



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique
جامعة البليدة 1
Université Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biotechnologies & Agro-Ecologie

Mémoire

En vue de l'obtention du Diplôme d'un Master Académique

Option

Biotechnologie et Pathologie Moléculaire

Thème

Elaboration et caractérisation des nanoparticules métalliques : vers des applications biomédicales

Présenté par :

M^{elle} Benhamdine Meriem Yousra

Mr Lachani Islem

Soutenu le : Lundi 12 Septembre 2022

Devant le Jury :

Mme. Lounaci.L	GRADE	MCB	SNV, Blida1	Présidente
Mme. Rahim.I	GRADE	MCA	SNV, Blida 1	Examinatrice
Mr. Bouhenna .M.M	GRADE	MRA	CRAPC,Bousmail	Promoteur
Mme. Chelghoum.H	GRADE	MCB	SNV, Blida 1	Co-Promotrice

Session 2021 / 2022

Remerciements

Remerciements

Louange à dieu qui nous a permis d'achevé ce travail

Nos remerciements vont également aux membres de jury, **Mme. LOUNACI** et **Mme. RAHIM** d'avoir consacré leur temps pour évaluer notre travail et d'avoir accepté de participer à ce jury.

Ce travail a été réalisé au sein de laboratoire Biomolécules et effets thérapeutiques, division santé du centre de recherches et d'analyses physico-chimiques « **CRAPC** » Bou-Ismaïl (TIPAZA), dont nous remercions son directeur et chaque membre du personnel.

Nous tenons tout d'abord à remercier notre Promoteur, **Mr. BOUHENNA** pour tous les efforts qu'il a consenti tout au long de l'élaboration de ce travail, ses encouragements, ses précieux conseils et la confiance qu'il nous a toujours témoigné nous ont été de grande aide.

Également, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre très chère Copromotrice **Dr. CHELGHOUM** pour son enthousiasme, son implication presque quotidienne et sa grande disponibilité. Ses connaissances scientifiques et sa capacité à les partager nous ont été très bénéfiques lors de la réalisation de ce travail.

Nous exprimerons aussi notre gratitude envers **Mr. KEBIR** qui n'a épargné aucun effort pour nous aider tout au long de notre stage, qu'il trouvera ici l'expression de notre profond respect.

Nos remerciements vont également à **Melle. BELAROUCI** doctorante au niveau de centre, pour son aide, ses connaissances scientifiques et sa capacité à les partager avec nous ainsi que sa grande gentillesse.

Nos remerciements vont aussi aux **Mme. NEKAB** et **Mme. BOUAFIR** docteurs au niveau de centre, pour l'aide qu'ils nous ont accordé au sein de leur laboratoire, leur compétence et leur grande gentillesse.

Nous remercions aussi notre très chère cheffe d'option **Pr. ALIM**, Votre écoute, votre enseignement et vos conseils furent très appréciés.

Nous remercions tous les enseignants qui ont contribué à notre formation.

Dédicaces



Dédicaces

*Je dédie ce travail à mes chers parents : Ma chère mère **Farida** et Mon cher père **Mohamed**
Aucune dédicace ne saurait exprimer ni la profondeur de mes sentiments ni l'amplitude de ma reconnaissance,*

Vous m'avez donné la vie, vous avez veillé sur mon éducation et mon bien être, vous m'avez inculqué le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance face aux difficultés de la vie, vous étiez toujours mon refuge qui me prodigue sérénité, amour, tendresse et conseil. Vos prières n'ont jamais cessé et si je suis à cette étape de la vie c'est grâce à vos encouragements et vos paroles de soutien. Pour tout cela et encore plus, je vous dois tout ce que je suis aujourd'hui et ce que je serais demain. J'espère que j'ai pu réaliser ce que vous avez toujours voulu de moi.

*A toi ma sœur **Hadjer** et à mon frère **Abderrahmane**, ceux qui ont partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail, vous étiez toujours mon exemple dans les études ainsi que la vie merci pour votre soutien et votre encouragement que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A toi mon beau-frère **Reda**, pour ta présence, ton soutien et ton encouragement.*

*A ma deuxième maman **Zoulikha** et à ma tante **Hamida** et **Djamila**, vos prières n'ont jamais cessé merci pour l'amour, l'affection et la tendresse que vous m'avaient donné, que ce modeste travail traduit ma gratitude et mon affection.*

*A ma cousine **Nafissa** et mes deux copines **Yasmine** et **Sahar** et à mes cousines **Karima**, **Wissem**, **Lamia**, **Lilia**, **Leila**, **Nawel** vous étiez à mes côtés tout le long de mon parcours universitaire, merci pour nos moments d'émotion ainsi que votre soutien et votre encouragement.*

A mon binôme, qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail je te souhaite plus de succès.

*A une personne en or que j'ai rencontré et qui nous a aidé pour finaliser notre travail **Lina** que dieu vous bénisse je te souhaite une bonne continuation pour ton parcours professionnel.*

A tous mes amis (e) et mes camarades qui n'ont jamais cessé (e) de me soutenir.

A toute personne qui a contribué dans ce travail de près ou de loin.



