanocomposite d'Ag-TiO₂ , cependant aucun auteur n'a testé l'effet antimicrobien sur un large spectre de bactéries tout en testant l'effet de variation des différents paramètres de synthèse sur la réponse antimicrobienne,

de même que jusqu'à maintenant la mise en valeur de l'effet biologique de ce dernier dans le domaine pharmaceutique et cosmétologique n'a toujours pas eu lieu.

Il existe plusieurs méthodes de synthèses de nanocomposites Ag-TiO₂ mais la plus utilisée en chimie est la méthode Sol-gel.

Dans ce contexte l'objectif principal est l'étude de l'effet antibactérien des nano composites Ag-TiO₂ synthétisés par voie chimique sol-gel afin de prouver l'effet de synergie de l'argent avec l'oxyde de titane.

Notre travail est structuré comme suit :

- Une partie théorique qui résume les principales caractéristiques des nanoparticules métalliques : leurs types, leurs méthodes de synthèse leur effet thérapeutique et leur toxicité et d'autres notions bibliographiques qui sont en relation directe avec le thème abordé.
- Une partie expérimentale qui s'échelonne en plusieurs étapes dont la synthèse des nanocomposites d'oxyde de titane et d'argent par voie chimique, la caractérisation des nanocomposites d'AgTiO₂ par différentes méthodes d'analyse (MEB, EDS, DLS, et DRX) , l'étude de l'effet antimicrobien des nanocomposites synthétisés en fonction de la variation des paramètres de synthèse , et à la fin la formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'oxyde de titane et d'argent et l'application sur des rats en vue de vérifier la toxicité et l'effet pharmacologique.

PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE I : GENERALITE SUR LES NANOPARTICULES

I.1 Historique

La dispersion en solution de pigments naturels ultra-divisés par broyage (aujourd'hui méthode appelée « top-down ») est une méthode utilisée depuis l'antiquité dans la fabrication des peintures, fards, encres... Par la suite les particules des métaux nobles comme l'or, l'argent et le cuivre furent aussi employées.

L'utilisation des sels d'or ajoutés aux composants du verre, puis leur réduction et la coalescence des atomes pendant la fusion (qui constitue la première méthode « bottom-up ») a permis aux artisans verriers de fabriquer des œuvres en verre aux couleurs fascinantes comme le rouge rubis (coupe romaine de Lycurgues au II^{ème} siècle).

Les propriétés optiques remarquables des nanoparticules n'ont été étudiées qu'au dix-neuvième siècle par Faraday (1856) qui a montré sur une pierre supposée précieuse que la couleur rouge provenait des particules d'or dispersées dans le verre. Puis Graham (1860), Tyndall (1880) et Ostwald (1909) ont mené des travaux systématiques sur la matière ultra-divisée, notamment de métaux dans les liquides, appelées suspensions colloïdales.

En 1965 J.H. Baxendale et al. ont réussi à synthétiser des agrégats d'argent par radiolyse pulsée, cependant ces espèces s'oxydaient spontanément par l'oxygène, ce que les auteurs ne réussissaient pas à expliquer, dans la mesure où ils supposaient classiquement un caractère noble pour l'élément argent. Au cours d'une expérience de radiolyse en milieu réducteur sur le comportement des ions cuivreux dans l'ammoniac liquide M. O. Delcourt et J. Belloni (1973) ont démontré que le métal cuivre ultra-divisé en fait n'apparaissait pas et que du gaz H₂ était formé. Ce phénomène a été expliqué par les auteurs en proposant une interprétation très nouvelle selon laquelle les propriétés thermodynamiques, et en particulier les propriétés redox, du métal à l'état quasi-

atomique sont complètement différentes du métal massif. Le métal naissant présente donc un caractère très réducteur que ne possède pas le métal massif.

Au début des années 1980, un intérêt particulier s'est manifesté pour préparer des particules de très petite taille de semi-conducteurs dans le but de concevoir des systèmes électroniques miniaturisés.

Depuis les années 1990, beaucoup d'études ont été réalisées par les chercheurs, physiciens et chimistes, afin de comprendre la relation entre la taille et les nouvelles propriétés physico chimiques observées. Aujourd'hui, de multiples champs d'applications se sont ouverts d'abord aux nanoparticules pour la catalyse puis aux nanoparticules fluorescentes du fait notamment qu'elles peuvent être préparés en solution. En biologie en particulier, ces nano-objets peuvent être utilisés comme marqueurs fluorescents pour l'imagerie multicolore de tissus biologiques, le suivi de macromolécules et le marquage de tumeurs. [60]

I.2 Définitions

I.2.1 Nanoparticules

Une nanoparticule est définie comme étant une particule dont au moins une direction de l'espace a une dimension inférieure à 100 nm. La particularité d'une nanoparticule réside dans le fait que la majorité des atomes qui la constitue se trouve en surface. Les nanoparticules présentent donc des surfaces d'échanges (surface spécifique) très importantes, de plusieurs centaines de mètres carrés par gramme de particule. Cette surface d'échange très importante confère aux nanoparticules des propriétés physiques et chimiques particulières qui peuvent entraîner des effets biologiques propres, qui restent encore largement incompris, si elles rentrent en contact avec le vivant. La réactivité de surface des nanoparticules, qui augmente alors que décroît la taille de la particule, laisse prévoir qu'elles auront une activité biologique plus importante, à masse comparable, que les particules plus grosses. Cela peut être favorable et être utilisé dans des approches thérapeutiques (transporteurs de médicaments pour leur capacité à franchir les barrières biologiques). Cela peut être au contraire défavorable et engendrer une toxicité associée à leur capacité à générer un stress oxydant et à se disperser dans l'organisme dans les secteurs de la construction, et de l'industrie manufacturière

(transformation des biens, réparation et l'installation d'équipements industriels) notamment.

Les nanoparticules sont très étudiées actuellement. L'évaluation de leurs risques et de leurs bénéfices s'avère être nécessaire. [58]

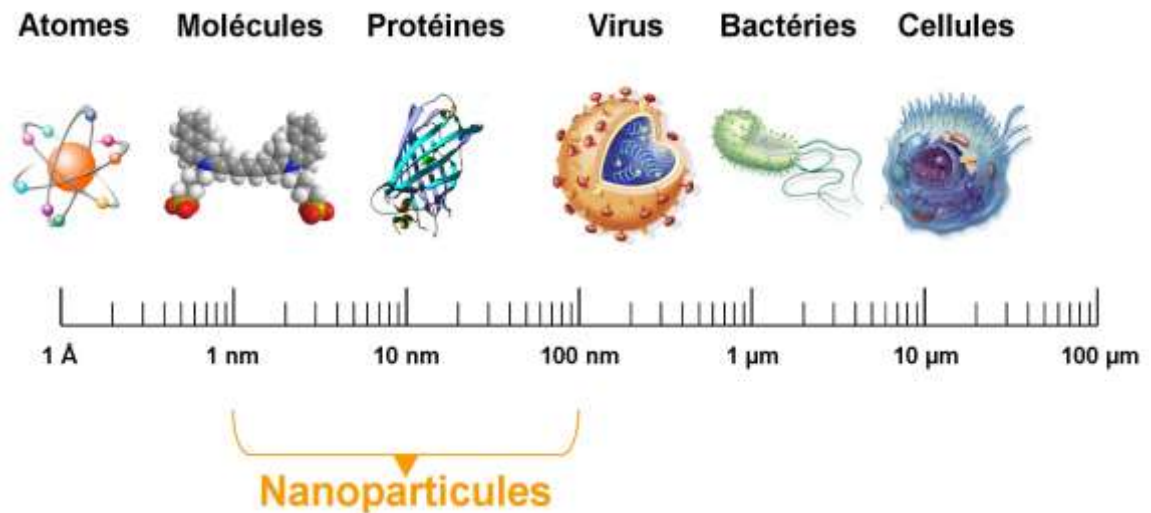


Figure 1: Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques. [38]

I.2.2 Définition des composites et nanocomposites

I.2.2.1 Composites

Un composite est un matériau constitué de deux phases (ou plus) non miscibles ayant des propriétés et des rôles différents. L'une, continue, est appelée matrice et l'autre, discontinue, appelée renfort. Les composants doivent être physiquement identifiés : il doit exister une interface distincte entre eux. Ce mélange possède des propriétés nouvelles et on recherche, en les associant, un ensemble de performances supérieures aux composants pris séparément.

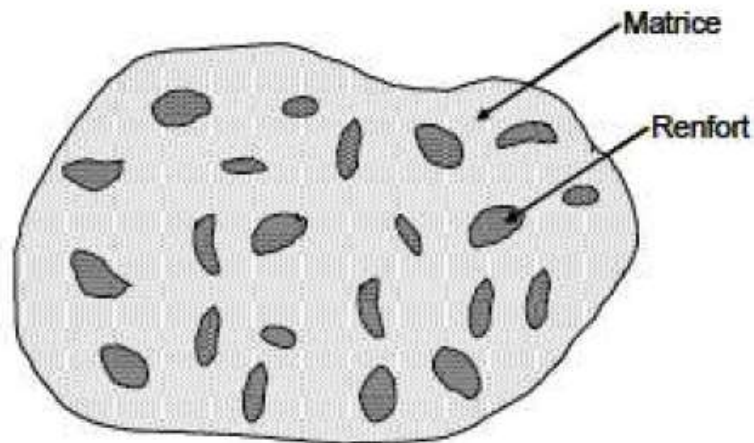


Figure 2 : Matériau composite. [47]

I.2.2.2 Nanocomposites

Un nanocomposite est un matériau composite dont le renfort possède au moins une des trois dimensions de l'ordre du nanomètre (MTIMET, 2011; Guitou, 2014). On peut les classer de la même manière que les composites, selon la morphologie du renfort qui y est dispersé et plus particulièrement selon le nombre de leur dimension nanométrique, Ils sont constitués généralement d'une matrice solide inorganique (la matrice) contenant une phase organique nanométrique (le renfort), ou vice versa.

I.2.2.3 Classification des nanocomposites

Les nanocomposites peuvent être classés selon la matrice hôte en trois catégories :

- Nanocomposites à matrice céramique CMNC.
- Nanocomposites à matrice métallique MMNC
- Nanocomposites à matrice polymère PMNC

Dans les nanocomposites à matrice métallique, la matrice est un métal (Al, Ti, Cu, Fe, W, Ag, ou ces alliages), ou leurs oxydes . Les renforts les plus utilisés sont les nanoparticules des métaux ; Dans notre étude nous allons exposer le nanocomposite $\text{TiO}_2\text{-Ag}$ dont la matrice est TiO_2 et le renfort est Ag. [47]

I.3 Synthèse des nanoparticules

Les voies de production de ces nanomatériaux sont extrêmement variées. Les nanoparticules sont synthétisées selon différentes approches : essentiellement par la méthode « *bottom-up* »), ou la méthode « *top-down* »). Par l'approche ascendante ou « *bottom-up* », les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule (hydrolyse ou condensation d'alkoxydes). Dans l'approche descendante ou « *top-down* », une grande structure est graduellement sous dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations (broyage). L'approche ascendante permettrait la production d'une plus grande diversité d'architectures et, souvent, un meilleur contrôle de l'état nanométrique (tailles et distribution granulométrique relativement mono disperse, positionnement des molécules, homogénéité des produits). Par opposition, l'un des avantages de la méthode descendante serait une capacité de production plus volumineuse mais un contrôle de l'état nanométrique plus délicat.

I.3.1 Méthodes physiques

I.3.1.1 Evaporation/condensation

Cette méthode consiste à évaporer un métal par chauffage puis à condenser la vapeur métallique afin d'obtenir des nanopoudres formées de particules nanométriques dispersées.

I.3.1.2 La pyrolyse laser

La pyrolyse laser est une méthode simple et efficace de synthèse de poudres nanométriques. Elle repose sur l'interaction entre un laser CO₂ et un flux de réactifs. Le transfert d'énergie provoque une élévation rapide de température. Les réactifs « précurseurs » sont dissociés et une flamme apparaît dans laquelle se forment les nanoparticules, qui subissent ensuite une baisse rapide de température ou « effet de trempe » en sortie de flamme. Les poudres sont alors entraînées par un flux gazeux dans une zone de collecte.

I.3.1.3 Méthode aérosol

Un aérosol est un ensemble de particules, solides ou liquides, d'une substance chimique donnée en suspension dans un milieu gazeux. La synthèse de nanoparticules peut être obtenue par oxydation dans des flammes à très haute température ou plasma thermique à partir de précurseurs gazeux ou liquides amenés sous forme d'aérosol. La formation d'un aérosol ne nécessite pas un grand volume de liquide. La durée de réaction est très courte et permet l'obtention de particules pures avec un débit et un rendement intéressants.

Ce procédé permet notamment la production de plusieurs tonnes par an de dioxyde de titane, silice ou noir de carbone. [21]

I.3.1.4 Implantation ionique

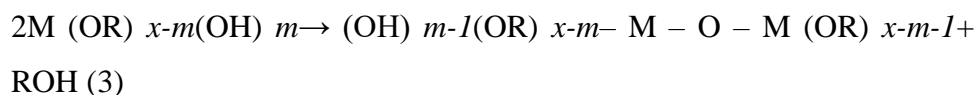
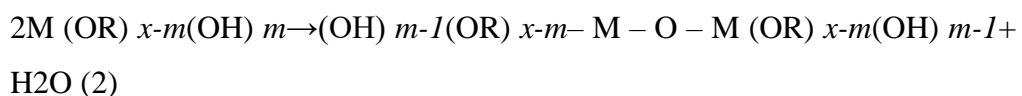
Elle est utilisée pour implanter les ions d'un matériau dans un autre solide, changeant de ce fait les propriétés physiques de ce solide. L'implantation ionique est utilisée dans la fabrication des dispositifs à semi-conducteurs, pour le traitement de surface des métaux, ainsi que pour la recherche en science des matériaux. Plusieurs éléments ont été implantés dans une matrice de silice ou de verre tels que (Si, Co, Ni, Zn) [60].

I.3.2 Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques de synthèse de nanoparticules en solution offrent une grande variété de conditions expérimentales. Une caractéristique commune aux voies de synthèse que nous allons présenter est l'utilisation de trois composants indispensables : Un précurseur, un agent réducteur et un agent stabilisant. Le contrôle précis de la taille, de la forme et de la composition des nanoparticules passe par le contrôle et l'ajustement des divers paramètres de réaction. La température, la nature et la concentration des réactifs et des agents stabilisants sont autant de paramètres modulables. Les systèmes pouvant être obtenus sont donc très variés.

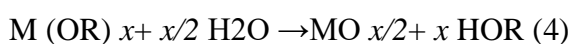
I.3.2.1 Méthode sol-gel

Cette méthode est un procédé de « chimie douce » en solution liquide permettant l'élaboration de nombreux composés inorganiques ou hybrides organique/inorganique dans une large variété de structures telles que des films minces, des fibres optiques, des verres monolithiques ou encore des nano poudres calibrées, nanoparticules. Le procédé sol-gel permet de fabriquer un polymère inorganique par des réactions chimiques simples, à une température comprise entre 20 et 150°C. La synthèse est effectuée à partir d'alcooates de formule $M(OR)_n$ où M est un métal ou le silicium et R un groupement organique alkyle C_nH_{2n+1} . Cette réaction s'effectue en deux temps. Premièrement, il y a hydrolyse du précurseur et départ d'un groupement alkyle. Cette étape peut être catalysée par la modification du pH dans le milieu réactionnel. La dispersion est appelée le « sol ». Dans un deuxième temps, il se produit une polymérisation inorganique qui aboutit à la formation du « gel ». Le « gel » est ensuite séché afin d'éliminer la phase aqueuse à l'aide d'un four par exemple. Le principe de cette méthode est basé sur les réactions inorganiques de polymérisation. Le processus sol-gel suit quatre étapes : l'hydrolyse, la polycondensation, le séchage et la décomposition thermique. Le précurseur (M) (métallique ou non-métallique) s'hydrolyse avec de l'eau ou de l'alcool suivant la réaction (1) Cette étape est suivie de la condensation, qui s'effectue soit en présence d'eau (réaction (2)) ou d'alcool (réaction (3))

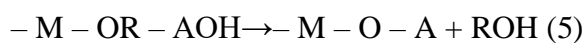


Où R est un radical organique

La réaction globale peut être exprimée par :



Selon le pH de la solution (par addition d'un acide ou d'une base), on peut favoriser l'hydrolyse de l'ion précurseur. Dans le cas du milieu acide, le précurseur réagit avec l'acide.



Après évaporation du solvant, la solution forme un gel. Dans le cas d'un solvant organique, des températures très élevées sont nécessaires pour sa décomposition. La taille des particules dépend des conditions opératoires telles que la composition de la solution, le pH et la température. Le contrôle de ces paramètres permet la formation de particules de taille désirée. L'intérêt de ce procédé est l'existence de précurseurs pour un grand nombre de métaux et non-métaux. [8, 60]

I.3.2.2 Transfert de phase liquide-liquide

Développée par Brust dans les années 1990 pour la synthèse de nanoparticules d'or [36], elle consiste à transférer un sel d'or ($AuCl_4^-$), solubilisé en phase aqueuse, dans une phase organique (toluène) par l'intermédiaire d'un agent de transfert, le bromure de tétraoctylammonium (TOAB). Après l'addition d'un agent stabilisant (décane-thiol), le sel d'or est réduit par du borohydrure de sodium ($NaBH_4$), s'ensuivent, après 12 heures d'agitation, plusieurs lavages et une sélection en taille par précipitation. Les nanoparticules d'or habillées de thiols finalement obtenues sont stables thermodynamiquement et de 2,5 nm de diamètre. Cette méthode de synthèse a, par la suite, été adaptée à différents éléments : Pt [32], CoPt [2]. Dans le cas de l'argent, le protocole de synthèse est le même que pour l'or, le sel utilisé pouvant être par exemple le nitrate d'argent ($AgNO_3$) ou le perchlorate d'argent ($AgClO_4$). Les nanoparticules d'argent sont habillées de thiols et de tailles comprises entre 5 et 7 nm de diamètre, avec une distribution de taille inférieure à 10 %. [30]

I.3.2.3 Voie micellaire inverse

Les micelles inverses (MI) sont des gouttelettes d'eau dans un solvant, stabilisées par un tensioactif. Ce dernier est une molécule amphiphile qui va se placer à l'interface eau-solvant, abaissant ainsi la tension interfaciale. Les MI sont utilisés comme microréacteur pour réaliser la synthèse de nanoparticules. Nous pouvons ensuite distinguer deux modes opératoires pour la réduction : soit l'introduction directe d'agent réducteur en phase aqueuse dans le milieu micellaire, soit l'introduction d'une autre solution micellaire contenant l'agent réducteur. Sous l'effet du mouvement brownien, de multiples et incessantes collisions se produisent, les cœurs aqueux s'échangent et la réaction a alors lieu. Il y a ensuite séparation et reconstitution de nouvelles gouttelettes indépendantes, contenant en leur cœur les nanoparticules. Un agent stabilisant est ajouté à la solution et s'adsorbe à la surface des nanoparticules, assurant leur stabilité et permettant ainsi leur extraction du milieu de synthèse. Plusieurs lavages successifs permettent de retirer le tensioactif résiduel et une sélection en taille par précipitation affine la distribution de taille. La taille des micelles et par conséquent, la taille des nanoparticules, peut être contrôlée par le rapport des concentrations en eau et tensioactif. [9,27]

Les premières nanoparticules d'argent synthétisées via ce système sont bien cristallisées, sphériques, de 4 à 6 nm de diamètre [1]

I.3.2.4 Synthèse radiolytique

La synthèse radiolytique de nanoparticules métalliques consiste à réduire les ions métalliques dans une solution aqueuse. Les espèces réductrices, notamment l'électron solvaté, sont issues du solvant lors de l'irradiation par un rayonnement ionisant, γ ou électrons. Dans un milieu polaire, l'eau par exemple, le passage des rayonnements la décompose en produits radicalaires, moléculaires et ioniques. Les nanoparticules se forment par interaction des espèces réductrices issues du solvant, dont l'électron solvaté, avec les ions métalliques. Entre autres, les nanoparticules en solutions colloïdales de métaux comme l'argent, le cuivre et les structures bimétalliques telles que or/argent [43], alliées ou en structure cœur-coquille. Cette méthode a permis aussi l'élaboration de nanoparticules de (M.Faraday.)nickel supportées sur l'alumine [51], la cérine [56]et l'oxyde de titane[55].

De plus, grâce à la réduction radiolytique d'ions métalliques, de nombreux matériaux nanostructurés de platine et de palladium ont été élaborés sous différentes formes, sphériques et fils. [20]

La synthèse radiolytique constitue aussi un moyen d'élaboration de nanoparticules semiconductrices. La radiolyse pulsée par électrons accélérés permet la formation et l'étude de la croissance des particules. [40]

I.3.2.5 Réduction de sels métalliques

Les sols d'or de Faraday sont les premières nanoparticules sciemment synthétisées. Une solution colloïdale stable de nanoparticules d'or de 6 ± 2 nm de diamètre a en effet été obtenue par réduction d'un sel d'or (NaAuCl_4) avec une solution de phosphore, dans le disulfure de carbone [37]. La réduction de AuCl_4 ou AgNO_3 par le citrate de sodium a quant à elle permet d'obtenir respectivement des nanoparticules d'or de 20 nm de diamètre [29] et plus récemment d'argent beaucoup plus grande (60 à 200 nm de diamètre) avec une large distribution de taille. [64]

I.3.2.6 Décomposition de précurseurs organométallique

Cette méthode de synthèse a été développée par le groupe de Chaudret. Elle consiste en la décomposition d'un précurseur organométallique sous atmosphère réductrice soit de dihydrogène soit de monoxyde de carbone et en présence d'agents stabilisants. [31]

Le principal avantage de cette méthode est l'obtention de particules de petite taille ($f < 10$ nm) possédant une forme et une composition chimique de la surface bien définies. [3]

I.3.2.7 Réduction électrochimique

La voie de synthèse électrochimique, largement développée par le groupe de Reetz *et al.*, consiste en la dissolution oxydative d'une anode afin de former des ions métalliques qui vont ensuite être réduits à la cathode. [42]

L'agglomération des atomes métalliques en présence d'un sel d'ammonium quaternaire servant à la fois d'électrolyte et d'agent stabilisant permet d'obtenir des nanoparticules stabilisées par effet électrostatique. [41]

I.3.3 Synthèse biologique

La synthèse de nanoparticules métalliques est habituellement réalisée par différents procédés physico-chimique cités précédemment. Les produits chimiques utilisés lors de ces synthèses sont souvent toxiques et non respectueux de l'environnement.

Pour y remédier, des recherches ont été récemment menées sur la synthèse des nanoparticules en utilisant des produits biologiques naturels tels que les plantes. Ces produits sont utilisés sous forme d'extraits ou sous forme d'huiles essentielles solubles. L'intérêt de ce domaine de recherche est principalement au fait que les produit naturels n'agressent pas l'environnement et sont écologiquement satisfaisant.

Les extraits de plantes sont considérés comme des antioxydants et peuvent agir à la fois comme agents réducteurs et agents stabilisants. [50]

Des nanoparticules bimétalliques or/argent ont été synthétisées à température ambiante en utilisant le jus de fruit de grenade par M. MeenaKumari *et al.* (2015) La réduction simultanée des ions d'or et d'argent conduit à la formation de l'alliage. [39]

I.4 Propriétés des nanocomposites

Dans les nanocomposites, les propriétés physico-chimiques et biologiques recherchées sont assurées à la fois par la taille qui est à l'ordre du nanomètre et par la synergie entre la matrice et le renfort L'incorporation des nanoparticules dans une matrice métallique présente plusieurs avantages par rapport aux charges micrométriques classiques, du fait de la nature nanométrique du renfort.

Les propriétés physiques et chimiques de ce dernier sont différentes de celles du massif correspondant et cela est dû à l'effet quantique de taille (Haruta, 1997) (Cuenya) (E.P.Sardella).

L'une des conséquences de l'effet quantique de taille du point de vue géométrique est l'augmentation du rapport des atomes de surface sur celle du volume. A mesure que la taille des particules diminue la proportion d'atomes en surface augmente par rapport aux atomes en volume. Lorsque le renfort est de l'ordre du nanomètre, la structure

électronique est modifiée. Il y aura passage de la structure de bandes du massif à une structure comprenant des niveaux électroniques discrets. Ainsi le gap devient plus grand que celui du massif correspondant au fur à mesure que la taille diminue.

La taille du renfort rend l'utilisation des nanocomposites intéressante pour de nombreuses applications qui nécessitent la transparence du matériau, comme dans le cas des nanoparticules de l'oxyde de titane qui auront une meilleure activité lorsqu'elles sont dopées par des nanoparticules d'argent l'effet de diminution de la taille peut être résumé comme suit :

I.4.1 Propriétés catalytiques

La diminution de la taille des nanoparticules entraîne un rapport surface sur volume important qui joue un rôle prédominant dans les propriétés mettant en jeu des échanges à l'interface entre l'objet considéré et son environnement. Ce large pourcentage d'atomes de surface rend les matériaux plus réactifs d'un point de vue chimique, ce qui en fait des candidats potentiels très prometteurs pour les applications en catalyse hétérogène. Haruta et al. ont mis en évidence que les nanoparticules d'or d'environ 3 nm de diamètre catalyse activement l'oxydation du CO tandis qu'elles sont inactives pour des tailles supérieures à 10 nm. [23]

Depuis ces observations, des efforts considérables ont été faits afin d'étudier l'influence de la taille des nanoparticules sur l'activité catalytique. Il est important de noter que d'autres facteurs tels que la forme, la composition ou l'état d'oxydation des nanoparticules peuvent également jouer un rôle dans la réactivité des nanoparticules. [13]

I.4.2 Propriétés antimicrobiennes

Les nanoparticules métalliques représentent un réservoir d'ions, permettant de conserver une activité antimicrobienne pendant un laps de temps plus long que dans le cas d'une inclusion sous forme de sels [15]. Selon Gibbins et Werner (2005), l'argent ionique est actif pour une courte période, de l'ordre de quelques jours, alors que les nanoparticules d'argent peuvent libérer des ions jusqu'à 100-200 jours en fonction de leur quantité et de la nature de la matrice. Les ions Ag⁺ sont progressivement libérés par oxydation de la surface des particules métalliques lors de l'exposition à l'air ou à un

milieu humide, puis dissolution de l'oxyde d'argent dans le milieu environnant. En raison de leur aire spécifique élevée, le potentiel de relargage d'ions Ag^+ par les nanoparticules est important [4]. Par conséquent, les nanoparticules d'argent sont plus réactives que l'argent massif. Le relargage d'ions Ag^+ contribue donc à l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent. [58]

Sondi et Salopek-Sondi (2004) ont démontré l'activité bactéricide de nanoparticules d'argent en suspension (diamètre : 12 ± 4 nm) sur *E. coli* en milieu gélosé, pour des concentrations de l'ordre de 10 à 50 mg/L. En utilisant la microscopie électronique à balayage (MEB), ils ont observé une altération de la paroi cellulaire (formation de « trous » dans la membrane externe). Ces altérations entraînent une augmentation de la perméabilité, conduisant à la libération des constituants cellulaires, et, par suite, à la mort d'une fraction de la population bactérienne. [24]

Kim *et al.* (2007) ont étudié l'activité antimicrobienne de nanoparticules d'argent (diamètre ~ 10 nm) sur *E. coli*, *S. aureus* et sur une souche de levure, en milieu gélosé (méthode du disque d'inhibition). Les auteurs suggèrent que l'action antimicrobienne des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules. Les résultats obtenus sur les trois microorganismes testés montrent que *E. coli* est plus sensible que la levure, elle-même plus sensible que *S. aureus*. [28]

Les auteurs expliquent que ces variations sont dues à la différence dans la composition de la paroi cellulaire bactérienne. [33]

I.4.3 Propriétés magnétiques

Les matériaux ferromagnétiques se caractérisent par un alignement spontané des moments magnétiques de chaque entité élémentaire dans la même direction, contrairement aux matériaux paramagnétiques pour lesquels l'orientation est aléatoire. A haute température, les matériaux ferromagnétiques subissent une transition vers un état paramagnétique. En effet, l'énergie thermique désorganise le système et vient contrer l'alignement, laissant une orientation aléatoire des moments magnétiques. La température de transition est appelée température de Curie. Celle-ci décroît avec la taille du matériau étudié. Au-dessous d'une certaine taille, le système se comporte comme un matériau paramagnétique du point de vue de sa courbe d'aimantation, même en-dessous

de sa température de Curie, alors qu'il devrait être ferromagnétique, c'est le super paramagnétisme.[53]

La compréhension des paramètres clés déterminant les propriétés magnétiques des nanoparticules permet d'envisager des applications notamment dans le domaine de l'électronique (stockage de l'information) ou de la médecine. Ces propriétés peuvent notamment être affectées par la forme des nanoparticules. Il est à noter que certains matériaux non magnétiques à l'état massif le deviennent à l'échelle nanométrique, comme par exemple le rhodium. [63]

I.4.4 Propriétés optiques

La réduction de la taille d'un objet semi-conducteur ou métallique à l'échelle nanométrique conduit à de fortes modifications de sa réponse dans le domaine optique, comparée à celle du massif. Les nanoparticules métalliques exhibent une résonance plasmonde surface. Les caractéristiques (position spectrale, amplitude et largeur spectrale) de cette dernière dépendent de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules.

Link et al. ont étudié la réponse optique de nanoparticules d'or sphériques en fonction de leur taille, variant de 9 à 99 nm. [35]

Il apparaît que lorsque la taille des particules diminue, la position spectrale de la résonance plasmon se déplace vers les basses longueurs d'ondes. La dépendance de la réponse optique en fonction de la forme des particules a également été mise en évidence. Mock et al. ont en effet élaboré par voie colloïdale des nanoparticules d'argent aux formes et tailles variées (triangulaire, sphérique, pentagonale). [45]

Ils ont alors observé que le spectre se décale vers les grandes longueurs d'ondes en partant des sphères aux triangles ainsi que lorsque leur taille augmente.

I.5 Caractérisation des nanoparticules

La caractérisation des nanoparticules est importante pour comprendre et contrôler la synthèse et les applications des nanoparticules. La caractérisation est effectuée en utilisant une variété de techniques différentes tels que la transmission et la microscopie électronique à balayage .Microscopie à force atomique (AFM), lumière dynamique diffusion (DLS), spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS) diffractométrie des rayons X sur poudre (XRD), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et spectroscopie UV-Vis et Ces techniques sont utilisées pour la détermination de différents des paramètres tels que la taille des particules, la forme, la cristallinité, les fractales dimensions, taille des pores et surface. De plus, l'orientation, intercalation et dispersion de nanoparticules et nanotubes dans matériaux nanocomposites pourraient être déterminés par ces techniques. Par exemple, la morphologie et la taille des particules pourraient être déterminé par TEM, SEM et AFM. L'avantage de AFM sur des microscopes traditionnels tels que SEM et TEM est que l'AFM mesure des images en trois dimensions de manière à pouvoir calculer la hauteur et le volume des particules. De plus, la diffusion dynamique de la lumière est utilisée pour la détermination des particules distribution de taille. De plus, la diffraction des rayons X est utilisée pour la détermination de la cristallinité, tandis que la spectroscopie UV-Vis est utilisée pour confirmer la formation d'échantillon en montrant la résonance du plasmon. [34]

I.5.1 Mesure de la taille et du degré d'agrégation

Si la définition des NPs inclut des éléments de l'ordre de la centaine de nanomètres ou moins, de nombreuses études rapportent des phénomènes plus ou moins importants d'agrégation, en particulier dans les milieux biologiques. Il existe différentes méthodes de détermination de la taille et du degré d'agrégation des NPs (Jones, C., *and* Grainger, D.W., 2009). Les principales sont les suivantes

I.5.1.1 La microscopie électronique à transmission ou à balayage

Ces techniques bien établies permettent une visualisation des NPs isolées ou agrégées, fournissant ainsi des données sur leur taille, leur forme et leur structure cristalline ; elles sont surtout utilisées pour caractériser des particules métalliques. Cependant, elles impliquent des équipements onéreux, et ne sont donc pas les plus fréquemment employées. De plus, la préparation des échantillons nécessite des procédés de dessiccation pouvant induire des modifications des tensions de surface, conduisant ainsi à des artefacts d'agrégation. Leur utilisation doit donc le plus souvent être complétée par d'autres techniques de mesure.

I.5.1.2 La spectroscopie UV-visible

Elle est basée sur les propriétés d'absorption ou de diffusion de la lumière des métaux, suite à l'excitation des électrons de surface par les photons d'une longueur d'onde particulière (excitation plasmonique) ; à une dimension donnée correspond un pic d'absorbance plasmonique spécifique. Elle est couramment employée pour les métaux purs (or, argent, cadmium, étain, indium, plomb, mercure), mais beaucoup plus difficile à mettre en place pour les oxydes métalliques, dont les propriétés plasmoniques variables modifient les énergies d'absorption du métal seul. Cette technique est également sensible aux modifications de surface liées à l'absorption non spécifique de contaminants, notamment issus des milieux biologiques.

I.5.1.3 La diffusion dynamique de lumière (DLS)

C'est l'une des techniques les plus employées pour déterminer la taille des particules, aussi bien à l'échelle micrométrique que nanométrique. Elle est également basée sur les propriétés de diffusion de la lumière par les particules, mais présente l'avantage de pouvoir être appliquée à tous les types de nanomatériaux, organiques (protéines par exemple) ou inorganiques (NPs métalliques). Cependant, elle est aussi plus sensible à la présence dans le milieu de contaminants (protéines non souhaitées, sels, surfactants...), qui peuvent également influencer la stabilité des NPs. Elle nécessite donc de travailler avec des solutions les plus pures possibles, et de réaliser de nombreux tests de calibration.

D'autres techniques sont aussi disponibles, bien que moins couramment utilisées. On peut citer par exemple :

I.5.1.4 La polarisation par fluorescence

Plus largement utilisée dans le domaine biomédical (*drugdiscovery*) pour analyser les interactions entre NPs et ligands (récepteurs, membranes, protéines...)

I.5.1.5 La diffraction aux rayons X (DRX)

Qui permet d'estimer la taille de la fraction cristalline des particules, et la diffusion aux rayons X à petit angle (« *small angle X-ray scattering*», SAXS), qui permet d'accéder à la taille globale des particules qu'elles soient cristallines ou non. Ces deux techniques sont applicables à des particules de l'ordre de 1 à 100 nm, complémentaires l'une de l'autre et sont donc souvent utilisées en parallèle pour une meilleure précision des résultats. Ceci permet par exemple de déterminer si une particule donnée ne contient qu'une phase (amorphe ou cristalline) ou plusieurs phases (cas des oxydes).

I.5.1.6 La diffusion de lumière laser multi-angle MALLS

Dont le principe est similaire à celui du DLS, mais qui est plus adapté pour les agrégats de grande taille.

I.5.1.7 La spectrométrie de masse ICP-MS

Utilisée en particulier pour les particules contenant des métaux, et qui permet d'accéder notamment à des données quantitatives sur les particules (concentration, quantité de métal associée...), mais ne fournit pas d'informations sur leur taille. L'ICP-MS est donc à utiliser en complément d'autres méthodes telles que le DLS ou la spectroscopie optique. [61]

CHAPITRE II : NANOPARTICULE DE TiO₂/ Ag

II.1 Dioxyde de titane (TiO₂)

II.1.1 Origine du TiO₂

Le titane est le neuvième élément le plus abondant dans la croûte terrestre devant l'hydrogène et derrière le magnésium. Le titane y est majoritairement retrouvé sous sa forme oxydée dans des minerais mixtes tels que l'ilménite (FeTiO₃), la pérovskite (CaTiO₃) ou bien la titanite (CaTiSiO₅). Le TiO₂ pur existe également dans la nature sous les formes décrites ciaprès. Le titane peut être obtenu par un procédé d'extraction utilisant des chlorures. Cette technique optimisée par le chimiste français Henri Sainte-Claire Deville permet d'obtenir le tétrachlorure de titane (TiCl₄) qui peut ensuite être réduit *via* le « procédé Kroll » pour obtenir du titane solide. Le TiO₂ peut également être extrait des différents minerais par des traitements à l'acide sulfurique produisant le titanyle TiOSO₄. Ce composé peut ensuite être hydrolysé et déshydraté pour donner du TiO₂.

II.1.2 Structures et propriétés du TiO₂

Tableau 1: Propriétés structurales des structures cristallines possibles du TiO₂
[54]

Phase	Rutile	Anatase	Brookite
Système	quadratique P	quadratique I	orthorhombique P _{bca}
Symétrie	D _{4h} ¹⁴	D _{2h} ¹⁹	D _{2h} ¹⁵
Nombre de TiO ₂ par maille	2	4	8
Paramètres de maille (Å)	a = 4,594 b = 2,958	a = 3,785 b = 9,514	a = 9,184 b = 5,447 c = 5,145
Rayons atomique (Å)	r(Ti ⁴⁺) = 0,605 r(O ₂ ⁻) = 1,36	r(Ti ⁴⁺) = 0,605 r(O ₂ ⁻) = 1,36	r(Ti ⁴⁺) = 0,605 r(O ₂ ⁻) = 1,36
d(Ti ⁴⁺ - O ₂ ⁻) (Å)	1,95 – 1,99	1,93 – 1,98	1,86 – 2,04
Coordinance	[Ti ⁴⁺] = 6 [O ₂ ⁻] = 3	[Ti ⁴⁺] = 6 [O ₂ ⁻] = 3	[Ti ⁴⁺] = 6 [O ₂ ⁻] = 3
Compacité	0,705	0,645	0,655
Masse volumique (g.cm ⁻³)	4,24	3,89	4,12
Dureté (Mohs)	6 – 6,5	5,5 – 6,0	5,5 – 6,0
Indice de réfraction	2,61-2,89	2,48-2,56	2,58-2,70
Enthalpie de formation Δ _f H°(298,15K) (kJ.mol ⁻¹)	-944,50±0,96	-939,27±1,26	-941,00
Entropies de formation Δ _f S°(298,15K) (kJ.mol ⁻¹ .K ⁻¹)	50,37±0,21	49,95±0,42	-

Le TiO_2 est un composé chimiquement inerte à haut indice de réfraction qui présente une activité photo-catalytique. Il existe sous trois formes cristallines : anatase, rutile et brookite. Les propriétés structurales de chacun de ces polymorphes sont présentées dans le tableau 1.

Le rutile est une forme (macroscopique) thermodynamique stable tandis que l'anatase et la brookite sont des formes métastables qui tendent à se transformer en rutile de manière irréversible à température élevée ($750-915^\circ\text{C}$). Elles sont majoritairement obtenues lors des synthèses par chimie douce. Les trois structures, présentées sur Figure 3, sont constituées d'octaèdres TiO_6 déformés reliés de manières différentes. La brookite adopte une structure orthorhombique où les octaèdres partagent trois arêtes. Le rutile possède une structure dans laquelle deux arêtes opposées de chaque octaèdre sont partagées pour former une chaîne linéaire le long de l'axe c . Enfin l'anatase cristallise en un réseau quadrique dans lequel les octaèdres sont assemblés en zig-zag en partageant quatre arêtes. De manière générale, la structure rutile est la plus communément retrouvée dans la nature. Cependant, en dessous d'une certaine taille (quelques dizaines de nanomètres), c'est la phase anatase qui est thermodynamiquement la plus stable.