Meriem

A mes grands-parents Yema Khadija et Baba Elaid Benisse,

A mon très cher père Tahar qui m'a soutenu et m'a encouragé que dieu te protège,

*A mes très chères sœurs Imen et Sarah qui m'ont soutenu et encouragé tout au long de
ma vie qu'elles trouvent ici ma reconnaissance*

A ma très chère amie Zahra qui m'a soutenu tout au long de mon cursus

*A mes chers amis Mohamed et Abdelkader qui étiez toujours présent à mes côtés dans le
meilleur comme dans le pire,*

*A toute ma famille et à toute personne qui m'a soutenu et encourage afin d'achever ce
projet,*

*A mon binôme qui a contribué à la réalisation de ce modeste travail je te souhaite plus de
succès,*

A tous mes amis qui m'ont aidé de près ou de loin

Je dédie le fruit de mon cursus universitaire.



Sommaire

Sommaire

Dédicaces	I
Remerciements	Iv
Liste des figures	Vii
Liste des tableaux	Viii
Liste des abréviations	Ix
Résumé	Xi
ملخص	Xii
Abstract	Xiii
Introduction générale	01

CHAPITRE I : Etude bibliographique

I. Etude bibliographique	04
I.1 Nanotechnologie	04
I.1.1 Nanomédecine ou Nanosanté	05
I.1.2 Nanomatériaux	06
I.1.3 Nanoparticules	06
I.1.4 Caractéristiques des nanoparticules	07
I.1.5 Applications des nanoparticules	09
I.2 Nanoparticules d'argent	10
I.2.1 Propriétés des nanoparticules d'argent	10
I.2.2 Méthodes d'élaboration de nanoparticules d'argent	12
I.2.3 Mécanisme de formation dans la synthèse verte des AgNPs	15

I.3	Nanoparticules d'argent et applications biomédicales	16
I.3.1	Modification et / ou fonctionnalisation des AgNPs	16
I.3.2	Applications biomédicales	17
I.3.3	Toxicité des nanoparticules d'argent	18

CHAPITRE II : Matériel & méthodes

II.	Matériel et Méthodes	21
II.1	Matériel	21
II.1.1	Matériel non biologique	21
II.1.2	Matériel biologique	22
II.1.2.1	L'algue brune	22
II.1.2.2	Les souches bactériennes	22
II.2	Méthodes	23
II.2.1	Préparation d'extrait hydro éthanolique et hydrosoluble d'algue brune	23
II.2.2	Biosynthèse des nanoparticules d'argent	23
II.2.3	Synthèse chimique des nanoparticules d'argent	23
II.2.4	Caractérisation des AgNPs préparées par l'extrait d'algue brune et citrate de sodium	25
II.2.5	Applications biomédicales	26
II.2.5.1	Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent vis-à-vis des souches <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	26

CHAPITRE III : Résultats & discussion

III.	Résultats & discussion	29
III.1	Biosynthèse des nanoparticules d'argent	29
III.2	Synthèse chimique des nanoparticules d'argent	29

III.3	Caractérisation des AgNPs préparées par l'extrait d'algue brune et citrate de sodium	30
III.4	Evaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent vis-à-vis des souches <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	41
	Conclusion générale	48
	Références bibliographiques	51
	Annexes	63

Liste des figures

Liste des figures

Numéro	Titre	Page
Figure 1	Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques	4
Figure 2	Les applications des nanotechnologies dans la médecine	5
Figure 3	Classification des nanomatériaux	6
Figure 4	Les différents types de nanoparticules	7
Figure 5	Images par microscope électronique en transmission de différentes formes de nanoparticules A, B, C, D, E, F.....	8
Figure 6	Les 3 différentes formes des nanoparticules	8
Figure 7	Structure chimique d'argent	11
Figure 8	Résonance plasmonique de surface (SPR) pour les AgNPs à une longueur d'onde spécifique ; b) Image de microscopie en champ noir des AgNPs.....	11
Figure 9	Représentation schématique des différentes techniques de la synthèse des AgNPs.....	13
Figure 10	Schéma représentatif de la synthèse des nanoparticules d'argent par voie biologique	15
Figure 11	Schéma représentatif de mécanisme d'action des AgNPs dans les bactéries ..	18
Figure 12	Images prises de différentes algues brunes	22
Figure 13	L'organigramme récapitulatif de la préparation des nanoparticules d'argent à partir des deux extraits d'algue brune et du citrate de sodium jusqu'à caractérisation	24
Figure 14	Photo réelle d'un exemple de lecture des zones d'inhibition sur une des boîtes d'antibiogramme	27
Figure 15	Résultat de biosynthèse (changement de couleur vers un brun jaunâtre)	29
Figure 16	Résultat de synthèse chimique (changement de couleur le gris verdâtre)	30
Figure 17	Spectre d'absorbance des AgNPs HS obtenu par UV-Visible	31
Figure 18	Spectre d'absorbance des AgNPs HE obtenu par UV-Visible	31
Figure 19	Spectre d'absorbance des AgNPs CITR obtenu par UV-Visible.....	31
Figure 20	Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par l'extrait hydrosoluble de l'algue brune à l'aide de DLS	32
Figure 21	Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydrosoluble.....	32
Figure 22	Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par l'extrait hydro	

éthanolique de l'algue brune à l'aide de DLS	33
Figure 23 : Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydro éthanolique.....	33
Figure 24 : Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par Citrate de sodium à l'aide de DLS	34
Figure 25: Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par Citrate de sodium	34
Figure 26 : Image MEB d'une analyse morphologique des AgNPs HS à une échelle de 5 μm	36
Figure 27 : Image MEB d'une analyse morphologique des AgNPs HE à une échelle de 5 μm	36
Figure 28 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées par l'extrait hydro-éthanolique d'algue brune	38
Figure 29 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées par l'extrait hydrosoluble d'algue brune.....	39
Figure 30 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées par citrate de sodium	40
Figure 31 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
Figure 32 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
Figure 33 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de <i>Escherichia Coli</i>	44
Figure 34 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de <i>Enterobacter cloacae</i>	45

Liste des tableaux

Liste des tableaux

Numéro	Titre	Page
Tableau I	Composition des nano-objets utilisés en biologie et médecine et leurs principales applications	09
Tableau II	Propriétés physiques de l'argent	10
Tableau III	Principaux réducteurs et stabilisants biologiques des nanoparticules	13
Tableau IV	Les avantages et les inconvénients de différentes méthodes de synthèse des AgNPs	14
Tableau V	Représentation du matériel non biologique utilisé dans la partie expérimentale	21
Tableau VI	Représentation des résultats des AgNPs synthétisées par UV-Visible	30
Tableau VII	Représentation des groupements fonctionnels montrés sur la surface des AgNPs bio et chimiquement synthétisées	40
Tableau VIII	Zones d'inhibition de différentes AgNPs (HS, HE et CITR), AgNO ₃ et Gentamicine vis à vis les quatres souches bactériennes (Gram+ / Gram -)	41

Liste des abréviations

Liste des abréviations

<i>AgNPs</i>	Nanoparticules d'argent
<i>ATB</i>	Antibiotique
<i>FTIR</i>	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
<i>MEB</i>	Microscope électronique à balayage
<i>nm</i>	Nanomètre
<i>UV</i>	Ultra-violet
<i>AgNO₃</i>	Nitrate d'argent
<i>DLS</i>	Diffusion dynamique de la lumière
<i>SPR</i>	Résonance plasmonique de surface
<i>PVD</i>	Dépôt physique par phase vapeur
<i>PECVD</i>	Dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma
<i>Ag</i>	Argent
<i>NO₃</i>	Nitrate
<i>MH</i>	Muller Hinton
<i>pH</i>	Potentiel d'hydrogène
<i>Tr</i>	Tour
<i>°C</i>	Degré Celsius
<i>Ag⁺</i>	Ions argent
<i>HS</i>	Hydrosoluble
<i>HE</i>	Hydro éthanolique
<i>CITR</i>	Citrate

Résumé

Résumé

L'argent ; le métal noble en plus de ses propriétés physico-chimiques et optique ; il est connu avant tout par ses propriétés bactéricides ce qui mène les chercheurs à son exploitation dans diverses applications biomédicales. Les algues marines sont aussi une source riche en molécules thérapeutiques, de métabolites secondaires et de métabolites biologiquement actifs tels que les "polyphénols". L'objectif de ce travail est la réalisation d'une synthèse de nanoparticules d'argent en suivant deux méthodes une chimique basée sur la réduction par le citrate de sodium et une biologique (dites verte) en utilisant des extraits hydrosoluble et hydro-éthanolique d'algue brune. L'étape qui s'avère crucial dans la réalisation de notre travail c'est bien la caractérisation qui commence déjà par le changement de couleur révélant la formation des nanoparticules d'argent. Cette révélation est ensuite confirmée par spectroscopie UV-Visible avec des absorbances de 420 nm, 390nm et 425nm. La forme sphérique a été visualisée par le MEB. La distribution de leurs tailles obtenue par DLS montre une distribution différente selon le type de nanoparticules d'argent avec la meilleure distribution celle de l'extrait hydro-éthanolique qui était de 174,5 nm. Quant aux groupements fonctionnels leurs identification a été faite par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) qui montre des pics similaires avec apparition ou disparition de deux bandes chez les deux synthèses faite par les extraits d'algue par rapport à celle de citrate qui montre uniquement trois bandes dans deux complètement différents à celles des extraits algales une chose à prendre en considération en cas d'applications biomédicales. Le Potentiel Zeta nous a montré la différence de charge globale par rapport au type de nanoparticules d'argent dont la meilleure était de -38,5 mV celle de l'extrait hydrosoluble algale. Les nanoparticules d'argent synthétisées ont montré une activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les bactéries pathogènes humaines testées (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* et *Enterobacter cloacae*) dont les meilleurs résultats obtenus en particulier l'échantillon des nanoparticules d'argent hydrosolubles vis-à-vis aux *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aureginosa* par rapport aux nanoparticules d'argent hydroéthanoliques et citrate de sodium. Ce travail nous a démontré que l'algue brune utilisée contient des composés biologiquement actifs, ce qui nous a aidé à obtenir ces bio Nanoparticules présentant une forte activité antibactérienne.

Mots clés : Nanoparticules d'argent, synthèse verte, Bio nanoparticules, Activité antibactérienne, Algue brune.