Le TiO_2 est par ailleurs un composé très inerte. Il est en effet insoluble dans tous les liquides à l'exception de l'acide sulfurique et l'acide fluorhydrique.

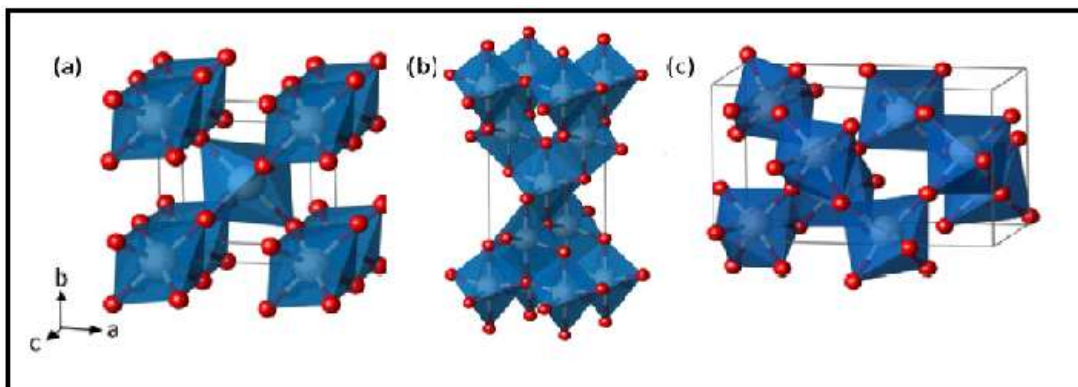


Figure 3 : représentation 3D des structures (a) rutile,(b) anatase,(c) brookite.[54]

II.1.2.1 Propriétés optiques

Selon les phases cristallines, l'indice de réfraction du TiO₂ varie mais reste élevé (tableau 2). Ainsi, 96% de lumière est réfléchi ce qui donne à l'œil humain une impression de couleur blanche. Cette propriété et son grand pouvoir couvrant, font du TiO₂ un pigment de choix, massivement utilisé dans l'industrie des peintures.

Tableau 2: Indice de réfraction et valeur du gap énergétique des phases du TiO₂

Phase	Rutile	Anatase	Brookite
Indice de réfraction	2.61-2.89	2.48-2.56	2.58-2.70
Band gap	3.02eV(411nm)	3.23eV(384nm)	3.14eV(395nm)

II.1.2.2 Propriétés électroniques

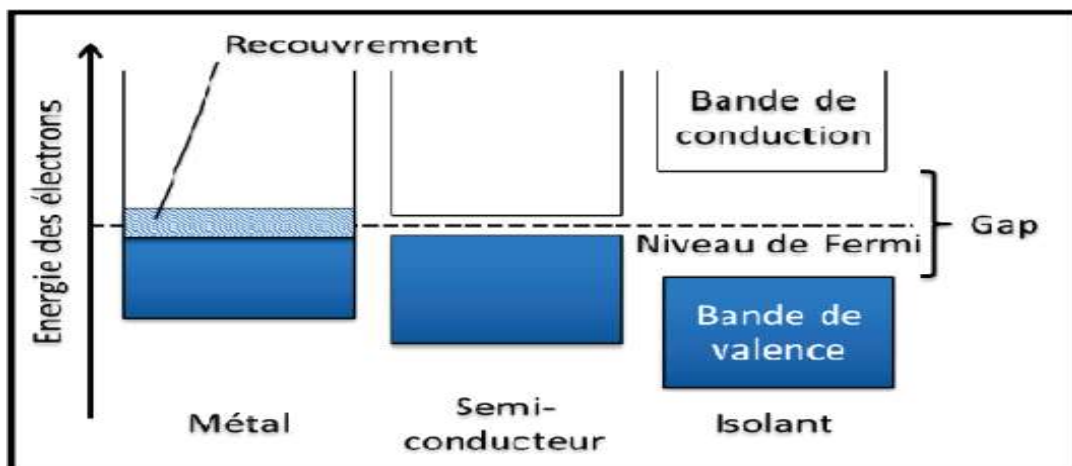


Figure 4 : représentation schématique des différences de hauteur de gap pour un métal, un semi-conducteur et un isolant. [54]

L'énergie de gap du TiO₂ est de l'ordre de 3 eV (Tableau 2) activable par l'énergie d'un rayonnement électromagnétique ultra-violet.

II.1.3 Utilisations dans le domaine cosmétologique et pharmaceutique

II.1.3.1 Utilisation pour les cosmétiques et crèmes solaires

Le TiO₂ est aussi largement utilisé comme principe actif dans les crèmes solaires. En effet, il peut bloquer les rayons UV du spectre solaire grâce à son gap énergétique à forte absorption de la lumière ultra-violette. La dimension nanométrique rend par ailleurs les crèmes plus transparentes, moins visqueuses et plus adhérentes à la peau. Les NPs de TiO₂ utilisées par les industriels sont cependant parfois recouvertes d'un revêtement d'alumine ou de silice afin de passiver leur surface.

II.1.3.2 Utilisation dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique

Le TiO₂ micro-et nanométrique est également utilisé comme colorant alimentaire sous le nom de E171. On le retrouve enfin dans certains dentifrices et médicaments principalement en tant qu'excipient ou fluidifiant.

II.1.3.3 Activité antibactérienne de l'oxyde de titane

C'est vrai qu'à l'état microscopique le dioxyde de titane ne possède pas une activité antibactérienne, cependant à l'ordre nanométrique une activité antimicrobienne apparaît. [54]

II.2 Argent

L'argent, élément chimique de symbole Ag et de numéro atomique 47, le nom scientifique "argent" vient du latin "argentum" qui dérive du mot grec "arguros" qui signifie "blanc étincelant" ou "blanc clair". L'argent est l'un des métaux les plus anciennement connus. Il semble cependant que sa découverte soit postérieure à celle des deux autres métaux de la même famille chimique : l'or et le cuivre. Dès la première dynastie égyptienne, vers 3500 avant J.-C., sa rareté, son blanc très pur et son inaltérabilité le faisaient employer comme monnaie, sa valeur étant supérieure à celle de l'or. [12]

II.2.1 Etat naturel

L'argent est disséminé sur toute la surface de la Terre. C'est cependant un métal très rare qui ne vient qu'au 63^e rang dans l'ordre d'abondance des éléments de l'écorce terrestre. Il existe naturellement sous plusieurs degrés d'oxydation, les plus courants étant le degré 0 (Ag métal) et le degré +1 (sels AgCl, Ag₂S, AgNO₃, ...)[72].

Les principales espèces minéralogiques considérées comme minerais possibles d'argent se répartissent en trois groupes :

- L'argent natif, très rarement en quantité notable, ne constitue pas une source importante de métal.
- Les minerais sulfurés, séléniés et tellurés sont des minerais de profondeur et constituent la source la plus importante d'argent. Le principal est l'argentite,
- Les minerais halogénés se rencontrent surtout dans les affleurements. Le plus important est le chlorure (cérargyrite).

II.2.2 Structures et propriétés du l'argent

L'argent est placé dans le groupe 11 (IB), 5^{ème} période, bloc d, après le cuivre et entre palladium (groupe 10) et cadmium (groupe 12) dans le tableau périodique, sa configuration atomique est [Xe] 4d¹⁰ 5s¹.

L'argent cristallise dans le système cubique. La maille élémentaire est cubique à faces centrées.

De tous les éléments l'argent est le meilleur conducteur de la chaleur. Sa conductivité thermique est égale à 420 W (m⁻¹ (K⁻¹).

Du point de vue optique, l'argent poli possède un pouvoir réflecteur très élevé dans l'infrarouge et sensiblement plus faible dans l'ultraviolet. Son pouvoir émissif est très faible, vraisemblablement l'un des plus bas de tous les éléments.

De tous les éléments, l'argent est également le meilleur conducteur de l'électricité. L'argent est nettement diamagnétique.

L'argent est un métal relativement mou. Sa dureté dans l'échelle de Mohs est comprise entre 2,5 et 3, sensiblement égale à celle du cuivre. Elle est notablement augmentée par l'addition de petites quantités de cuivre. [12]

L'argent est un métal de transition qui ne présente pas des propriétés catalytiques et magnétiques très particulières, mais il est bien connu pour son aptitude à former des agrégats de faible nucléarité, dans différents matrices et supports. Il est le seul cation monovalent noble qui forme des espèces mononucléaires stables dans l'eau. [62]

II.2.3 Nanoparticule d'argent

Le nano-argent est défini comme étant de l'argent sous forme d'un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé, contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules présentent une ou plusieurs dimensions se situant entre 1 et 100 nm. [72]

II.2.4 Activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent

Comparé aux sels d'argent, l'avantage des nanoparticules d'argent métallique réside dans le fait qu'elles représentent un réservoir d'ions Ag^+ permettant une activité antibactérienne pendant une période de temps plus longue. Ainsi Gibbins et Werner ont montré que les nanoparticules d'argent peuvent libérer des ions jusqu'à 100-200 jours en fonction de leur quantité et de la nature de la matrice, alors que l'argent ionique est actif sur une période de quelques jours. La libération des ions argent se fait progressivement par oxydation de la surface des particules métalliques lors de l'exposition à l'air ou à un milieu humide, puis dissolution de l'oxyde d'argent dans le milieu environnant (phénomène de «leaching»). Comme les nanoparticules d'argent présentent une aire spécifique très élevée, leur potentiel de relargage d'ions Ag^+ est aussi important. Par conséquent, les nanoparticules d'argent sont plus actives que l'argent massif vis-à-vis des bactéries, ce qui explique en partie leurs propriétés biocides. [48]

Leur mécanisme d'action est favorisé par leur interaction avec la paroi du microorganisme puis la pénétration dans la cellule rendue possible par «évitement» des mécanismes de défense observés dans le cas de particules de taille plus importante, et enfin par leur interaction avec les constituants cellulaires (ADN, protéines, enzymes) .

Selon Kim et al., l'action biocide des nanoparticules est liée à la présence de radicaux libres, générés en surface, qui endommagent la membrane lipidique des cellules .

En conclusion, les nanoparticules d'argent présentent une activité biocide à large spectre, due au relargage progressif et contrôlé d'ions Ag^+ , mais aussi à une efficacité propre par interaction directe avec les cellules. [48]

II.2.5 Nanoparticules d'argent : bénéfiques et risques

Depuis la fin des années 1990, l'utilisation de nanoparticules d'argent colloïdal connaît un essor extrêmement important en raison de leur réactivité élevée et de leur capacité à libérer progressivement, et de manière contrôlée et durable, les ions Ag^+ . Aujourd'hui, on assiste à une véritable explosion du marché économique des produits contenant des nanoparticules d'argent. Le marché européen des produits et équipements contenant de l'argent est passé de 30 tonnes environ en 2004 à 130 tonnes en 2010.

II.2.5.1 Prévention des infections dans le domaine biomédical

L'utilisation la plus répandue de l'argent sous forme de nanoparticules correspond aux pansements et aux différents soins employés dans le domaine médical. Des pansements dits «argentiques» contiennent des nanoparticules d'argent colloïdal adsorbées sur leur surface. C'est le cas par exemple des pansements Acticoat®, ActisorbSilver® Silverlon® ou Hansaplast®. Ces produits ont prouvé leur efficacité antimicrobienne envers différentes bactéries à Gram positif et négatif et les levures. De plus, selon certains auteurs, l'argent participerait à la guérison anticipée des blessures. Les bénéfices thérapeutiques de ces pansements ont été évalués in vivo sur des modèles animaux et par des essais cliniques. Ils sont aujourd'hui couramment utilisés avec succès dans les hôpitaux et centres de soins. En outre, leurs applications et retraits quotidiens sont moins douloureux pour le patient que les crèmes et, contrairement au nitrate d'argent, leur utilisation ne provoque pas d'irritations.

Des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux ont également été fabriqués à partir de polymères imprégnés d'argent sous forme métallique ou oxydée, afin de prévenir la formation de biofilms bactériens. Bien que la plupart des travaux réalisés avec ces cathéters aient démontré leur activité antimicrobienne, et par conséquent, une réduction des coûts d'hospitalisation, certaines études soulèvent le problème d'une efficacité relativement faible *in vivo*.

II.2.5.2 Applications dans le domaine agro-alimentaire et le traitement de l'eau

L'argent est employé dans l'industrie alimentaire pour éviter les contaminations microbiennes et prévenir l'apparition d'un goût métallique. Des équipements en argent sont utilisés pour la manipulation d'huiles essentielles, de sirops et de jus de fruits.

Les nanoparticules d'argent sont également utilisées pour empêcher le développement d'agents infectieux, notamment les *Legionella*, dans les circuits de distribution d'eau potable. Différents travaux démontrent l'efficacité antimicrobienne de filtres de polyuréthane, de céramique ou de charbon actif contenant ces nanoparticules. Zodrow et ses collaborateurs ont imprégné des membranes de filtration en polysulfone avec des nanoparticules d'argent. Ces membranes ont provoqué une réduction de la viabilité d'*E.coli*, une inhibition de la croissance de *P. mendocina* et ont également favorisé l'élimination de virus. De manière similaire, des systèmes de filtration de l'air contiennent des nanoparticules d'argent incorporées dans le charbon actif composant la membrane.

II.2.5.3 Risques liés à l'utilisation de nanoparticules d'argent

L'utilisation des pansements et des crèmes «argentiques» ne fait pas débat car leur emploi est peu fréquent, limité dans le temps et restreint à un individu donné, avec des bénéfices thérapeutiques avérés. En revanche, l'exploitation commerciale des produits «nanoargent » explosant à l'heure actuelle, il nous a semblé important de nous intéresser à la fois aux conséquences liées à l'utilisation de ces ions et des nanoparticules d'argent.

La plupart des études montre que l'argent ionique n'induit pas de conséquences négatives pour l'être humain, aux concentrations requises pour obtenir une activité antimicrobienne. [48]

II.3 Généralité sur les bactéries étudiées

II.3.1 *Escherichia coli* (**E. coli**)

E. coli est un bacille à Gram négatif. C'est un hôte commun de la microflore intestinale de l'homme et des animaux à sang chaud (mammifères et oiseaux). C'est une bactérie de « référence » pour la recherche, habituellement peu pathogène et d'une manipulation simple [22]. Elle se reproduit toutes les 20 min dans les conditions optimales de croissance. Typiquement elle se présente sous la forme de bâtonnets de 2-4 µm de longueur

Certaines souches d'*E. Coli* présentent un pouvoir pathogène comme *E. coli*O157:H7 qui se retrouve dans les aliments non stériles tels que le lait cru, les plats non cuisinés et dans la viande (steak haché). Les symptômes couramment associés avec cette bactérie sont la diarrhée et la gastroentérite. Dans notre cas elle servira de référence pour la famille des bactéries à Gram négatif. [28]

II.3.2 *Staphylococcus aureus* (**S. aureus**)

S. aureus est une cocci à Gram positif. C'est une bactérie pyogène et toxigène, responsable de nombreuses infections communautaires qui représente donc un problème de santé publique important. Elle provoque de nombreuses infections suppuratives dues à la multiplication de la bactérie et des infections toxiques liées à la diffusion de toxines spécifiques. Typiquement elle se présente sous forme de coques sphériques de diamètre 1µm. *S. aureus* se trouve généralement dans les fosses nasales et sur la peau de personnes en bonne santé. Si elle pénètre dans le corps, elle peut causer des infections cutanées légères, telles que des furoncles ou des anthrax, ou désinfections plus graves, comme des pneumonies ou des bactériémies.

S. aureus sera utilisé dans nos travaux comme bactérie de référence pour les Gram positif. [53]

II.3.3 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa (ou bacille pyocyanique) est une bactérie à Gram négatif, aérobie stricte, dépourvue de capsule. Comme la plupart des espèces appartenant au genre *Pseudomonas*, *P. aeruginosa* n'exige aucun facteur de croissance. C'est une bactérie hautement versatile dotée d'une grande adaptabilité nutritionnelle et métabolique. Par conséquent, elle peut être isolée en culture sur des milieux ordinaires ou sur des milieux rendus sélectifs par addition d'inhibiteur, tel que le cétrimide. Elle est strictement aérobie et sa température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C. Les cultures de *P. aeruginosa* dégagent une odeur caractéristique, et produisent le plus souvent des pigments de pyocyanine et de pyoverdine. L'espèce *P. aeruginosa* est ubiquitaire dans l'environnement et peut être commensale du tube digestif. Dans l'environnement, elle est trouvée dans le sol, dans l'eau, à la surface des plantes et des animaux. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* est parfois retrouvée dans les solutions aseptiques et sur les instruments tels que les cathéters, les sondes, ou encore dans les canalisations, les lavabos. (Wolfgang, Kulasekara *et al.* 2003).[17]

II.3.4 *Bacillus subtilis*

Bactérie Gram positives, Le genre *Bacillus* correspond à des bactéries en forme de bâtonnets (1,2 à 10 µm de long), chimio-hétérotrophes, généralement mobiles (présence de flagelles péritriches), habituellement présentes dans le sol. Ce sont des bactéries aérobies strictes ou facultatives.

B. subtilis est « l'espèce type » du genre et la bactérie Gram-positive la plus étudiée. Son génome a ainsi en réponse à des conditions défavorables, ces bactéries ont donc la capacité de former par enkystement des endospores métaboliquement inactives et qui peuvent survivre sous cette forme plusieurs millions d'années.

En effet, lorsque les conditions redeviennent favorables pour la croissance, la spore peut retourner à son état végétatif (via la germination) et coloniser l'environnement par multiplication.

Ces spores représentent une préoccupation majeure des industries alimentaires, car elles sont responsables de détérioration d'aliments et de toxi-infections alimentaires. [5]

II.4 Généralité sur les champignons et les levures étudiés

II.4.1 *Candida albicans*

Les levures du genre *Candida* sont des micromycètes, c'est-à-dire des champignons microscopiques.

C. albicans vit à l'état saprophyte dans le tube digestif de l'Homme. Sa découverte dans le milieu extérieur résulte d'une contamination par l'Homme ou l'animal. Il est présent dès les premiers mois de la vie, transmis par contact maternel. Il devient pathogène sous l'influence de divers facteurs comme l'immunodépression due à une chimiothérapie intensive par exemple, l'âge avancé. Sa dissémination est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif par contiguïté vers les voies génitales, respiratoires, la peau ou par voie hématogène vers tous les organes. Il a un tropisme particulier pour les reins et l'œil. [6]

CHAPITRE III : TOXICITE DES NANOPARTICULES

Face au développement exponentiel des nanotechnologies, et malgré des bénéfices potentiels conséquents dans de nombreux domaines, des inquiétudes sont émises quant à l'éventuelle toxicité humaine et environnementale des nanoparticules, leur biodégradabilité, ou encore leurs effets secondaires à long terme. Ces questions sont motivées par la connaissance des effets toxiques sur la santé des particules micrométriques de la pollution atmosphérique, et la crainte de voir s'amplifier des réponses toxiques du fait de la nanodimension mise en cause. À l'heure actuelle, les effets des nanoparticules sur la santé humaine ne sont que très peu ou pas documentés en termes épidémiologiques.