ملخص

الفضة؛ المعدن النبيل بالإضافة إلى خواصه الفيزيائية والكيميائية والبصرية. عرف قبل كل شيء بخصائصه المبيدة للجراثيم، مما دفع الباحثين لاستخدامه في مختلف التطبيقات الطبية الحيوية. تعد الأعشاب البحرية أيضاً مصدرًا غنيًا للجزيئات العلاجية والمستقلبات الثانوية والمستقلبات النشطة بيولوجيًا مثل "البوليفينول". الهدف من هذا العمل هو تحقيق تخليق جزيئات الفضة النانوية باتباع طريقتين، واحدة كيميائية تعتمد على الاختزال باستخدام سترات الصوديوم والأخرى بيولوجية (تسمى الخضراء) باستخدام مستخلصات الأعشاب البحرية البنية القابلة للذوبان في الماء والأخرى المائية الإيثانولية. الخطوة الحاسمة في تحقيق عملنا هي التوصيف الذي يبدأ بالفعل مع تغيير اللون الذي يكشف عن تكوين جسيمات الفضة النانوية. ثم تأكيده بعد ذلك بواسطة التحليل الطيفي للأشعة المرئية وفوق البنفسجية بامتصاص 420 نانومتر و390 نانومتر و425 نانومتر. تم تصور الشكل الكروي بواسطة MEB في أي نوع من الجسيمات النانوية الفضية المركبة. يوضح توزيع أحجامها التي حصلت عليها DLS توزيعًا مختلفًا وفقًا لنوع جسيمات الفضة النانوية مع أفضل توزيع للمستخلص المائي الإيثانولي الذي كان 174,5 نانومتر. أما بالنسبة للمجموعات الوظيفية، فقد تم التعرف عليها بواسطة مطيافية الأشعة تحت الحمراء لتحويل فورييه (FTIR) والتي تظهر قممًا متشابهة مع ظهور أو اختفاء شريطين في التركيبين اللذين تم تصنيعهما بواسطة مستخلصات الطحالب مقارنةً بالسترات التي تظهر ثلاث قممًا فقط في اثنين. تختلف تمامًا عن تلك الموجودة في مستخلصات الطحالب التي يجب مراعاتها في حالة التطبيقات الطبية الحيوية. أظهرت لنا Zeta Potential الفرق في الشحنة الكلية وفقًا لنوع جسيمات الفضة النانوية، وأفضلها كان -38,5 مللي فولت من مستخلص الطحالب القابل للذوبان في الماء. أظهرت جزيئات الفضة النانوية المُصنَّعة نشاطًا مثبطًا ضد جميع البكتيريا المسببة للأمراض البشرية المختيرة (*Staphylococcus aureus* و *Escherichia coli* و *Pseudomonas aureginosa* و *Enterobacter cloacae*) والتي تم الحصول على أفضل نتائجها على وجه الخصوص عينة الجسيمات الفضة النانوية القابلة للذوبان في الماء ضد *Staphylococcus aureus* و *Pseudomonas aureginosa* مقارنةً بجسيمات الفضة النانوية الإيثانولية المائية و سترات الصوديوم. أظهر لنا هذا العمل أن الأعشاب البحرية البنية المستخدمة تحتوي على مركبات نشطة بيولوجيًا، مما ساعدنا في الحصول على هذه الجسيمات النانوية الحيوية ذات النشاط القوي المضاد للبكتيريا.

كلمات مفتاحية: الجسيمات النانوية الفضية، الطحالب البنية، جسيمات النانو الحيوي، التركيب البيولوجي، نشاط مضاد للبكتيريا.

Abstract

Silver; the noble metal in addition to its physico-chemical and optical properties; it is known above all for its bactericidal properties which leads researchers to exploit it in various biomedical applications. Marine algae are also a rich source of therapeutic molecules, secondary metabolites and biologically active metabolites such as "polyphenols". The objective of this work is the synthesis of silver nanoparticles following two methods: a chemical one based on reduction by sodium citrate and a biological one using water-soluble and hydro-ethanol extracts of brown seaweed. The step that is crucial in the realization of our work is the characterization which already starts with the change of color revealing the formation of silver nanoparticles. This revelation is then confirmed by UV-Visible spectroscopy with absorbances of 420 nm, 390nm and 425nm. The spherical shape was visualised by SEM. The distribution of their sizes obtained by DLS shows a different distribution according to the type of silver nanoparticles with the best distribution being that of the hydro-ethanolic extract which was 174.5 nm. As for the functional groups, their identification was done by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) which shows similar peaks with the appearance or disappearance of two bands in the two syntheses made by the algal extracts compared to that of citrate which shows only three bands in two completely different from those of the algal extracts, something to be taken into consideration in case of biomedical applications. The Zeta Potential showed us the difference in overall charge with respect to the type of silver nanoparticles, the best of which was -38.5 mV that of the hydrosoluble algal extract. The synthesized silver nanoparticles showed inhibitory activity against all tested human pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa* and *Enterobacter cloacae*) with the best results obtained in particular the sample of hydrosoluble silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aureginosa* compared to hydroethanolic and citrate silver nanoparticles This work showed us that the brown seaweed used contains biologically active compounds, which helped us to obtain these bio nanoparticles with strong antibacterial activity.

Keywords: Silver nanoparticles, Green synthesis, Bio nanoparticles, Antibacterial activity, Brown seaweed.



Introduction générale

Introduction générale

« Il y a plein de place en bas de l'échelle... lorsque nous aurons quelques contrôles sur l'arrangement des atomes à une petite échelle, nous découvrirons que la matière possède des propriétés énormément plus étendues et qu'avec, nous pourrons réaliser beaucoup plus de choses » par **(Feynman, 1960)**.

L'avènement des nanotechnologies, aujourd'hui, a montré que la manipulation de la matière à l'échelle atomique « Nanoparticules » fait partie du quotidien, elles ont fourni des contributions remarquables au domaine de la médecine clinique ainsi que dans d'autres domaines comme ; l'industrie, l'agroalimentaire, cosmétique etc **(Vance et al., 2015)** ; Cet intérêt n'a illustré que l'énorme défi lancé en 1960 par le prix Nobel de physique par Richard Feynman.

Et ces nanoparticules n'ont atteint le statut des efforts des recherches scientifiques qu'au début du 21ème siècle, alors que les scientifiques exploitent les propriétés uniques des assemblages atomiques et moléculaires construits à l'échelle du nanomètre **(Wennersten et al., 2008)**.

Leur synthèse est produite par diverses méthodes, les plus courantes étant les méthodes chimiques et physiques, alors que la synthèse de nanoparticules métalliques est convoitée au cours des trois dernières décennies, mais la recherche sur la biosynthèse des nanoparticules à base d'extraits de plantes **(Haggag & Mahmoud, 2018)** et d'extraits d'algues marines n'a proliféré qu'au cours de la dernière décennie **(Govindaraju et al., 2008)**.

Les nanoparticules d'argent représentent aujourd'hui un outil parfaitement adapté non seulement par leur synthèse aisée, biologique et économique mais aussi par leurs grandes capacités de fonctionnalisation de surface qui offrent aux chercheurs la capacité de les concevoir, de manipuler leurs propriétés physiques, chimiques et biologiques pour des applications médicales **(Kannan et al., 2013)**. Avec l'abus d'antibiotiques, la résistance bactérienne est devenue un problème mondial, surtout depuis les années 1980, et l'argent a recommencé à attirer l'attention avec le développement de la nanotechnologie au début de ce siècle **(Alexander JW, 2010)**.

Afin d'y remédier, des efforts ont été fournis pour améliorer les méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent qui sont souvent coûteuses et compliquées à mettre en place et

surtout nuisibles à l'environnement et d'en développer d'autres, notamment celles qu'on qualifie de vertes appelées biosynthèses et de réaliser une évaluation de leurs activités biologiques pour les utiliser à des fins thérapeutiques. Ce travail se divisera en quatre parties dont on trouve ;

- **Une première partie** qui portera essentiellement sur l'extraction hydro éthanolique et hydrosoluble des constituants d'une algue brune.
- **Une deuxième partie** qui est consacrée à la biosynthèse des nanoparticules d'argent à partir d'extrait hydrosoluble et hydro éthanolique de l'algue brune et une synthèse chimique utilisant le citrate de sodium.
- **Une troisième partie** qui consiste à la caractérisation des nanoparticules d'argent par (Spectroscopie UV-visible, Microscope électronique à balayage, spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, Diffusion dynamique de la lumière et Potentiel Zeta).
- Et enfin **une dernière partie** qui englobe les tests des activités biologiques de nos échantillons d'AgNPs.



Chapitre I :

Etude bibliographique

I. Etude bibliographique

I.1 Nanotechnologie

Le terme « nanotechnologie » quant à lui, dont le préfixe « nano » provient du grec νόμος « nain » et représente 10^{-9} dans le système international (soit un milliardième de mètre dans le système métrique, puisqu'ici le préfixe fait référence à la taille des particules), est attribuable à un Professeur de l'université de Tokyo. Il a par la suite été popularisé par Eric Drexler en 1986 dans son livre *Engines of creation* (**Badillo et al., 2012**).

La nanotechnologie est ainsi « reconnue comme la révolution technologique du XXI^{ème} siècle » (**Schummer, 2007**) avec ses applications prometteuses dans les domaines allant de la médecine en passant par l'informatique, la télécommunication aux sciences cognitives. Parce que, « plus un objet est petit, plus le rapport entre sa surface et son volume est élevé » (**Arnauld, 2011**) et en conséquence, les propriétés mécaniques, thermiques, optiques, électroniques ou magnétiques d'un matériau peuvent changer en raison de sa taille « nanométrique » (**ISO, 2015**).

On peut dire que la nanotechnologie nous permet « de manipuler de la matière à l'échelle nanométrique, à des dimensions d'environ 1 à 100 nanomètres (nm) » (figure 1) et de créer des structures atome par atome ou molécule par molécule (**Auplat et Delomarle, 2012**).