Certaines propriétés toxiques incitent le législateur à identifier et étiqueter les nanoparticules de manière spécifique. Si certaines propriétés toxiques sont communes aux nanoparticules comme agents de stress oxydatif, ces propriétés ne sont pas uniquement dues à la taille des particules, mais aussi à leur forme, à leur état de surface et à leur composition. Il paraît donc souhaitable de traiter le problème de la toxicité des nanoparticules de manière spécifique à chaque substance, ou groupe de substances, en introduisant dans leur évaluation d'impact une clause particulière dans le cas de la préparation intentionnelle de ces substances à l'état nanoparticulaire. Les modalités de concentration/dilution et la durabilité des nanoparticules dans le milieu, notamment dans les eaux et les boues résiduelles, mises en évidence dans le cas de l'argent et de l'oxyde de titane, suggèrent que le comportement des nanoparticules dans l'environnement doit être surveillé.

III.1 Cadre de l'exposition

L'exposition aux nanoparticules peut avoir lieu dans un cadre professionnel ou privé. En effet, les travailleurs impliqués dans le secteur des nanotechnologies peuvent être exposés au moment de la production même des nanoparticules, ou de leur transport ou encore de leur stockage. Ces travailleurs (impliqués dans la fabrication et l'utilisation des nanoparticules) sont actuellement autour de 20 000 au niveau mondial, et leur nombre est en augmentation constante. Selon une estimation de la National Science Foundation, environ deux millions de travailleurs impliqués dans la fabrication ou

l'utilisation de matériaux nanométriques seront employés dans l'industrie des nanotechnologies dans les 15 prochaines années. Les nanoparticules manufacturées peuvent être libérées dans l'environnement, dans le cadre de leur cycle de vie, et de ce fait atteindre la population générale.

La population générale peut aussi être exposée du fait de l'utilisation de produits contenant des nanoparticules. Ces produits sont déjà disponibles sur le marché. Le Woodrow Wilson International Center for Scholars aux États-Unis s'est donné pour mission, depuis 2006, de faire un inventaire de tous les produits contenant des nanomatériaux accessibles aux consommateurs. On en dénombre plus d'un millier actuellement, et cette liste augmente continuellement. Par exemple, des nanoparticules de dioxyde de titane (TiO₂) sont utilisées dans des crèmes solaires dans le but d'améliorer l'étalement de la crème sur la peau et de favoriser la protection contre les UV. On peut aussi citer des additifs alimentaires utilisés pour améliorer la dispersion des poudres (sel, chocolat en poudre...), ou encore des vêtements, des équipements sportifs. [25]

III.2 Mécanismes à l'origine de leur toxicité

Les nanotubes de carbone constituent une classe particulière en ce qu'ils ont un comportement spécial par leur forme élémentaire qui les rapprochent des fibres d'amiante pour leur potentiel inflammatoire, et leur capacité à produire des mesothéliomes par injection intra péritonéale chez des souris hétérozygotes. La toxicité spécifique des nanoparticules non tubulaires tient à la possibilité qu'ont les particules ultrafines de pénétrer les épithéliums, de diffuser globalement dans l'organisme et d'atteindre des cibles que ne permettraient ni la phase soluble de la même substance ni sa phase particulaire dans la gamme de tailles du micromètre. Cette faculté est utilisée pour la vectorisation de médicaments dont les principes actifs sont greffés en surface de nanoparticules. Toutefois, la possibilité de passer les barrières épithéliales est très variable selon les nanoparticules environnementales et selon la voie d'entrée, la voie pulmonaire étant la plus perméable. Il reste que le transfert, généralement faible, des nanoparticules les plus fines (2 nm) au travers des alvéoles pulmonaires vers l'interstitium, puis leur stockage dans les reins, les testicules, le thymus et le cerveau sont établis de même que le passage transplacentaire des nanoparticules d'oxyde de

titane vers les nerfs et le cerveau du fœtus dans des conditions massives d'exposition de la mère.

La faible taille des nanoparticules n'est pas favorable à leur phagocytose. La pénétration intracellulaire des nanoparticules se fait par les vésicules d'endocytose, mais pas uniquement, certaines peuvent rester libres dans le cytoplasme, le noyau, les mitochondries. Leur internalisation est à l'origine d'un stress oxydatif qui est le phénomène le plus constant associé à leurs effets toxiques. Ce stress oxydatif peut aboutir avec certaines particules à une génotoxicité. Elle est démontrée pour les particules de noir de carbone et bloquée par la n-acetylcystéine. Les lésions induites dans l'ADN, ralentissent le cycle cellulaire et induisent la voie de signalisation pro-inflammatoire NFkB et AP1 dépendante avec libération de cytokines. Le nano argent a fait l'objet d'une synthèse détaillée. Il est également à l'origine d'un stress oxydatif sur les cellules de mammifères, en particulier les cellules souches germinales et les cellules embryonnaires. Son action est distincte de celle de l'ion argent, en particulier à faible concentration. Il interagit avec le métabolisme mitochondrial, diminuant la concentration d'ATP, et ses effets cytotoxiques sont bloqués par le glutathion réduit, la superoxydedismutase (SOD) et la catalase. Ces phénomènes sont observés sur cellules humaines de même que des effets génotoxiques et un retard à la progression du cycle cellulaire en G2, sans effet majeur de nécrose ou apoptose.

Ces résultats ne peuvent, cependant, pas être étendus à l'ensemble des nanoparticules et dépendent beaucoup du test choisi. En particulier, les nanoparticules de TiO₂ et de fullerènes n'ont d'effets génotoxiques que pour des concentrations très élevées, peu pertinentes pour la prédiction de risque en milieu environnemental. Plus généralement, il est difficile de distinguer le potentiel toxique spécifique à chaque type de particule, de très nombreux paramètres sont impliqués et les résultats expérimentaux concernant les produits manufacturés sont contradictoires.

Cette situation semble résulter d'une définition incomplète des paramètres dans les modèles expérimentaux ; Hansen et al. dans une revue de 965 données expérimentales, montrent que les paramètres de forme, de surface spécifique, de charge et de réactivité de surface, rarement pris en compte, peuvent expliquer les divergences. Par ailleurs, si on dispose de nombreuses données in vitro, on ne dispose que de peu de données in vivo sur les possibilités de passage systémique. Par la voie cutanée, par exemple, si le passage des particules est bloqué sur une peau saine dans le stratum corneum, en

revanche, le transfert systémique est avéré sur des peaux lésées dans le cas du nano-argent. Les données par la voie digestive sont également rares mais le passage systémique des nanoparticules d'argent est également avéré. Des nombreux travaux antérieurs ont, d'ailleurs, montré la possibilité de persorption de particules microniques au niveau de l'intestin en particulier au niveau des formations lymphoïdes associées (GALT).

III.2.1 Effet de la taille (surface de contact)

La taille est un élément déterminant expliquant leurs mécanismes de toxicité. À cause de leur très petite taille, ces particules offrent une très grande surface de contact par unité de masse. Il a été clairement démontré que le degré de toxicité est lié à cette surface et aux propriétés de surface de ces nanoparticules et non à leur masse. Lorsque la taille d'une particule diminue, le nombre de particules par gramme croît considérablement. Ce nombre est multiplié par 1 000 000 lorsque le diamètre d'une particule passe de 100 à 1 nm. À quantité de matière équivalente, la surface de contact est multipliée par un facteur 100. Une masse donnée de nanomatériaux sous forme de nanoparticules sera donc plus réactive que la même masse constituée de particules de plus grande dimension.

III.2.2 Voie de pénétration

La voie de pénétration la plus fréquente en milieu de travail demeure la voie pulmonaire. Il est important de savoir que le site de dépôt des nanoparticules dans les poumons est dépendant de leurs dimensions. Elles peuvent changer substantiellement au cours du procédé de production. Le dépôt des poussières le long de l'arbre pulmonaire varie considérablement en fonction de leur granulométrie et de leur comportement dans l'air. Pour autant, il ne faut pas imaginer que plus une particule est petite, plus le dépôt alvéolaire sera important. Par exemple pour des nanoparticules de diamètres aérodynamiques de 1 nm, aucune n'atteint les alvéoles alors que 80 % sont retenues au niveau du nez et du pharynx. La fraction de particules inhalées atteignant les alvéoles est maximum pour les particules de 20 nm (50 %) et décroît pour les particules de taille supérieure. La granulométrie des particules a donc un impact majeur sur la désignation

du site de dépôt au niveau de l'appareil respiratoire. Les particules ultrafines peuvent franchir les organes extra pulmonaires via la circulation sanguine. Certaines d'entre elles sont transportées le long des nerfs sensitifs voire des axones vers le système nerveux central (études chez le rat et chez un poisson). L'existence d'un transport neuronal (par les nerfs olfactifs vers le cerveau) pour des microsphères de 20 à 200 nm a été identifiée, conduisant à l'accumulation des nanoparticules au niveau de cerveau. D'autres études conduites parmi des mineurs de charbon exposés à des poussières ultrafines ont montré leur accumulation au niveau du foie et de la rate. Cette accumulation était plus élevée parmi les mineurs victimes de maladies pulmonaires sévères, suggérant ainsi que des poumons endommagés favorisent le passage des particules ultrafines vers le réseau vasculaire. Les capacités de passage à travers la barrière cutanée des nanoparticules sont mal connues. L'action de nanoparticules au niveau des villosités intestinales est encore peu étudiée actuellement. Une étude a démontré l'existence d'une captation cellulaire de substances microparticulaires par des entérocytes, ainsi que leur transport vers les nodules lymphatiques. Dans certains cas, le passage de microparticules de la lumière intestinale vers la circulation sanguine mène à une distribution de ces substances dans tout l'organisme.

III.3 Impacts sur la santé

Les propriétés toxicologiques des nanoparticules font l'objet de nombreux travaux. La plupart des études in vivo ont été réalisées en utilisant différentes espèces animales (principalement les rongeurs), plus rarement l'homme ce qui est légitime. Les problèmes posés concernent les différences entre les 2 modèles in vivo. En effet, les poumons des rongeurs sont plus réactifs que ceux de l'homme. Les données obtenues pour les études expérimentales diffèrent des données issues de l'exposition professionnelle ou environnementale car les doses utilisées sont infiniment plus importantes pour les études in vivo.

III.3.1 Études chez l'animal

Deux principaux types d'études *in vivo* ont été mis en œuvre chez les rats avec injection d'un bolus intratrachéal de 5 mg/kg ou inhalation de quantités très importantes de particules ultrafines. Ces méthodes d'exposition donnent des réactions locales de corps étrangers.

L'un des effets des particules ultrafines observé chez l'animal est l'inflammation de l'épithélium pulmonaire. L'administration par inhalation chez le rat de particules d'oxyde de titane (TiO₂) de 20 nm en comparaison avec la même masse de particules de 250 nm a conduit à noter une augmentation significative des signes inflammatoires. Auparavant, l'oxyde de titane était considéré comme une poussière non toxique. Elle servait de référence inerte dans de nombreuses études toxicologiques. Une augmentation de la prolifération cellulaire pulmonaire (mode d'administration par inhalation de 5 mg/kg de nanotubes de carbone monoparois SWCNT) a été observée chez les rats, avec un taux élevé de mortalité (15 %) causé par un blocage mécanique des voies respiratoires supérieures. Il était lié à une augmentation de la prolifération cellulaire pulmonaire et à un accroissement du nombre de granulomes pulmonaires multifocaux, et de fibroses pulmonaires. Les particules peu solubles, telles le noir de carbone et le dioxyde de titane, sont reconnues pour provoquer non seulement des fibroses, mais aussi des tumeurs pulmonaires cancéreuses chez le rat. Des effets mutagènes et tératogènes ont été observés (expérimentation chez les rats) à la suite d'une administration par injection intraveineuse des fullerènes (C₆₀). Des atteintes rénales ont été identifiées (étude chez les rats) après injection intrapéritonéale ou intraveineuse de fullerènes(C₆₀).

Des effets cancérogènes sont rapportés à travers plusieurs études. Une étude cas-témoins suggère une corrélation entre la présence de microparticules ou de nanoparticules inorganiques insolubles et le cancer du côlon ou la maladie de Crohn . Une autre (*in vitro*) a démontré que la viabilité des hépatocytes incubés dans une solution contenant les puits quantiques (nanocristaux) de séléniure de cadmium (CdSe) diminuait en fonction de leur concentration. Ce phénomène était accéléré si les puits quantiques avaient été soumis à des rayonnements ultraviolets. La cytotoxicité significative de puits quantiques de CdSe serait secondaire à une oxydation de leur surface et à la libération d'ions cadmium (Cd²⁺), reconnus cancérogènes pour l'homme.

Une autre étude avec une solution de CdSe encapsulée dans du sulfure de zinc (ZnS) suggère que les puits quantiques altèrent l'ADN par la production de radicaux libres de SO₂ résultant de l'oxydation du ZnS. Enfin les risques d'explosion sont connus en cas d'exposition à des nanoparticules combustibles.

III.3.2 Études chez l'homme

L'exposition aux nanoparticules a toujours existé dans l'environnement (des quantités très importantes de nanoparticules d'origine naturelle ou industrielle sont présentes dans l'atmosphère).

Les effets potentiels des particules ultrafines documentés chez l'homme sont issus d'études épidémiologiques de mortalité. L'incidence des symptômes cardiovasculaires pourrait être liée au niveau élevé de concentration de particules ultrafines dans l'atmosphère (provenant principalement des émissions de véhicules) observé 2 jours auparavant. Des études sur volontaires ont démontré que le taux de particules inhalées a des effets directs sur la physiologie cardiovasculaire avec des altérations du rythme cardiaque (dépressions de segment ST) et du diamètre artériel. En ce qui concerne les effets pulmonaires, les propriétés physiques des nanotubes, composés de carbone ou autre, indiquent que leur toxicité pourrait être proche de celle des fibres d'amiante. Des études préliminaires suggèrent que les nanotubes ont tendance à se rassembler en grappe. De ce fait ils se présentent donc rarement sous forme isolée. Ils passent ainsi de l'échelle nanométrique à la dimension micrométrique, modifiant ainsi leurs propriétés. Des résultats d'études sur volontaires asthmatiques ayant inhalé des nanotubes de carbone indiquent un accroissement de l'inflammation de l'épithélium pulmonaire, l'apparition d'une hyperréactivité bronchique et d'une vasoconstriction pulmonaire et/ou systémique. Une chute du taux de leucocytes (monocytes, éosinophiles et basophiles) a également été mise en évidence. Les nanotubes de carbonemonoparois semblent entraîner une diminution significative de la viabilité cellulaire et un accroissement des biomarqueurs du stress oxydatif, ainsi qu'une augmentation significative des peroxydes lipidiques au sein des kératinocytes épidermiques humains. De fait, l'exposition aux nanotubes de carbone monoparois non raffinés peut déboucher sur une toxicité cutanée parmi les travailleurs exposés.

Certaines nanoparticules accumulées dans le milieu menacent la biodiversité. La plupart des nanoparticules manufacturées sont enrobées de substances diverses qui

en modifiant la réactivité de surface et leur confèrent des propriétés de durabilité et d'affinité pour diverses structures biologiques membranaires. Le problème émergent de leur biopersistance et de leur accumulation dans le milieu en résulte, notamment dans les boues résiduaires et les sédiments des estuaires. Le lessivage des murs enduits aboutit à l'accumulation de nanoparticules de titane, également d'argent dont les sources sont multiples en raison de sa labilité très élevée dans les textiles ; l'usure des pneumatiques entraîne des nanoparticules de noir de carbone dans les eaux de pluie ; finalement, ces éléments vont se retrouver dans la biosphère et provoquer chez certaines espèces des phénomènes de bio-accumulation et de toxicité dépendant de leur concentration de leur floculation et de leur état de surface. Des modifications significatives de la biodiversité peuvent en résulter. En 2010, le nano argent a été classé parmi les 15 substances les plus préoccupantes du point de vue de la biodiversité dans les eaux, altérant la photosynthèse chez les algues et perturbant la dénitritification des nappes; il est également à l'origine de résistances multiples chez diverses bactéries pathogènes. Par ailleurs, la dispersion des nanoparticules dans le milieu aboutira à une contamination de la chaîne alimentaire qui devra être surveillée.

III.4 Métrologie, réglementations et recommandations

La toxicité des particules ultrafines ne représente qu'un aspect du risque. Une bonne connaissance des expositions ainsi que des moyens de protection collective et individuelle sont des éléments essentiels à la mise en place d'actions de prévention pertinentes.

Les expositions aux nanomatériaux sont multiples. Plus de 700 produits bénéficiant des nanotechnologies sont commercialisés actuellement. Un des points clés de la mesure des aérosols ultrafins est la métrique avec laquelle l'exposition doit être caractérisée. La métrologie et les méthodes habituellement utilisées en routine en hygiène industrielle pour les aérosols ne sont pas adaptées à la mesure des expositions aux particules ultrafines. Elles mesurent la masse de particules de moins de 10 ou 2,5 μm (PM10 ; PM2.5), qui correspond aux fractions inhalables, thoracique ou alvéolaire et sur lesquelles reposent les normes françaises, européennes et internationales. Cependant, les données actuelles suggèrent que sur les 3 métriques d'exposition : masse, surface et nombre de particules, la « surface » semble la plus appropriée. Mais à

l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode stabilisée permettant de répondre à cette demande.

La protection de la santé et de la sécurité des travailleurs est un impératif. Les équipements de protection classiques de l'appareil respiratoire, type « masque à poussière », ont une efficacité moindre vis-à-vis des nanoparticules. De fait, des mesures de protection collective et individuelle adaptées à la situation doivent être entreprises en milieu professionnel. Lors de l'utilisation des nanoparticules en phase liquide, c'est le risque de pénétration par la voie cutanée (en dehors des sprays) qui doit être prévenu par le port de gants efficaces (les gants en latex ne le sont pas). De même, en Amérique du Nord, il existe peu de réglementations qui s'appliquent spécifiquement aux nanoparticules, sachant que les substances sont encadrées essentiellement sur la base de leur composition chimique par l'OSHA aux États-Unis ou par divers organismes au Canada. [18]

III.5 Cancérogénicité

En 2006, le centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a classé le dioxyde de titane cancérigène possible pour l'humain (catégorie 2 B). dans son rapport de 2011, l'ANSM indique que chez le rat l'exposition par inhalation à de fortes doses TiO_2 favorise l'apparition de cancer par un effet indirect de stress oxydant génotoxique. Elle note que ces résultats ne sont pas transposables aux cosmétiques car dans ce dernier cas, l'exposition est cutanée.[73]

PARTIE PRATIQUE

Chapitre I : Matériels et méthodes

Ce modeste travail de recherche a été réalisé au niveau du laboratoire de chimie minérale, département de pharmacie, université de Saad Dahleb Blida ainsi qu'au niveau du Centre de Recherche et de Développement (CRD) du GROUPE SAIDAL.

Dans ce chapitre seront présentés le matériel et les méthodes utilisés pour les objectifs suivants :

- Synthèse et caractérisation des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 .
- Etude de l'effet antibactérien et antifongique des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés (test in vitro).
- Formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag- TiO_2 .
- Etude toxicologique des nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés ainsi que l'effet irritant des pommades formulées (test in vivo).

Les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) ont été respectées lors de la manipulation dans les différents laboratoires. Toutes les mesures de sécurité ont été prises en vue de minimiser tout risque probable : le port des blouses, les gants, des masques et lunettes de protection.

I.1 Matériels et réactifs

Les équipements utilisés lors de la synthèse, le contrôle physico-chimique et l'étude de l'effet antibactérien des nanoparticules et des nanocomposites sont qualifiés, calibrés et étiquetés correctement avec leurs références. La verrerie était de la qualité requise ainsi que les consommables qui étaient stériles et à usage unique.

I.1.1 Appareillage

Les équipements utilisés pour la synthèse des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 sont les suivants :

- Balances analytiques de marque METTLER TOLEDO
- Hotte de marque SORBONNE Exosafe
- pH mètre de marque METTLER TOLEDO, type Multi Seven.
- Agitateur magnétique de marque TACUSSEL
- Agitateur magnétique de marque Stuart
- Bain à ultrasons de marque ULTRASONS-ANNEMASSE.S.A.
- Etuve de séchage de marque MEMMERT
- Four à moufle de marque Nabertherm

Les équipements utilisés pour la caractérisation des échantillons synthétisés :

- DLS de marque Horiba NANO PARTICALE ANALYZER SZ-100
- EDX-MEB de marque QUANTA 650
- DRX de marque BRUKER AXS D8 ADVANCE
- IR de marque PERKIN ELMER, type Spectrum Two

I.1.2 Verreries

- Bêchers de 300mL, 250mL et 50mL
- Entonnoir moyen en verre
- Mortiers et pilon
- Eprouvettes graduées de 100mL
- Fioles jaugées de 500mL, 250 mL, 100 mL et 50mL
- Pipettes graduées de 100 mL et 50 mL
- Micropipettes automatique de 50 μ L.

I.1.3 Consommables

- Papier filtre qualitatif plissé
- Filtres à seringue : 0.45 μ m.
- Seringues de 2,5mL et 5 mL

I.1.4 Autres

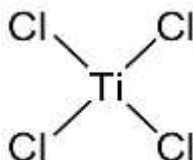
- Pissettes pour eau distillée
- Spatules
- Creuset en platine
- Boîtes de pétri
- Disques en papier buvard stérile de 9 mm

I.1.5 Réactifs et matières

Tous les réactifs utilisés lors de la synthèse ou les matières utilisées pour la formulation de la pommade à base des nanocomposites répondent aux exigences des Laboratoires de Contrôle Qualité (BPL).

I.1.5.1 Réactifs utilisés pour la synthèse des nanoparticules de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

I.1.5.1.1 Le tétrachlorure de titane



Formule chimique : TiCl_4

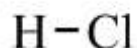
Description : le tétrachlorure de titane se présente sous forme d'un liquide incolore avec une odeur d'acide pénétrant, corrosif pour les voies respiratoires, réagit violemment au contact de l'eau.

Densité : 1,726

Teneur : 99.9% en TiCl_4

Fournisseur : SIGMA ALDRICH, Allemagne.

I.1.5.1.2 Acide chlorhydrique



Formule chimique : HCl

Description : L'acide chlorhydrique concentré se présente sous forme d'un liquide limpide et incolore, fumant à l'air

Teneur : 37% en HCl

Densité : 1,19

Fournisseur : VWR PROLABO, France

I.1.5.1.3 Hydroxyde d'ammonium

Formule chimique : $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ou NH_4OH .

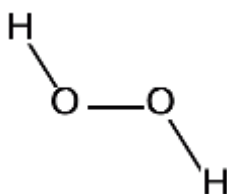
Teneur : 25% en NH_3

Description : la solution concentrée d'ammonium se présente sous forme d'un liquide limpide, incolore, très caustique

Densité : 0,91

Fournisseur : VWR PROLABO, France

I.1.5.1.4 Peroxyde d'hydrogène



Formule chimique : H_2O_2

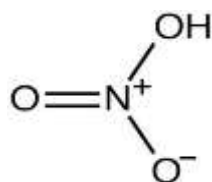
Description : le peroxyde d'hydrogène se présente sous forme d'un liquide limpide incolore.

Teneur : 30% en H_2O_2

Fournisseur : VWR PROLABO, France

Densité : 1,45

I.1.5.1.5 Acide nitrique



Formule chimique : HNO_3

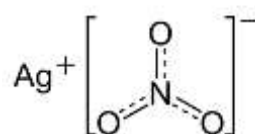
Densité : 1,4

Description : l'acide nitrique se présente sous forme d'un liquide limpide, incolore ou presque incolore.

Teneur : 65% en HNO_3

Fournisseur : VWR PROLABO, France

I.1.5.1.6 Nitrate d'argent



Formule chimique : AgNO_3

Description : le nitrate d'argent se présente sous forme d'une poudre cristalline blanche ou sensiblement blanche, ou cristaux transparents incolores

Teneur : 99,8% en AgNO_3

Fournisseur : SIGMA-ALDRICH, Allemagne

I.1.5.2 Matières premières utilisées pour la formulation d'une pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂

I.1.5.2.1 Huile de paraffine

Aspect : liquide huileux, incolore, transparent, ne présentant pas de fluorescence à la lumière du jour.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, peu soluble dans l'éthanol à 96%, miscible aux hydrocarbures.

Densité : 0,827 à 0,890 [Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition]

I.1.5.2.2 Vaseline blanche :

Définition : La vaseline blanche est un mélange purifié d'hydrocarbures semi-solides obtenus à partir de pétrole et entièrement ou presque entièrement décoloré. Elle peut contenir un antioxydant approprié.

Aspect : masse blanche ou sensiblement blanche, translucide, de consistance onctueuse, légèrement fluorescente à la lumière du jour à l'état fondu.

Solubilité : pratiquement insoluble dans l'eau, soluble dans le chlorure de méthylène, pratiquement insoluble dans l'éthanol à 96 % et dans le glycérol. [Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition]

I.2 Protocole de synthèse

I.2.1 Préparation des solutions

I.2.1.1 Préparation de la solution d'acide chlorhydrique 0,5M

Dans une fiole de 500 ml, introduire 20 ml d'eau distillée puis 20,7 ml de la solution concentrée d'acide chlorhydrique à 37%. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Bien agiter la solution.

I.2.1.2 Préparation de la solution d'ammoniaque 1M

Dans une fiole de 500 ml, introduire 77,0 ml de la solution concentrée d'ammoniaque. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Bien agiter la solution.

I.2.1.3 Préparation de la solution d'acide nitrique 1M

Dans une fiole de 500 ml, introduire 34,6 ml de la solution concentrée d'acide nitrique. Compléter avec de l'eau distillée jusqu'au trait de jauge. Bien agiter la solution.

I.2.2 Protocole de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂

- On a introduit 60ml de HCl 0.5M dans un bécher de 300ml, on a ensuite ajouté goutte à goutte, sous agitation magnétique, une quantité spécifiée de TiCl₄. Le bécher a été maintenu dans un bain de glace pour maintenir la température à 0°C pendant 30 minutes.

- Une solution aqueuse 1M de NH_4OH a été ajoutée pour obtenir une solution de $\text{pH}=8$. La couleur du gel devient immédiatement ivoire, indiquant la formation du gel d'oxyde de titane hydraté $\text{Ti}(\text{OH})_4$.
- Après un vieillissement de 30minutes à température ambiante, le gel blanc a été séparé et lavé plusieurs fois avec l'eau distillée jusqu'à ce qu'aucun ion des chlorures ne soit détecté dans le filtrat (ceci est vérifié en appliquant le test limite des chlorures).
- Une quantité spécifiée du gel obtenu a été dispersée dans 50ml d'eau distillée et maintenu sous agitation magnétique pendant 30 minutes.
- Une solution d' H_2O_2 à 30% a été ajoutée, la solution devient progressivement orange limpide, indiquant la formation du complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{2+}$. On ajoute la solution d'Ag NO_3 immédiatement après l'ajout du peroxyde d'hydrogène.
- Ajuster le pH du mélange avec la solution d' HNO_3 1 M et le laisser sous agitation pendant 3 heures. La solution a été chauffée à 90°C puis à 100°C . Le complexe $\text{TiO}(\text{H}_2\text{O}_2)^{2+}$ a été décomposé lentement pendant le chauffage ce qui a entraîné la formation des nanocomposites d'Ag- TiO_2 .
- On récupère la poudre obtenue et on la broie jusqu'à l'obtention d'une poudre fine.

Plusieurs essais ont été réalisés en afin de bien maîtriser le procédé de synthèse et pouvoir étudier l'influence du pH (à un pH fortement acide et à un pH faiblement acide) et de la température (calcination de la poudre obtenue et sans calcination).

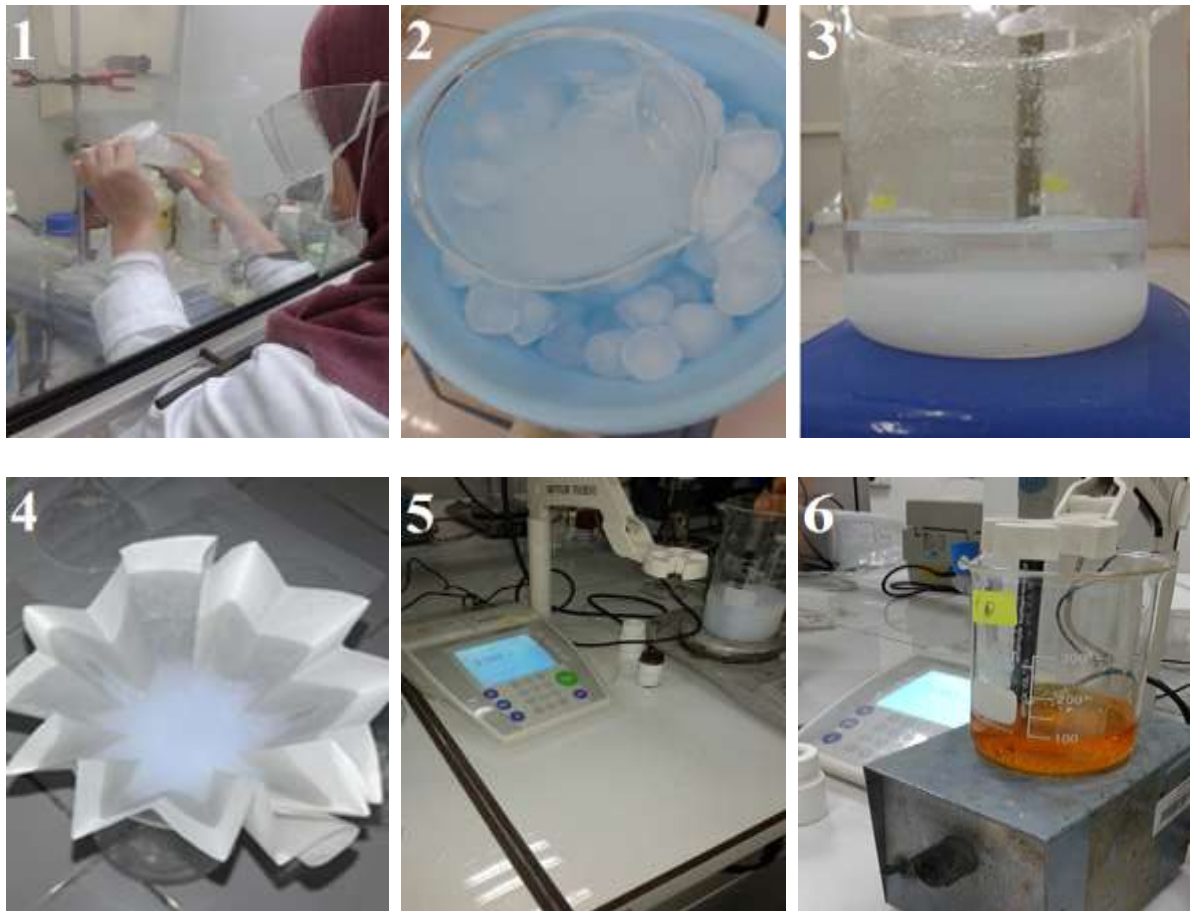


Figure 5 : Différentes étapes de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂

I.2.2.1 Test limite des chlorures

Dissolvez 2 ml de la solution à examiner. Acidifiez par l'acide nitrique dilué. Ajoutez 0,4ml de solution de nitrate d'argent (42,5g/L). Agitez et laissez reposer. Il se forme un précipité blanc caillebotté. Centrifugez et lavez 3 fois avec 1 ml d'eau distillée. Effectuez cette opération rapidement, à l'abri d'une lumière vive, sans tenir compte du fait que le liquide surnageant ne devient pas parfaitement limpide. Mettez le précipité en suspension dans 2 ml d'eau distillée et ajoutez 1,5 ml de la solution concentrée d'ammoniaque. Le précipité se dissout facilement à l'exception d'éventuelles particules importantes qui se dissolvent lentement. [Pharmacopée Européenne 9^{ème} édition]

I.2.3 Protocole de synthèse des nanoparticules de TiO₂

Le même protocole de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂ a été suivi pour la synthèse des nanoparticules de TiO₂ sans ajouter la solution d'AgNO₃.

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

I.3.1 Diffusion Dynamique de la lumière (DLS)

I.3.1.1 Principe de mesure de la taille des particules

La diffusion dynamique de la lumière est utilisée pour déterminer la taille des particules. La diffusion dynamique de la lumière est la mesure des fluctuations d'intensité de la lumière diffusée avec le temps. Ces dernières sont dues au mouvement Brownien aléatoire des nanoparticules. Par conséquent, le comportement statistique de ces fluctuations d'intensité diffusée peut être lié à la diffusion des particules. Étant donné que les grosses particules diffusent plus lentement que les petites particules, il est facile d'établir une relation entre la taille des particules et les fluctuations mesurées de l'intensité de la lumière.

L'analyse par DLS a été l'outil de base pour caractériser les nanoparticules. [70]

I.3.1.2 Mode opératoire

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

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

I.3.2 Microscope électronique à balayage (MEB)

Le microscope électronique à balayage Permet d'obtenir des observations de surfaces de pratiquement tous les matériaux solides, à des échelles allant de celle de la loupe ($\times 10$) à celle du microscope électronique en transmission ($\times 500.000$ ou plus).

Un faisceau d'électrons est projeté et se déplace sur l'échantillon à analyser. L'interaction entre la sonde et l'échantillon génère des électrons appelés « secondaires ». Ces derniers sont alors accélérés vers un détecteur qui a pour rôle d'amplifier le signal électrique reçu. Les différentes particules sont analysées par différents détecteurs qui permettent de reconstruire une image en trois dimensions de la surface. [26]

I.3.3 Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie, analyse EDX

La spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie (ou EDS, abréviation de l'anglais « Energy Dispersive X-ray Spectroscopy ») est une faculté analytique qui peut être couplée avec plusieurs applications, dont la microscopie électronique par balayage (MEB), la microscopie électronique en transmission (TEM).

Combinée à ces outils d'imagerie, l'EDS peut donner l'analyse élémentaire sur des surfaces aussi petites que la taille du nanomètre en diamètre. L'impact du faisceau d'électrons sur l'échantillon produit des rayons X qui sont caractéristiques des éléments présents sur l'échantillon. L'analyse peut servir à déterminer la composition élémentaire de points individuels ou à faire ressortir par cartographie la distribution latérale d'éléments issus de la zone numérisée sous forme d'image. [69]

I.3.3.1 Mode opératoire

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

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

I.3.4 Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une technique d'analyse idéale pour l'étude d'échantillons solides cristallisés. A chaque phase cristalline correspond un ensemble caractéristique de pics de diffraction (diffractogramme).

L'analyse par DRX permet :

- La détermination très précise de structures cristallines à partir des diffractogrammes.
- La détermination des constituants cristallisés d'un mélange.

Suivi de l'évolution d'une structure cristalline en fonction de différents types de traitements (thermique, chimique) lorsque ces traitements influent sur la structure. [68]

I.3.4.1 Mode opératoire

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

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

I.3.5 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

La spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge est une technique d'analyse qui consiste à soumettre un échantillon à un rayonnement infrarouge. Les molécules organiques soumises à ce rayonnement absorbent ces radiations en modifiant leurs énergies de vibration. Suivant les types de liaisons et de fonctions chimiques présentes dans le milieu, un spectre infrarouge caractéristique de l'échantillon ou de sa surface analysée est obtenu. [71]

I.3.5.1 Mode opératoire

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

I.4 Formulation de la pommade

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

I.4.1 Mode opératoire

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

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

I.5 Etude de l'effet antibactérien des nanoparticules de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

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

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

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

I.5.1 Choix des souches microbiennes

- Bactéries

Le choix des bactéries s'est porté sur des souches de bactéries fréquentes en pathologie humaine, appartenant à deux catégories, à savoir : Gram positif et Gram négatif.

Tableau 3: Souches microbiennes utilisées

	Souche	Famille	ATCC
Gram Négatif	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	9027
	<i>Escherichia Coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	8739
Gram Positif	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>staphylocoques</i>	6538
	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	6633

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

- Levures

Le choix de la levure a porté sur une espèce connue pour leur pathogénicité.

Tableau 4 : Levure utilisée

Souche	Famille	ATCC
<i>Candida albicans</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	10231

- Milieux de culture

Les milieux de cultures utilisés pour l'étude de l'effet antibactérien sont les suivants :

- Mueller-Hinton gélosé (MH)
- Milieu TSA (Trypticase soja agar)
- Milieu Sabouraud

I.5.1.1 Mode opératoire

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

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

I.5.1.1.1 Revivification des souches

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

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

I.5.1.1.2 Préparation de la première couche du milieu

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

I.5.1.1.3 Préparation de l'inoculum

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

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

préconisée ou à l'ajout de colonies à la suspension, dans le cas où le résultat obtenu est inférieur à la concentration préconisée.

I.5.1.1.4 Préparation de la deuxième couche

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

I.5.2 Préparation des solutions des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

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



Figure 6 : Solutions utilisées pour l'étude de l'effet antibactérien.

I.5.3 Dépôt des disques et incubation

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

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

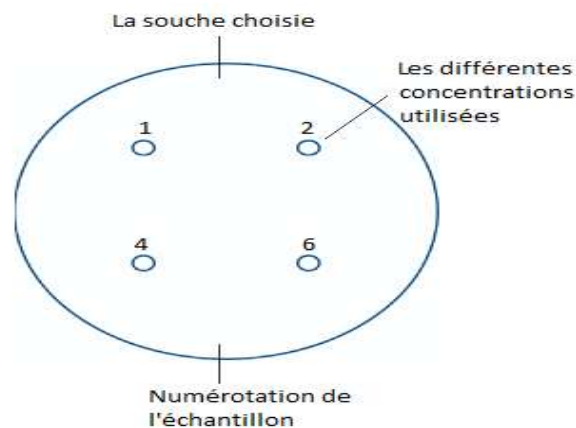


Figure 7 : Dépôt des disques sur les souches microbiennes.

I.5.4 Lecture des résultats

L'activité antimicrobienne se manifeste par l'apparition d'un halo d'inhibition autour du disque contenant l'échantillon à tester ; et ou apparition de zone plus ou moins clair contenant des colonies autour du disque. La lecture s'effectue par la mesure du diamètre d'inhibition observé.

I.6 Evaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (Tests in vivo)

I.6.1 Test de toxicité

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

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



Figure 8 : Souris NMRI pour le test de toxicité.