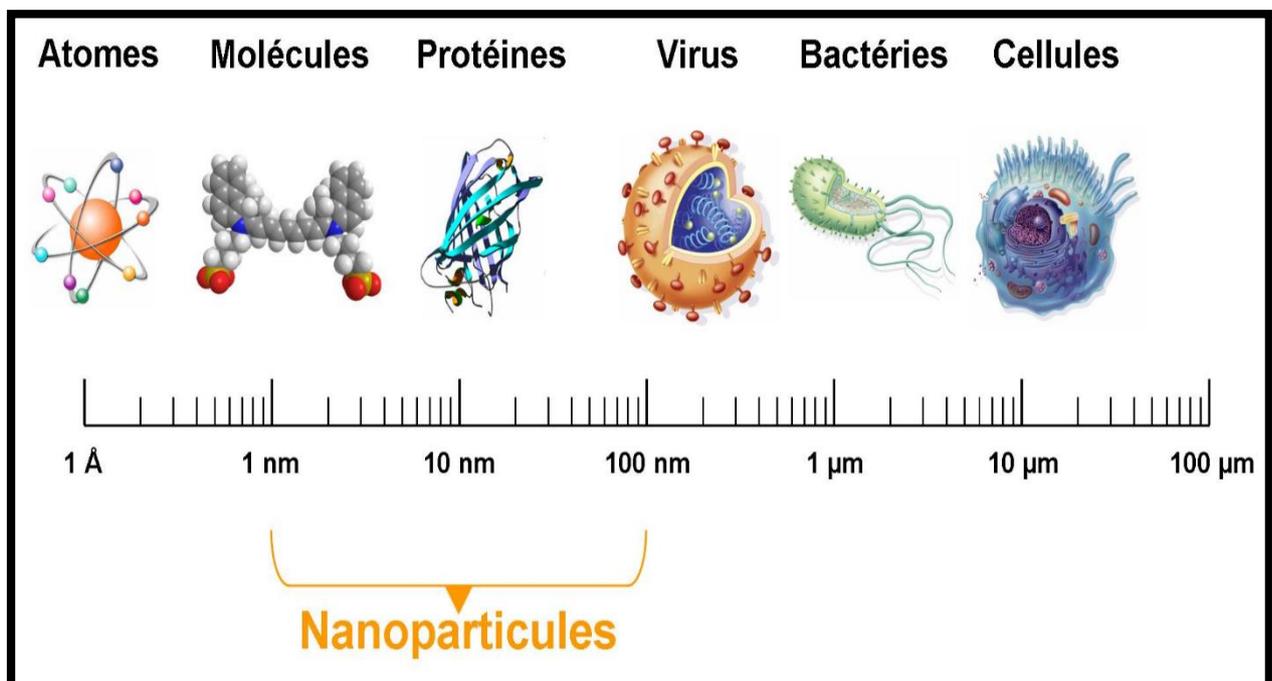


Figure 1: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques (**Belfennache, 2017**)

I.1.1 Nanomédecine ou Nanosanté

« Nouvelles frontières de la recherche en santé » (**Instituts de recherche en santé du Canada, 2006**), « médecine du futur » (**Freitas, 2009**), « futur des soins de santé » (**Che & Gill, 2000**), « nouvelle ère scientifique » (**Allhoff, 2009**), les expressions abondent pour qualifier la nouveauté et la spécificité de la nanomédecine. Cette dernière est généralement présentée comme une révolution médicale qui promet de transformer radicalement la médecine grâce aux nanotechnologies.

Ses effets sont censés toucher l'ensemble des champs d'intervention de la médecine, du diagnostic au traitement, incluant de nouveaux dispositifs de délivrance des médicaments (*drug delivery technologies*), de nouveaux modes d'intervention combinant le diagnostic et la thérapeutique (*le théranostic*) ou encore de nouvelles techniques d'ingénierie tissulaire (voir figure 2) (**Berger, 2009**).

La particularité de cette approche est de se développer en intégrant, sous la coupe du préfixe nano, les trois grands principes qui guident aujourd'hui la recherche biomédicale de pointe, soit la médecine prédictive, la médecine personnalisée et la médecine régénératrice (**Noury & Lafontaine, 2014**).

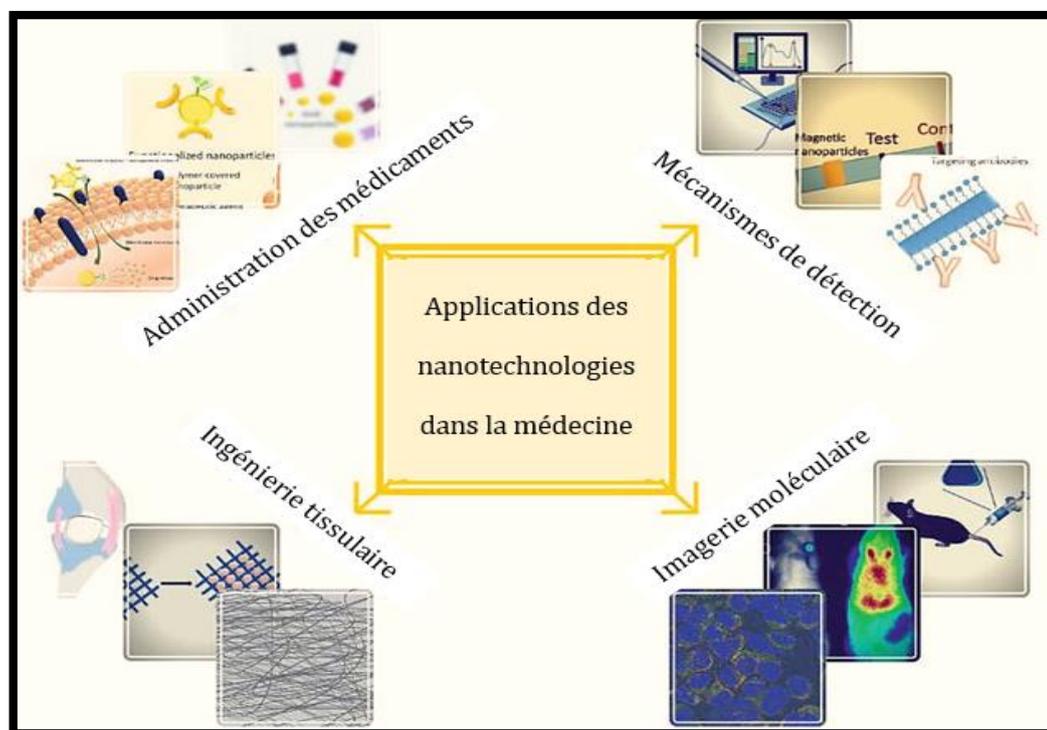


Figure 2 : Les applications des nanotechnologies dans la médecine (Anca et al., 2019)

I.1.2 Nanomatériaux

Ce sont des matériaux dont une, deux ou trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire approximativement entre 1 et 100 nm. Si les trois dimensions externes se situent à l'échelle nanométrique, on parle de nanoparticules (**Gaffet, 2008**).