I.6.1.1 Mode opératoire

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

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

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

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

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

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



Figure 9 : Administration de la dose à tester chez les souris

I.6.1.2 Observations

Les souris doivent être observés individuellement au moins une fois pendant les premières 30 minutes et régulièrement pendant les premières 24 heures après le traitement. Une attention particulière s'impose pendant les premières 4 heures et quotidiennement pendant 14 jours après l'administration de la substance, à l'exception des animaux qui sont morts au cours de l'étude ou qui sont retirés de l'étude et tués avec humanité pour des raisons de protection des animaux. [66]

I.7 Effet irritant

I.7.1 Principe

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

Les animaux qui manifestent des signes persistants de détresse et/ou de douleurs aiguës à n'importe quel stade de l'essai doivent être euthanasiés, et ces symptômes seront pris en compte dans l'évaluation du produit chimique testé. [65]

I.7.2 Préparation des animaux

Environ 24 heures avant l'essai, la région dorsale du tronc des animaux sera tondu à ras. On prendra soin de ne pas égratigner leur peau et seuls des animaux présentant une peau saine et intacte seront utilisés. [65]

I.7.3 Mode opératoire

Conformément à ligne directrice de l'OCDE 404, les deux produits testés sont : la « Pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj) » et la « Pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) ». Elles ont été appliquées sur une petite zone de la peau (environ 6 cm²) et recouverte par une compresse de gaze, assujettie au moyen d'un sparadrap non irritant. La quantité appliquée sur la plage à tester est de 0,5 g du produit. [65]

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

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



Figure 10 :Etalement des deux pommades à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂

I.7.4 Essai d'irritation cutanée initial et confirmatoire (in vivo)

Le test *in vivo* est conduit initialement en utilisant un seul animal et en respectant la procédure suivante. Jusqu'à trois timbres d'essai sont appliqués successivement sur l'animal. Le premier timbre est enlevé après trois minutes. Si aucune réaction cutanée grave n'est constatée, un deuxième timbre est appliqué à un endroit différent et retiré après une heure. Si les observations effectuées à ce stade indiquent que l'exposition peut être étendue à quatre heures sans que cela fasse trop souffrir l'animal, l'expérimentateur appliquera un troisième timbre durant quatre heures et attribuera une cote à la réaction. Si un effet corrosif est détecté à l'issue d'une des trois expositions séquentielles, l'essai s'achève immédiatement. Si aucun effet corrosif n'est relevé après l'enlèvement du troisième timbre, l'animal est gardé en observation durant 14 jours, à moins qu'un effet corrosif se déclare avant.

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

est également testé. L'utilisation d'animaux supplémentaires pourra être requise si les réactions sont équivoques. [65]

I.7.4.1 Période d'observation

La réversibilité des effets est déterminée par l'observation des animaux sur une période s'étendant jusqu'à 14 jours après l'enlèvement des timbres. Si la réaction s'avère réversible avant le quatorzième jour, l'expérience s'achève à ce moment-là. [65]

I.7.4.2 Observations cliniques et cotation des réactions cutanées

L'observation des signes d'érythème et d'œdème chez tous les animaux et la cotation des réactions s'effectuent au bout de 60 minutes et ensuite 24, 48 et 72 heures après l'enlèvement du timbre. S'agissant de l'animal du test initial, la plage soumise à l'épreuve est aussi examinée immédiatement après l'enlèvement du timbre. Les réactions cutanées sont cotées et consignées conformément à l'échelle figurant dans le tableau mentionné dans la ligne directrice OCDE 404 et qui sera décrit dans le chapitre « Partie Expérimentale ». Si la peau présente des lésions qui n'accusent pas l'irritation ou la corrosion après 72 heures, il pourra être nécessaire d'observer l'animal jusqu'au quatorzième jour afin de déterminer la réversibilité des effets. En plus de l'observation de l'irritation, tous les effets toxiques locaux, tels que le dégraissage de la peau, et tout effet systémique nocif (par exemple, des effets se manifestant par des signes cliniques de toxicité et sur le poids corporel) doivent être relevés et décrits en détail. [65]

Tableau 5 : Cotation des réactions cutanées d'après l'OCDE [65]

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

Chapitre II : Résultats et discussions

Dans ce chapitre seront présentés les résultats de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et des NPs de TiO₂ selon les étapes suivantes :

- ✓ Synthèse et caractérisation des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂
- ✓ Contrôle physico-chimique des NPs de TiO₂
- ✓ Etude de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂
- ✓ Évaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (Test in vivo)

II.1 Synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et des NPs de TiO₂

Plusieurs essais de synthèse des nanocomposites d'Ag-TiO₂ ont été réalisés (15 essais) et ce afin de pouvoir bien maîtriser le procédé de synthèse, en tenant compte des données rapportées dans la littérature concernant l'influence du pH et de la température sur la forme et la phase de TiO₂ et donc sur les nanocomposites Ag-TiO₂[7] [46]

Après une synthèse des résultats obtenus, 04 échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ ont été retenus pour exploitation dans le présent chapitre :

- Ag-TiO₂ (aj) : Nanocomposites d'Ag-TiO₂ (avec l'ajout de HNO₃ (pH fortement acide))
- Ag-TiO₂ (aj, cal) : Nanocomposites d'Ag-TiO₂ (avec l'ajout de HNO₃ (pH fortement acide), poudre calcinée)
- Ag-TiO₂ (N) : Nanocomposites d'Ag-TiO₂ (sans l'ajout de HNO₃ (pH faiblement acide))
- Ag-TiO₂ (cal) : Nanocomposites d'Ag-TiO₂ (sans l'ajout de HNO₃ (pH faiblement acide), poudre calcinée)

II.1.1 Aspect des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2

Comme illustré dans la Figure 11, les NPs de TiO_2 synthétisé se présentent sous forme d'une poudre blanche à sensiblement blanche. L'aspect de la poudre est conforme à la spécification décrite dans la 9^{ème} édition de la Pharmacopée Européenne.



Figure 11 : Poudre des NPs de TiO_2

Les nanocomposites d'Ag- TiO_2 synthétisés à un pH fortement acide se présentent sous forme d'une poudre fine jaunâtre, Figure 12.



Figure 12 : Poudre des nanocomposites d'Ag- TiO_2 (aj)

Le nanocomposite de Ag-TiO₂ synthétisés à un pH faiblement acide se présentent sous forme d'une poudre fine de couleur jaune, comme le présente la figure 13.



Figure 13: Poudre des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

II.2 Caractérisation des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

II.2.1 Diffusion dynamique de la lumière (DLS)

L'analyse par DLS a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche du département de Génie des procédés de l'université de BLIDA. Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 6 : Résultats d'analyse par DLS

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

Discussion

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

II.2.2 Analyse par EDX-MEB

L'analyse a été réalisée au niveau du laboratoire de recherche du département de physique de l'université Saad Dhlab à Blida. Les résultats d'analyse des NPs de TiO_2 et des nanocomposites d'Ag- TiO_2 par EDX-MEB sont présentés dans les figures ci-dessous.

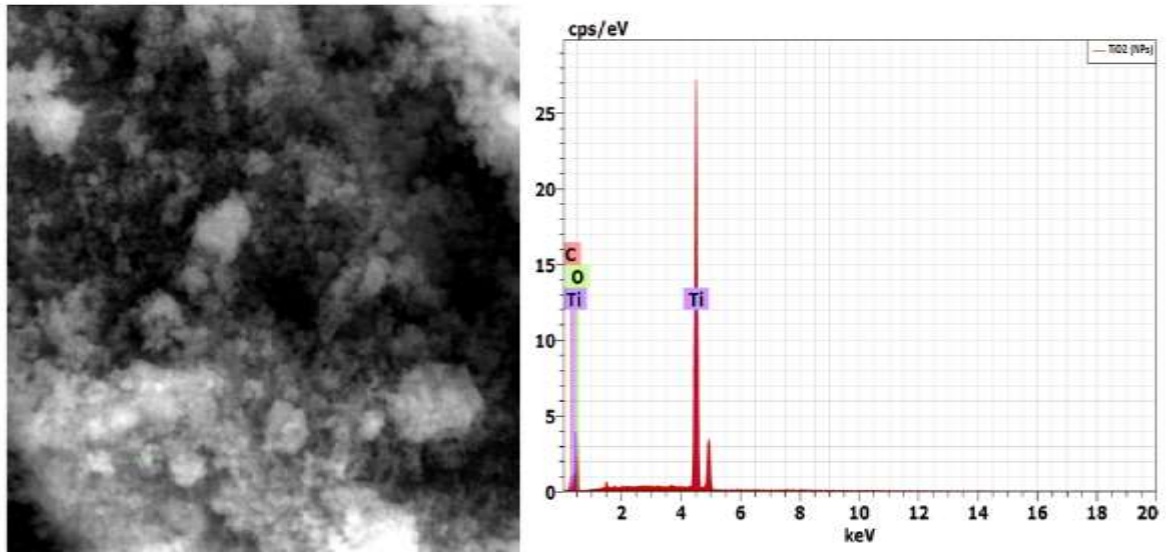


Figure 14: EDX-MEB de TiO_2 (NPs)

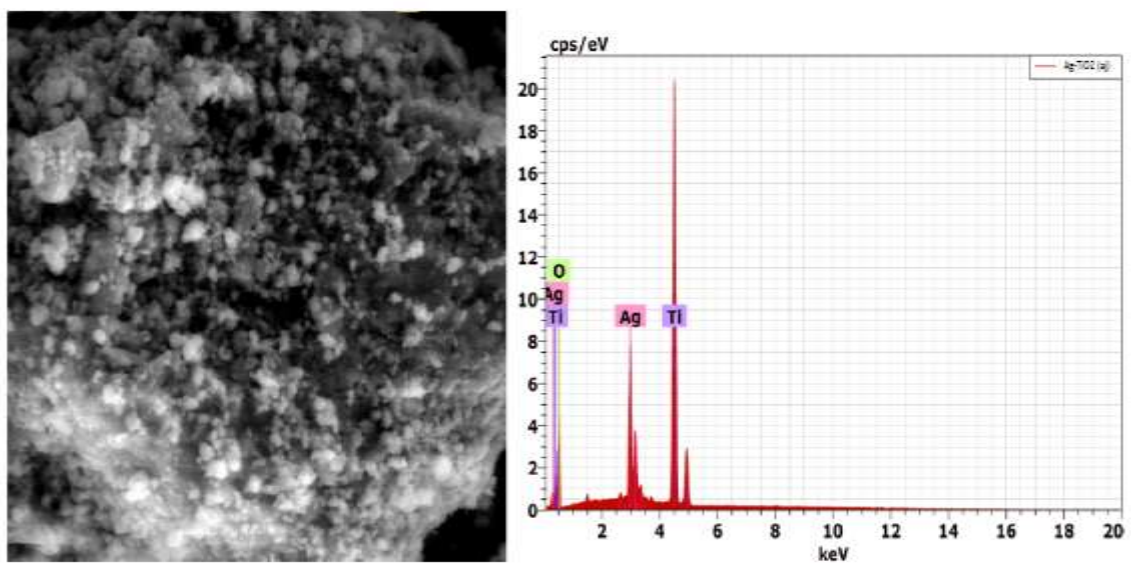


Figure 15 : EDX-MEB des nanocomposites d'Ag- TiO_2 (aj)

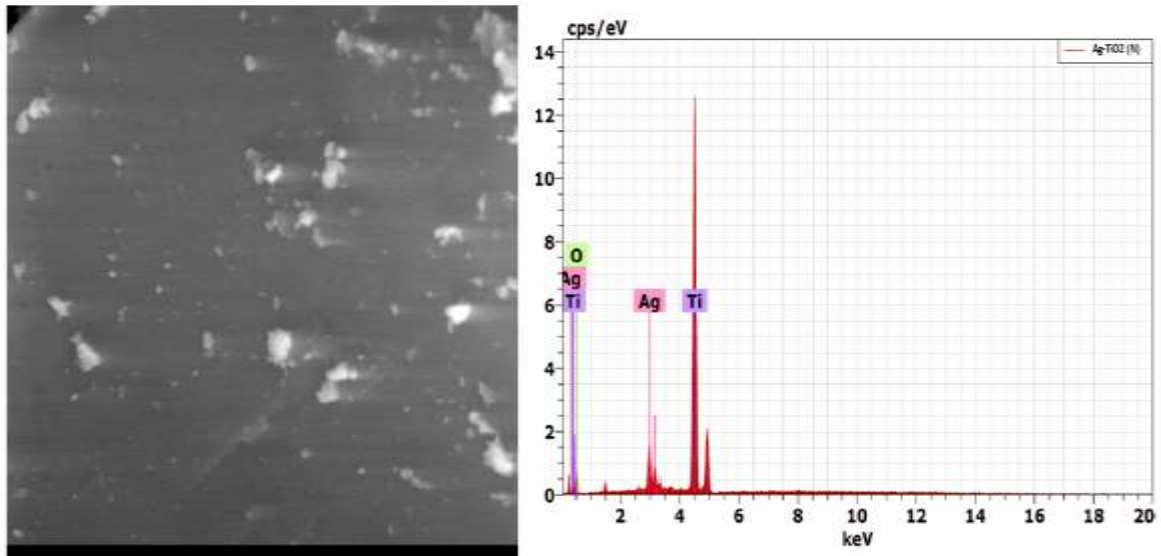


Figure 16:EDX-MEB des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Discussion

La figure 14 présente les pics dû aux éléments Ti et O, ce qui nous permet de supposer qu'il s'agit de TiO₂. Les signaux de carbone qui ont apparu dans les spectres EDX ont été attribués au revêtement de carbone sur la grille de l'appareil.

Les figures 15 et 16 correspondants aux échantillons « Ag-TiO₂ (aj) » et « Ag-TiO₂ (N) » respectivement, confirment que les seuls éléments présents sont : Ag, Ti et O. De ce fait, on peut conclure qu'il s'agit bien des nanocomposites d'Ag-TiO₂.

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

Les petits points lumineux qui ont apparu dans l'image du MEB « Figure 16 » confirment la présence des nanoparticules d'argent. [49]

II.2.3 Diffraction des rayons X (DRX)

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

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

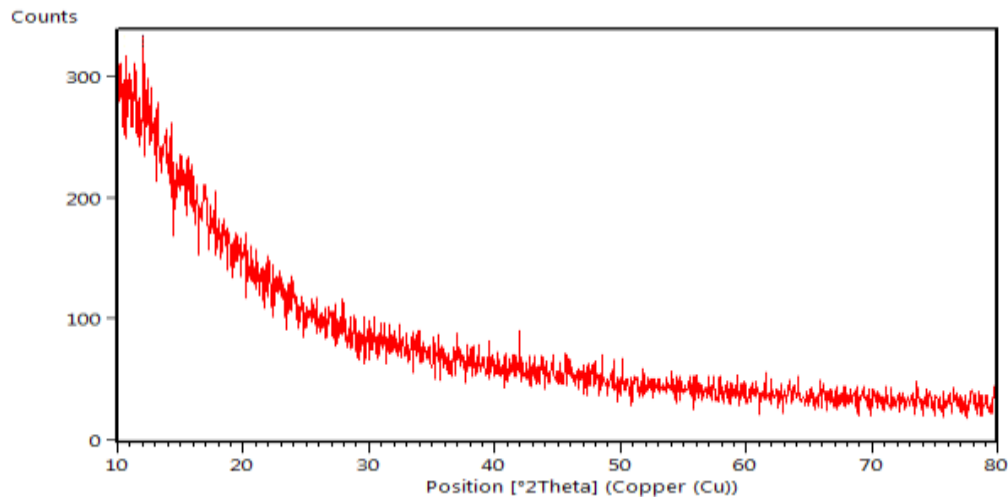


Figure 17: DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

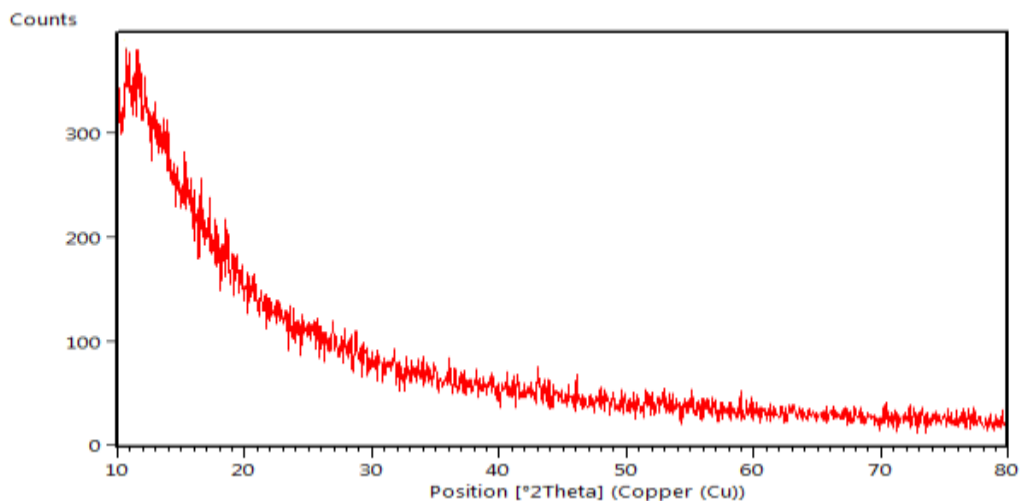


Figure 18: DRX des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Discussion

Les deux diffractogrammes obtenus ne présentent aucun pic dans le domaine $10^\circ \leq 2\theta \leq 80^\circ$. Donc, on peut conclure que les poudres d'Ag-TiO₂ synthétisées se présentent sous forme amorphe. Dans la littérature, on trouve que le TiO₂ se présente sous au moins 03 formes polymorphes, à savoir : brookite, anatase et rutile. La présence de TiO₂ sous forme amorphe dépend des conditions opératoires de synthèse notamment : pH et température. [46]

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

II.2.4 Spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge

- Spectre IR des NPs de TiO₂

L'analyse par IR a été réalisée au niveau du laboratoire de chimie analytique du CRD SAIDAL. Le spectre IR de TiO₂ (NPs) est illustré dans la figure ci-dessous.

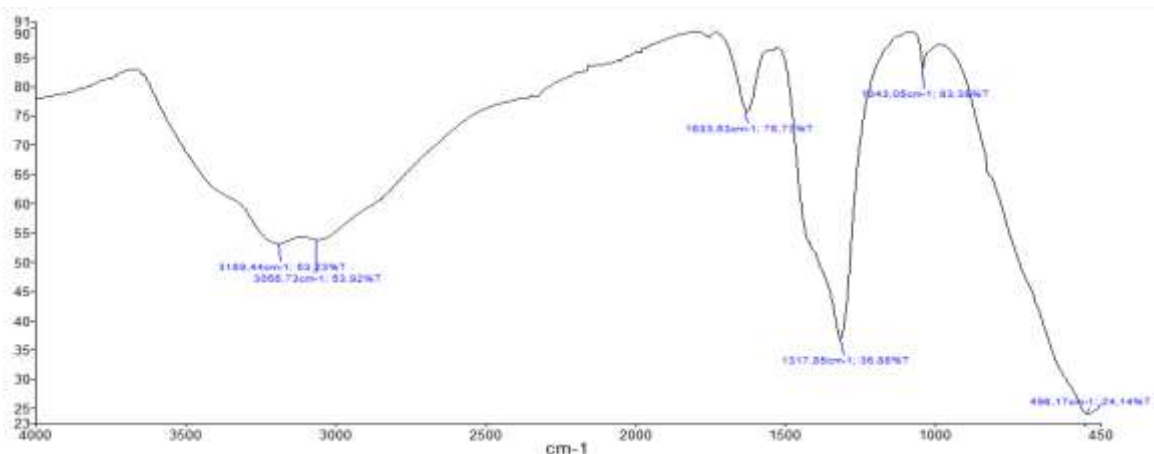


Figure 19: Spectre IR des NPs de TiO₂ synthétisées

Discussion

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

Les bandes typiques d'eau qui ont apparus sous forme d'une bande large et forte à environ 3200cm⁻¹ (mode de vibration d'élongation) et à 1600 cm⁻¹ (mode de vibration de déformation (cisaillement)) indiquent que la température de séchage de 100°C n'a pas éliminé complètement la quantité d'eau utilisée lors de la synthèse des NPs de TiO₂.