Pour deux dimensions externes situées à l'échelle nanométrique, on parle de nanofibres, nanotubes, nanofilaments ou nano-bâtonnets ; Enfin pour une dimension externe située à l'échelle nanométrique, on parle plutôt de nano-feuillets, nano-films et nano-plaquettes (**Gaffet, 2011**).

Il existe deux grandes familles de nanomatériaux, comme le montre la figure 3 suivante :

- Les nano-objets ;
- Les matériaux nano-structurés (**Buzea et al., 2007 ; Ju-Nam & Lead, 2008 ; Pan & Xing, 2010**).

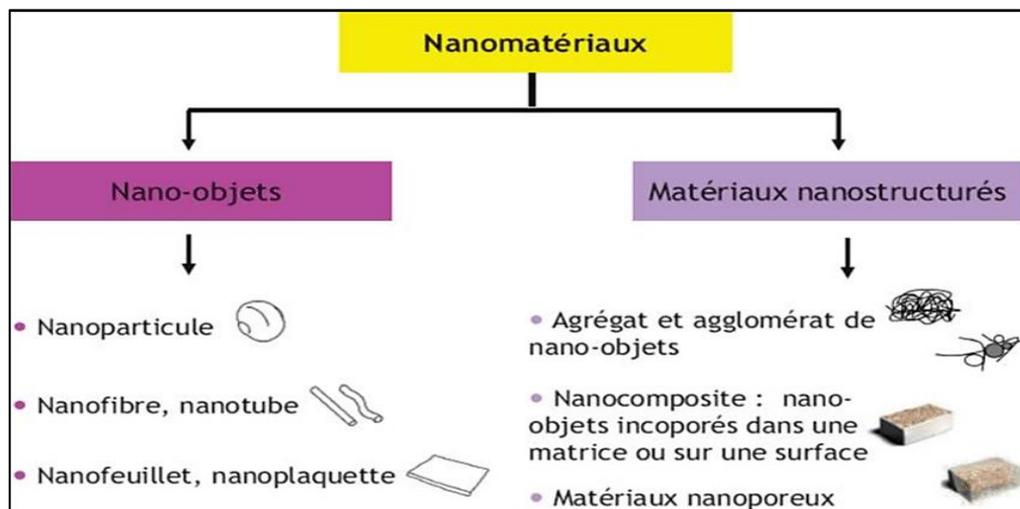


Figure 3 : Classification des nanomatériaux (Ricaud & Devel, 2014)

I.1.3 Nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont des agrégats de petites molécules de taille nanométrique (dimension entre 1 et 100 nm) constitués de quelques centaines à quelques milliers d'atomes.

La taille nanométrique augmente la surface de contact entre les matériaux, ce qui leur confère une plus grande réactivité (**Delay & Frimmel, 2012**).

Les nanoparticules (NPs) ne sont pas des simples molécules en soi et sont donc composées de trois couches :

- **La couche superficielle**, qui peut être fonctionnalisée avec une variété de petites molécules, d'ions métalliques, de tensioactifs et de polymères.

- **La couche de coque**, qui est un matériel chimiquement différent du noyau dans tous les aspects, etc.
- **Le noyau**, qui est essentiellement la partie centrale de la NP et désigne généralement la NP elle-même (Khan et al., 2017) ; De point de vue de la taille, les nanoparticules se situent sur l'échelle du monde vivant entre l'hélice d'ADN (3,4 nm) et un virus (100 nm) (Angélique et al., 2018).

A titre de comparaison les nanoparticules métalliques ne sont pas les seules nanoparticules existantes, y en a plusieurs types ex ; des nanoparticules naturelles, synthétiques, etc. (Figure 4).

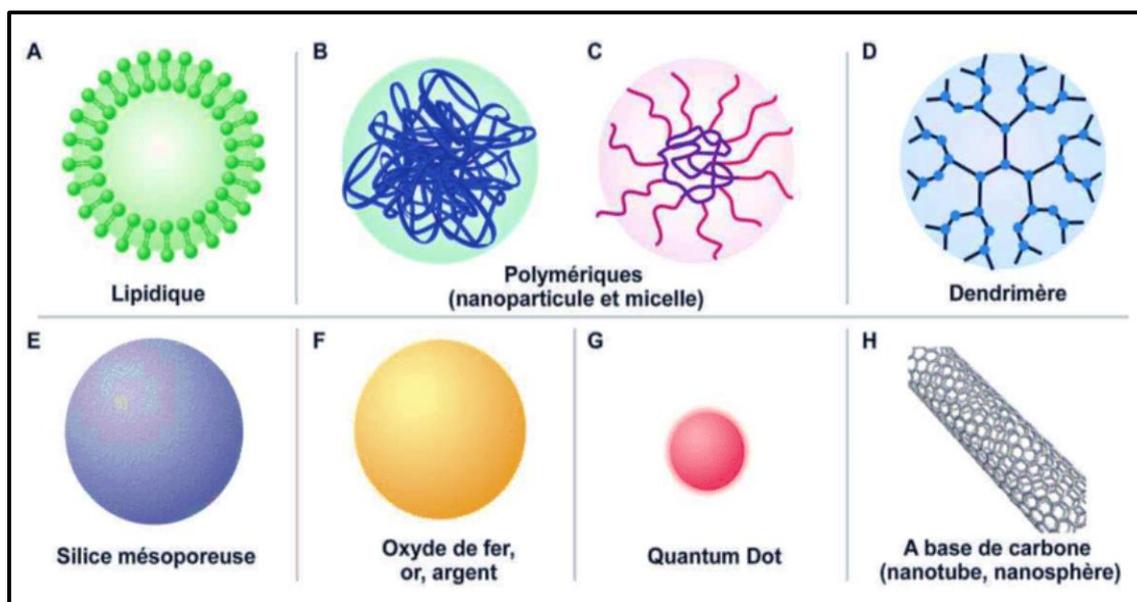


Figure 4 : Les différents types de nanoparticules (Pisani, 2017)