Les bandes autour de 1000cm⁻¹ et 1300 cm⁻¹ peuvent être associées à la vibration de groupes résiduels.[46, 22, 52, 11]

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

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

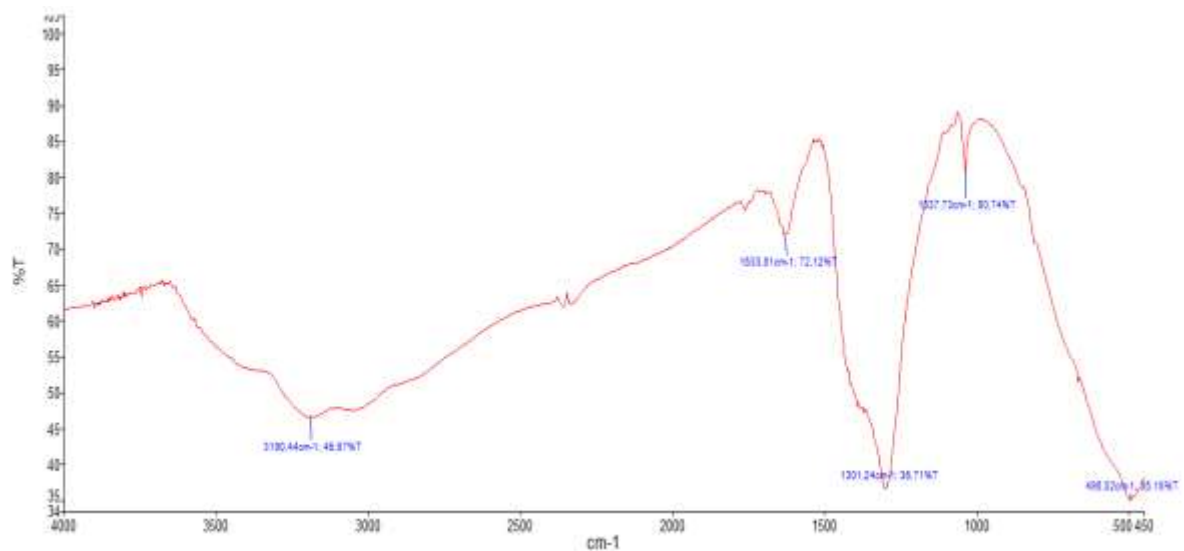


Figure 20: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Discussion

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

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

Les bandes autour de 1000cm⁻¹ et 1300 cm⁻¹ peuvent être dû à la vibration de groupes résiduels.[46, 22, 52, 11]

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

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

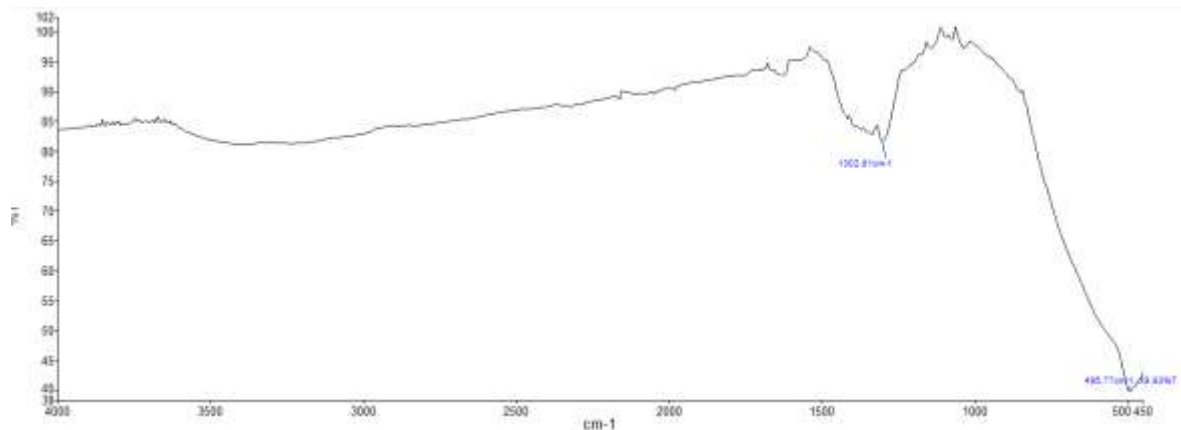


Figure 21: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj,cal)

Discussion

Le spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal) présente la bande de 496cm⁻¹ qui correspond au mode de vibration en flexion Ti – O indiquant la formation d'une liaison « Métal-Oxygène » qui correspond aux oxydes métalliques. [46,22]

A l'effet de la calcination, on remarque l'absence des bandes de 3200cm⁻¹ et 1600cm⁻¹ (dû à l'eau) et celle de 1000cm⁻¹ avec une faible bande à 1300 cm⁻¹ qui correspond à la vibration de groupes résiduels. [14]

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

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

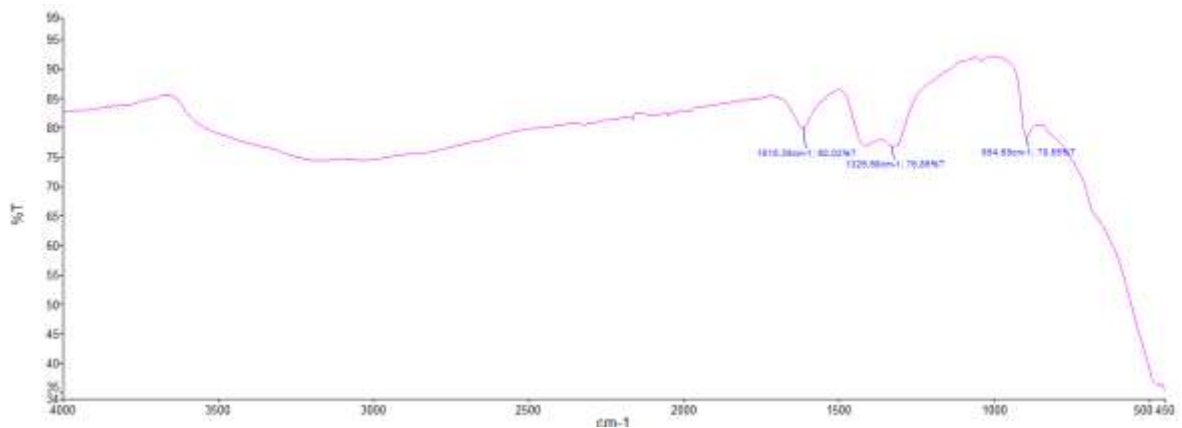


Figure 22: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (N)

Discussion

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

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

La bande à 1300 cm⁻¹ peut être associée à la vibration de groupes résiduels. [46, 22, 52, 11]

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

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

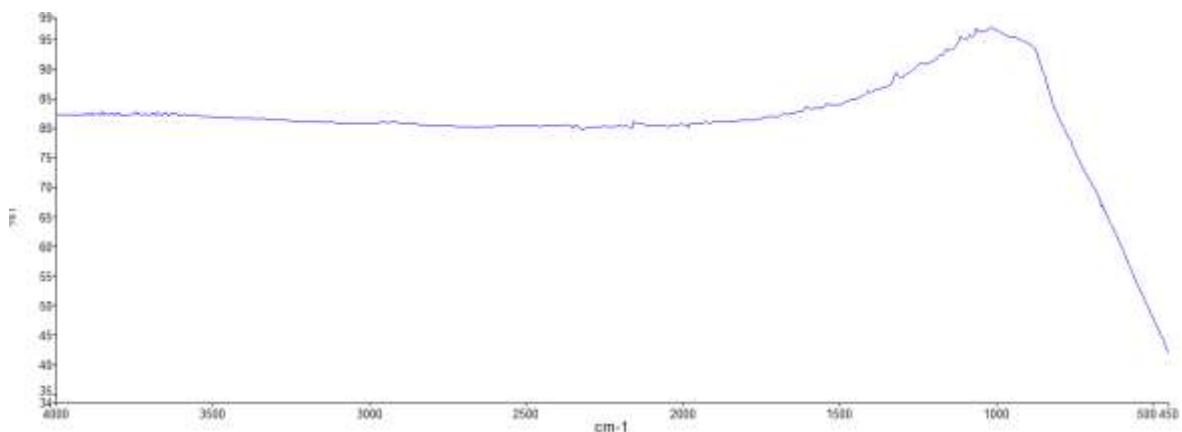


Figure 23: Spectre IR des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (cal)

Discussion

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

La calcination a éliminé complètement l'eau et les résidus des réactifs utilisés lors de la synthèse. [14]

Conclusion

Tous les spectres IR des différents échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ et des NPs de TiO₂ synthétisés présentent la bande à 496 cm⁻¹ indiquant la formation de la liaison « Métal-Oxygène » correspondant à la présence d'un oxyde métallique, dans notre cas c'est le Dioxyde de titane « TiO₂ ». La calcination des poudres a permis l'élimination complète de l'eau et des résidus des réactifs utilisés dans la synthèse des échantillons.

II.3 Etude de l'effet antibactérien des nanoparticules de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂

Une étude comparative de l'effet antibactérien et antifongique a été réalisée entre un échantillon commercialisé de TiO₂ (d'ordre micrométrique) et les NPs de TiO₂ synthétisées. Le but de cette étude est de vérifier aussi l'amélioration de l'effet antibactérien (Effet de synergie) des nanocomposites d'Ag-TiO₂ par rapport aux NPs de TiO₂. Les échantillons objet de cette étude sont :

- TiO₂ : Produit commercialisé.
- TiO₂(NPs) : Les nanoparticules de TiO₂ synthétisées.
- Ag-TiO₂ (aj) : Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisées à un pH fortement acide
- Ag-TiO₂ (aj, cal) : Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisées à un pH fortement acide et calcinée.
- Ag-TiO₂ (N) : Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisées à un pH faiblement acide
- Ag-TiO₂ (cal) : Les nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisées à un pH faiblement acide et calcinée.

II.3.1 Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

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

Tableau 7 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

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

*Présence d'un effet bactériostatique

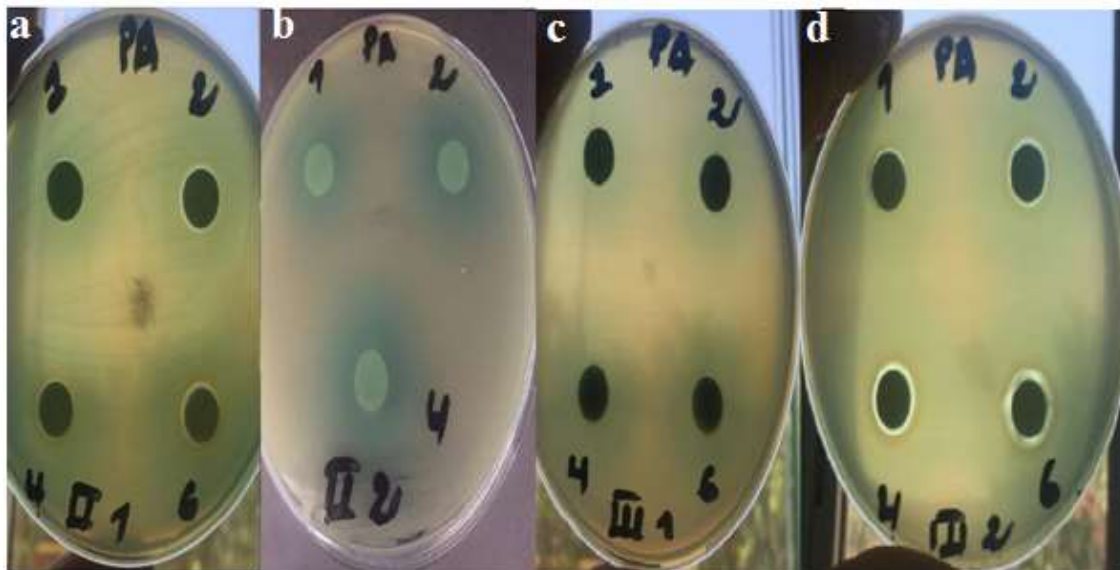


Figure 24 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Pseudomonas aeruginosa*

[a : AgTiO₂(N), b : AgTiO₂(cal), c : AgTiO₂(aj,cal), d : AgTiO₂(aj)].

Discussion

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

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

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

II.3.2 Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

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

Tableau 8 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

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

*Présence d'un effet bactériostatique

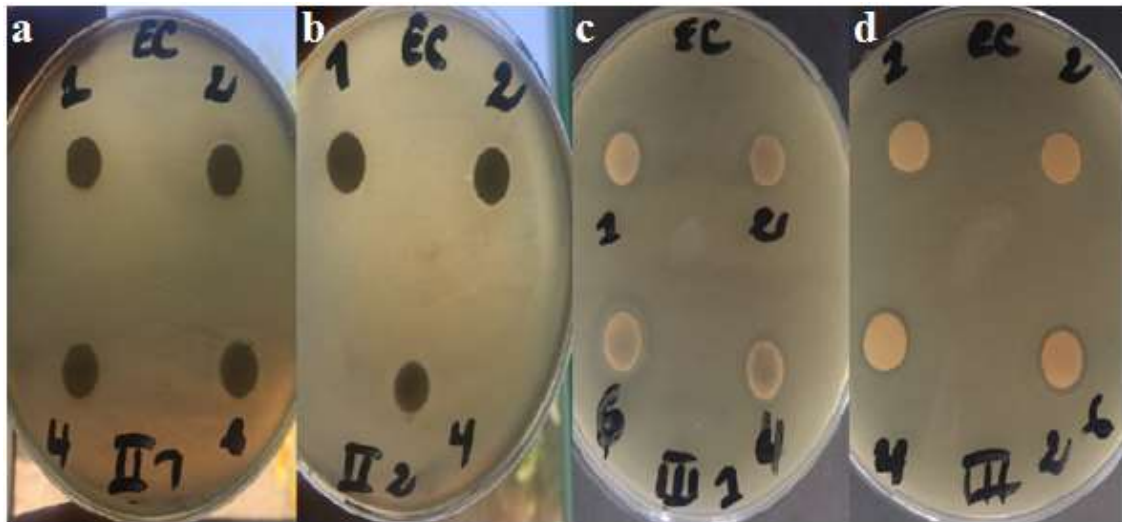


Figure 25 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur l'*Escherichia Coli*

[a : AgTiO₂(N), b : AgTiO₂(cal), c : AgTiO₂(aj,cal), d : AgTiO₂(aj)].

Discussion

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

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

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

II.3.3 Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

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

Tableau 9 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

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

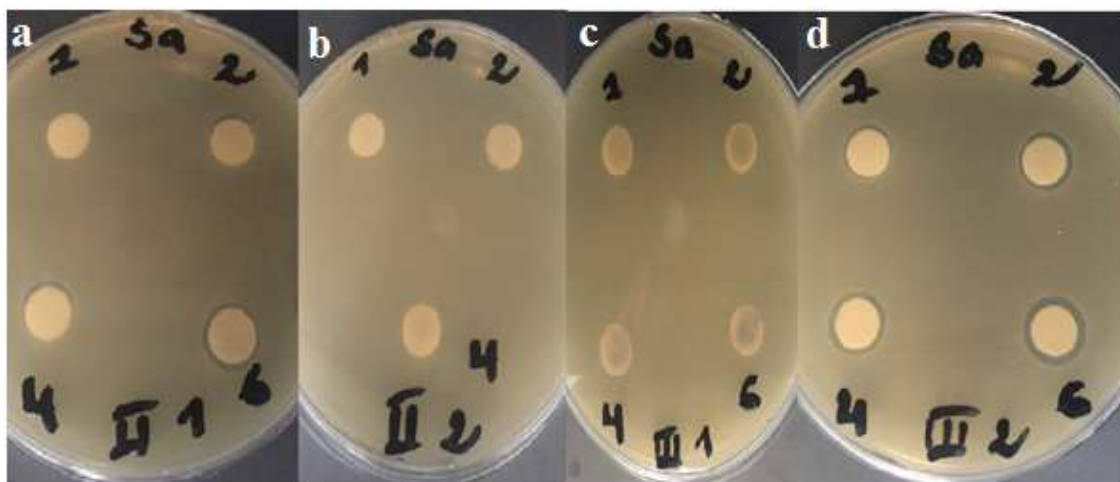


Figure 26: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Staphylococcus aureus*

[a: AgTiO₂(N), b : AgTiO₂(cal), c: AgTiO₂(aj,cal), d: AgTiO₂(aj)].

Discussion

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

nanocomposites d'Ag-TiO₂ calcinés ne présentent aucun effet antibactérien sur la bactérie *Staphylococcus aureus*.

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

II.3.4 Étude comparative de l'effet antibactérien des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis* :

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

Tableau 10 : Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

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

*Effet bactériostatique

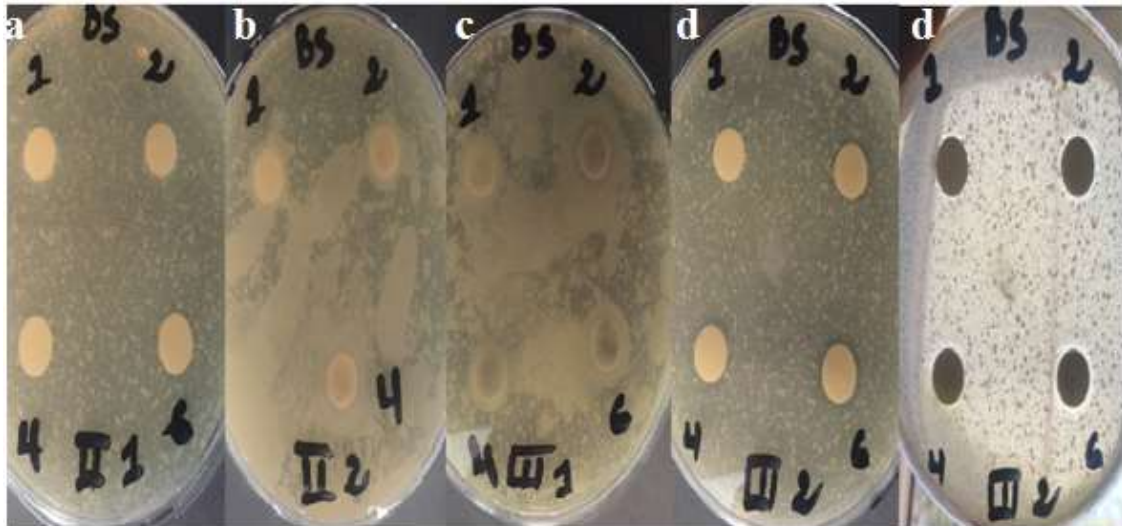


Figure 27: Activité antibactérienne des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Bacillus subtilis*

[a : AgTiO₂(N), b : AgTiO₂(cal), c : AgTiO₂(aj,cal), d : AgTiO₂(aj)].

Discussion

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

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

II.3.5 Étude comparative de l'effet antifongique des NPs de TiO₂ et des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur la levure « *Candida albicans* »

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

Tableau 11 : Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

Echantillons	Quantité (µg)	50	100	200	300
	TiO ₂		10	10	10
TiO ₂ (NPs)		10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (aj)		10	10	10	10

Ag-TiO ₂ (aj, cal)	≤ 9	≤ 9	≤ 9	≤ 9
Ag-TiO ₂ (N)	10	10	10	10
Ag-TiO ₂ (cal)	10	10	10	10

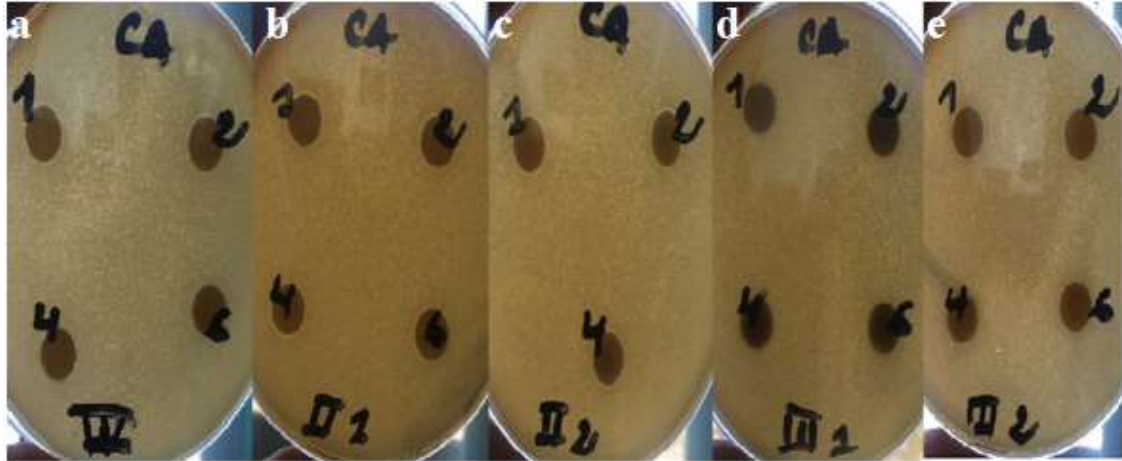


Figure 28: Activité antifongique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur le *Candida albicans*

[a : TiO₂(Produit commercialisé), b : AgTiO₂(N), c : AgTiO₂(cal), d : AgTiO₂(aj,cal), e : AgTiO₂(aj)].

Discussion

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

Conclusion

Pour les quatre souches bactériennes, les différents échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂ synthétisés présentent un effet bactéricide et bactériostatique plus importants que celui obtenu avec les nanoparticules de TiO₂. Ce qui confirme l'effet de synergie d'Ag-TiO₂ et le mécanisme d'action des nanoparticules d'argent, décrit dans la littérature. [16,44]

Les 04 échantillons des nanocomposites d'Ag-TiO₂(notamment les nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj), synthétisés à un pH fortement acide) présentent un effet antibactérien important sur les bactéries « Gram négative », surtout contre le *Pseudomonas aeruginosa* qui est un pathogène nosocomial majeur, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose et dans les services de réanimation. L'augmentation actuelle de l'incidence des souches multi-résistantes de *Pseudomonas aeruginosa* et les

phénomènes épidémiques locaux qui en résultent sont particulièrement inquiétants, car ces souches cumulent constamment plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques (efflux, imperméabilité, modification du site d'action ou inactivation enzymatique). [19]

II.4 Evaluation toxicologique des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (Test in vivo)

II.4.1 Test de toxicité des nanocomposites d'Ag-TiO₂

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

Discussion

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

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

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

II.4.2 Effet irritant de la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ sur la peau de l'animal

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

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

Tableau 12 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj)

Race	Rats type Wistar								
Temps	T ₀	3 min	1h	2h	4h	24h	48h	72 h	14 jrs
Formation d'érythème et d'escarre									
Cotation	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Formation d'œdème									
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Figure 29: Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites Ag-TiO₂ (aj)

Discussion

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

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

Tableau 13 : Cotation des réactions cutanées obtenue avec la pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

Race	Rats type Wistar								
Temps	T ₀	3 min	1h	2h	4h	24h	48h	72 h	14 jrs
Formation d'érythème et d'escarre									
Cotation	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Formation d'œdème									
Cotation	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Figure 30: Rats après l'application de pommade à base des nanocomposites d'Ag-TiO₂ (aj, cal)

Discussion

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

Conclusion

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

Conclusion

La pharmacie est la science qui s'intéresse à la conception, au mode d'action et à la préparation des nouvelles molécules et formes pharmaceutiques pour le bien être du patient.

La synthèse des nanocomposites d'AgTiO₂ par voie sol gel à partir du tétrachlorure de titane nous a permis d'obtenir une poudre fine de couleur jaune pâle inodore de taille nanométrique dont la composition chimique a été confirmée grâce à une technique très fiable appelée EDX et une taille nanométrique de 67,4 nm a été vérifiée par une technique précise de mesure directe appelée DLS.

D'autres techniques d'analyse physico-chimiques et microscopiques ont été appliquées afin de s'approfondir dans la caractérisation des nanocomposites synthétisés

la relation entre la variation des différents paramètres de synthèse notamment pH et effet de la calcination et la réponse antimicrobienne a été mise en évidence en recourant à un plan d'expériences élargi, ainsi l'optimum du pH et de calcination pour une meilleure réponse a été déterminé.

L'étude de l'effet antimicrobien des nanocomposites synthétisés nous a permis de constater que ces derniers possèdent un effet remarquable sur un large spectre allant des coques aux bacilles et du gram positif au gram négatif avec un effet bactériostatique et bactéricide ; cependant il est souhaitable de procéder dans l'avenir à l'étude de l'effet antimicrobien sur des souches multirésistantes.

Dans le but de mettre en valeur cet effet biologique dans le domaine médical, une pommade à base des nanocomposites synthétisés pour une application dermique a été formulée, cette dernière présente un aspect conforme sur le plan galénique.

Afin de prouver l'innocuité de la pommade formulée sur la santé humaine, nous avons réalisé une étude de toxicité *in vivo* sur des animaux, les résultats obtenus à l'issue de cette dernière confirment l'absence des effets secondaires ou des lésions graves.

A cet effet nous concluons que la pommade formulée à base de nanocomposite de Ag-TiO₂ pourrait être utilisée efficacement dans le but de guérir et prévenir les infections bactériennes et ce quelque soit le type de la bactérie présente dans les lésions dermiques

surtout chez les patients à risque élevé de complications graves comme les diabétiques, dont les antibiotiques classiques démontrent une faiblesse de plus en plus palpable ;

Sur le plan économique, le faible coût de synthèse du nanocomposite Ag-TiO₂ et la maîtrise totale du processus nous encourage à l'exploitation industrielle

Sur le plan social, un patient bien protégé contre les microorganismes pathogènes en diminuant le temps de guérison constitue un soulagement pour le patient lui-même et pour son entourage.

Enfin tout en veillant à réaliser des tests complémentaires, nous souhaitons que ce modeste travail aboutisse à l'obtention d'un brevet et qu'il permette de soulager la souffrance des millions de malades à travers le monde.

En perspective nous conseillons d'étendre l'intervalle de recherche de la nanoscience dans le domaine médical et pharmaceutique.

Bibliographie

- [1] A.Courty, I. Journal of Chemical Physics 116 (18) (2002) 8074-8078.
- [2] A.De mortiere, C. m. Langmuir 23 (2007) 16.
- [3] B.Chaudret.C.R.Physique 6 (2005) 117 .
- [4] B.Gibbins, L. Med.Dev.Diagnos.Ind ,(2005) 112-116 .
- [5] Bauline loison , Biotechnologies.Université de Bourgogne,«Etude de la spore de Bacillus subtilus: caratérisation des structures impliquées dans sa résistance» 2013.
- [6] Bourée, P. (s.d.). Aide -mémoire de parasitologie et de pathologie tropicale 2ieme édition,chap: 93-94,page 228.
- [7] C. J. Brinkeret G.W. Scherer. «Sol-Gel Science. The Physics and Chemistry of Sol-Gel processing» Academic Press, (1990).
- [8] C.B. Murray, C. M. *Annu.Rev.Matèr.Sci.30 (2000)545.*
- [9] C.Petit, M. Journal of Magnitisme and Magnitique Materiels 166 (1997) 1-2 .
- [10] C.Petit, M. Journal of the Amirican Chemical Society 115 (1993) 10 .
- [11] Chen, H.-Y. C.-H. «Fabrication and photocatalytic activities in visible and UV light regions of Ag@TiO₂ and NiAg@TiO₂ nanoparticles», Nanotechnology 20, 105704 (10pp), (2009).
- [12] COLLONGUES, R.« Argent métal» Encyclopedia Universalis [en ligne], consulté le 22 mai 2019. URL : <http://www.universalis.fr/encyclopedie/argent-metal/>.
- [13] Cuenya, B. Thin Solid Films 518 (2010) 12 .
- [14] E.G. MORNANI, P. M. « Effect of calcination temperature on the size and optical properties of synthesized ZnO nanoparticles», Journal of Ovonic Research, Vol. 12, No. 2, P. 75-80, (2016).
- [15] E.P.Sardella, R. M. Plasma Process.Polym, 3 (2006) 456-469.

- [16] E.T. Hwang, J. L. «Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria», *Small* 4, P. 748-749,(2008).
- [17] Essoh., C. Y. Étude épidémiologique de souches de *Pseudomonas aeruginosa* responsables d'infections et de leurs bactériophages pour une approche thérapeutique.2013 . Université de Paris Sud ; Université de Cocody .
- [18] Florin Prosie, F.-X. L. (18 juillet 2008). Nanoparticules: structures, utilisations et effets sur la santé. Hôpital Sébastopol, unité fonctionnelle de pathologie professionnelle et santé au travail, F-51092 Reims Cedex , France.
- [19] François Barbier et Michel Wolff. « Multirésistance chez *Pseudomonas aeruginosa*, Vers l'impasse thérapeutique ? », *MEDECINE/SCIENCES, M/S* n° 11, vol. 26, P. 960, (Novembre 2010).
- [20] G.Surendran, G. M. *Small*.1 (2005) 964.
- [21] Guitou, M.-A. (2014). «Nanoparticules et santé »: des applications aux risques potentiels.L'exemple du TiO₂ thèse de doctorat .
- [22] H. Rosi and S. Kalyanasundaram. « Synthesis, characterization, structural and optical properties of titanium-dioxide nanoparticles using *Glycosmiscochinchinensis* Leaf extract and its photocatalytic evaluation and antimicrobial properties», *World News of Natural Sciences* 17 , 7-9, (2018).
- [23] Haruta, M. (1997). *Catalysis Today* 36 (1): 153-166 .
- [24] I.Sondi, B.-S. J. *Colloid Interf. Sci*, 275 (2004) 177-182 .
- [25] J. Boczkowski, S. L. (2010). Nanoparticules: une prévention est-elle possible? . . faculté de médecine de Créteil, université Paris-Est, France.
- [26] J.Faerber. . «Microscopie électronique à balayage, Microanalyse X par sonde électronique», (P. 5. (2004).
- [27] J.P.Wilcoxon, R. *Journal of Chemical Physics* 98 (1993)12.
- [28] J.S. Kim., E. K. *Biol.Med.*, 3 (2007) 95-101.
- [29] J.Turkevich, P. *Discussions of the Faraday Society* (1951) 11 .
- [30] J.Yang, J. *Chemical society Rviews* 40 (2011) 3 .

- [31] K.Philippot, B. Journal of Physical Chemistry 6 (2003) 1019 .
- [32] K.Wikander, C. langmuir 22 (2006) 10 .
- [33] Khan Behlol Ayaz Ahmed, S. S. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 130 (2014) 54-58.
- [34] Kholoud M.M. Abou El-Nour a, A. E.-W. Synthesis and applications of silver nanoparticles .14 April 2010.
- [35] Link, S. E.-S. Journal of Physical Chemistry B103 (1999) 21.
- [36] M.Brust, M. j.-C. (1994).
- [37] M.Faraday. Philosophical Transactions of the Royal Society of London 147 (1857) 145-181. .
- [38] M.Hosokawa. (2007). Nanoparticule technology hanbook, (Elsevier B.V).
- [39] M.Meena Kumari, J. J. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 137 (2015) 185.
- [40] M.Mostafavi, Y. P. Phys.Chem.59 (2000) 49.
- [41] M.T.Reetz, S. Angew.Chem.Int.Ed .34 (1995) 2240.
- [42] M.T.Reetz, W. J. Chem.Soc.116 (1994) 7401.
- [43] M.Treguer, C. H. Journal of Chemical Physics .B 102 (1998) 4310.
- [44] M.Y. Lan, C. L. «Both enhanced biocompatibility and antibacterial activity in Ag-decorated TiO₂ nanotubes», PLoS One 8, P. 6-7, (2013).
- [45] Mock, J. M. Journal of Chemical Physics 116 (2002) 15. .
- [46] Mónica Andrea Vargas, J. E.-P. « Amorphous TiO₂ nanoparticles: Synthesis and antibacterial capacity», Journal of Non-Crystalline Solids 459, 192–205, (2017).
- [47] Mtimet, I. (s.d.). « Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent »Thèse de doctorat 2011 .
- [48] MTIMET, M. (2011). « Elaboration de surfaces biocides contenat des nanoparticules d'argent ». Université de Rouen .

- [49] N. Cotolan, M. R. « Sol-gel synthesis, characterization and properties of TiO₂ and Ag-TiO₂ coatings on titanium substrate », *Surface & Coatings Technology*, (2016).
- [50] N.Jayachandra Reddy, D. M. *Mat.Sci.Engin.C* 34 (2014) 115-122.
- [51] N.Keghouche, S. F. *Phys.Chem.*74 (2005) 18 .
- [52] Nagaveni, K. e. «Synthesis and Structure of Nanocrystalline TiO₂ with Lower Band Gap Showing High Photocatalytic Activity», *Langmuir*, Vol.20, No. 7, P. 2900-2907, (2004).
- [53] Neel, L « Théorie du trainage magnétique des ferromagnétiques en grains fins avec applications aux terres cuites. . *Annal of Geophysics* 5: (1949) 99-136. .
- [54] Quentin, L. T. « Synthèse de nanoparticules de dioxyde de titane de morphologies contrôlées: localisation, quantification et aspects toxicologiques de la cellule à l'organisme pluricellulaire»thèse de doctorat. Université de Bordeaux 2014.
- [55] S.Chettibi, J. J. *Phys.Chem.*45 (2004) 128.
- [56] S.Chettibi, R. E. *Catal.Today.*113 (2006) 15 .
- [57] S.Lanone a, J. b. (2010). *Nanoparticules: une prévention est -elle possible?* Paris , université Paris-Est, faculté de médecine de Créteil , France.
- [58] S.Pal, Y. J. Song.*Appl.Environ.Micribo*l, 73 (2006) 1712-1720.
- [59] SANHES, D. (2008). « Nouveaux ligands dihydro anthracène vers la formation de nanoparticules et de complexes de palladium.Etudes de leurs comportement catalytique dans différents milieux», thèse de Doctorat . Université de Toulouse.
- [60] Souici, A. (2009). « *Etude des propriétés optiques et structurales de nanoparticules de ZnS et PbS induites par radiolyse* »,thèse de doctorat .
- [61] TRIBOULET, S. « Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur les macrophages murins par une approche proteomique »Thèse de doctorat .11 octobre 2013 .
- [62] Wided, D. (s.d.). «Nanoparticules d'or et d'argent déposées sur oxyde de cérium synthétisées sous irradiation »thède de magister en physique 2010.

[63] Yang, J. T. Physical Review B 50 (1994) 11 .

[64] Z.S.Pillai, P. Journal of Physical Chemistry B 108 (2004) 3.

Autres:

[65] LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES. OCDE 404. « Effet irritant/corrosif aigu sur la peau », P.2-4, (Juillet 2015).

[66] LIGNE DIRECTRICE DE L'OCDE POUR LES ESSAIS DE PRODUITS CHIMIQUES. OCDE 423. « Toxicité orale aiguë - Méthode par classe de toxicité aiguë ». P. 2-4. (Décembre 2001).

[67] «Recommandation de la Commission européenne du 18 octobre 2011 sur la définition des nanomatériaux ». *Journal officiel de l'union européenne*.

[68] Centre de Recherche sur la Matière Divisée Unité Mixte de Recherche 6619, CNRS Université d'Orléans 1b rue de la Férellerie, 45071 Orléans cedex 2 (Juillet 2019).

[69] <http://www.eaglabs.fr/cm/eds.html> consulté le 10/07/2019.

[70] http://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/100_E_brochure.pdf. consulté le 28/07/2019.

[71] <https://www.lrccp.com/fr/qui-sommes-nous/moyedessais/item/spectrophotometrie-infrarouge-irtf>.consulté le 02/08/2019.

[72] Recommandation de la commission Européenne du 20 octobre 2011 sur la définition des nanomatériaux.consulté le 20/07/2019.

[73] <http://www.inrs.fr/actus/tio2.html>.consulté le 20/09/2019.

[74] <http://www.sciencesetavenir.fr>.consulté le 20/09/2019.

Résumé

Le nanocomposite de Ag-TiO₂ synthétisé par voie chimique Sol-gel à partir du tétrachlorure de titane présente une taille avoisinant les 67 nm.

La taille ainsi que la composition chimique ont été contrôlées respectivement par la DLS et L'EDX couplée à la microscopie électronique, ces deux dernières techniques très fiables ont confirmé la taille nanométrique et la composition chimique ciblée du nanocomposite synthétisé ;

D'autres techniques physico-chimiques et microscopiques ont été sollicitées afin de renforcer la caractérisation de la molécule synthétisée ;

L'étude de l'activité antibactérienne réalisée sur plusieurs bactéries : *E.coli*, *S.aureus*, *B. Subtilis*, *P.aeroginosa*, témoigne que le nanocomposite synthétisé est actif sur un large spectre avec un effet bactéricide et bactériostatique, tandis que l'activité antifongique de ces nanocomposites est faible.

Pour valoriser la molécule synthétisée dans le domaine médical, une pommade à base de ce dernier a été formulée, dont la première indication est les infections dues aux lésions dermiques et ce à titre préventif ou curatif ;

Une étude de toxicité sur des animaux de la pommade nous a permis de s'assurer de la sécurité de cette dernière à l'emploi.

Mots clés: Synthèse, valorisation, médical, nanocomposite, dioxyde de titane et d'argent.

Abstract

Ag-TiO₂ nanocomposite chemically synthesized by Sol-gel method from titanium tetrachloride has a size around 67 nm.

The nano-size as well as the chemical composition was controlled respectively by DLS and EDX coupled to electron-microscopy, these last two methods confirmed the nanometric size and the targeted chemical composition of the synthesized nanocomposite; other physico-chemical and microscopic techniques have been used to deepen the characterization of the synthesized molecule.

The study of the antibacterial activity carried out on several bacteria: *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, testifies that the synthesized nanocomposite is active on a broad spectrum with a bactericidal and bacteriostatic effect.

To valorize the molecule synthesized in the medical field, an ointment based on the latter has been formulated, the first indication of which is infections due to dermal lesions and for preventive or curative purposes.

An animal toxicity study of the ointment helps us to ensure the safety of the latter to use.

Key words: Synthesis, valorization, medical, nanocomposite, titanium dioxide and silver.

ملخص:

المركب النانوي لأوكسيد التيتانيوم و الفضة المصنوع بطريقة الصول-جل الكيميائية انطلاقا من رباعي الكلورور و التيتانيوم يمتلك حجم بحوالي 67 نانومتر .

الحجم وكذا التركيبية الكيميائية مراقبة على التوالي بواسطة (د.ل.س) و (ا.د.اكس) المقرون بالمجهر الالكتروني ذو المسح ، هاتان التقنيتان الأخيرتان الموثوق بهما أكدتا أن الحجم النانومتري و التركيب الكيميائي المستهد، تقنيات فيزيائية و كيميائية أخرى التمسست لتعزيز وصف الجزيئ المركب.

دراسة النشاط المضاد للبكتيريا الذي اجري على العديد من البكتيريا: الاشيريشية الكولية, مكورات العنقودية الذهبية, العسوية الرقيقة, الزانفة الزنجارية, تشهد على أن المركب النانوي هو مركب نشط على طيف واسع مع تأثير مبيد للجراثيم و البكتيريا.

لتعزيز الجزيئ الذي تم تصنيعه في المجال الطبي تمت صياغة مرهم من خلال هذا الأخير لاستعماله ضد الالتهابات الجلدية و هذا كعلاج وقائي أو علاجي .

دراسة سمية الحيوان للمرهم سمحت لنا بضمان سلامة هذا الأخير للاستعمال.

الكلمات المفتاحية: صناعة، تميمين، طبي، المركب النانوي، ثنائي أكسيد التتانيوم و الفضة.