I.1.4 Caractéristiques des nanoparticules

Les Nanoparticules ont des caractéristiques très différentes de celles des atomes ou autres matériaux, elles leur sont spécifiques, et nous permettent de les classer. Les principales caractéristiques des nanoparticules sont :

- *La Taille :*

Elle joue un rôle très important dans la réactivité des particules. Par exemple, pour les atomes d'Arsenic avec les particules d'oxyde de fer ; plus le diamètre des particules est petit, plus leur capacité de rétention des atomes d'Arsenic sera forte (Canivet et al, 2015).

Grâce à leur petite taille nanométrique, les Nanoparticules ont la particularité d'avoir deux types de dispersion : **Monodispersion** « une seule et même taille » et **Polydispersion** « une gamme de plusieurs tailles plus ou moins importantes » (Ludivine, 2015).

- *La forme :*

Les nanoparticules sont caractérisées par leurs diverses formes (cubique, prismatique, bâtonnet ...etc.) tellement nombreuses qu'il est difficile de toutes les classer comme la figure 5 l'illustre.

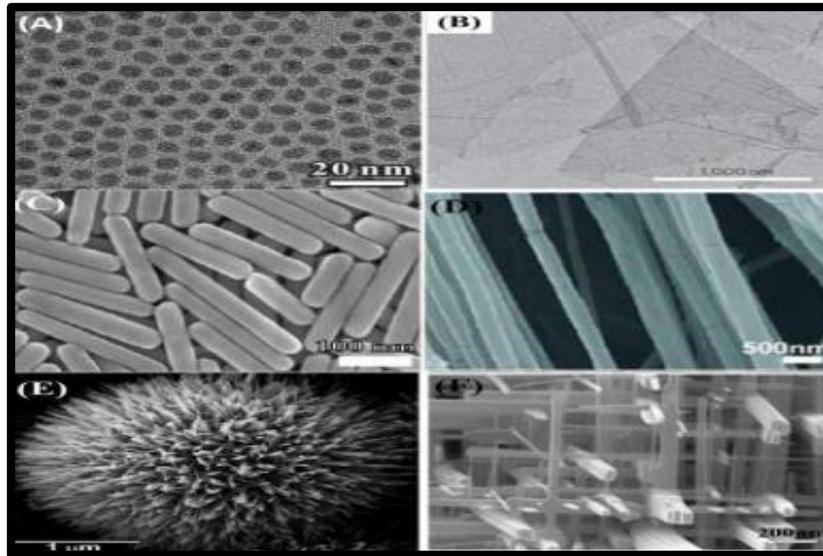


Figure 5 : Images par microscope électronique en transmission de différentes formes de nanoparticules A, B, C, D, E, F (Jeevanandam et al., 2018)

- *L'agrégation et l'agglomération :*

Grâce à leur surface particulière et selon le milieu dans lequel elles se trouvent, les Nanoparticules peuvent se présenter sous trois formes (figure 6) :

- Nanoparticules primaires ;** ce sont des nano-objets qui se présentent sous forme individuelle.
- Agglomérats :** ce sont des liaisons de nanoparticules primaires par des liaisons très faibles telles que les liaisons de Van Der Waals.
- Agrégats :** ce sont des liaisons des nanoparticules primaires par des liaisons chimiques très fortes telles que les liaisons de covalence (LNE. FAQ, 2017).

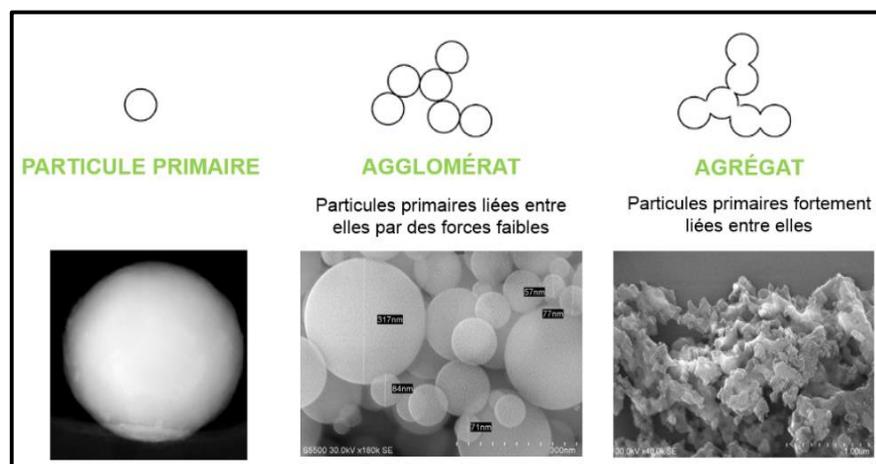


Figure 6 : Les 3 différentes formes des nanoparticules (<https://www.nanosafety-platform.com>)

▪ *La surface spécifique :*

On entend par « surface spécifique » la surface réelle totale d'une particule par unité de masse de produit par rapport à sa taille apparente. La particularité de la surface d'une nanoparticule réside dans le fait que la plupart de ces atomes se trouvent sur la surface ce qui va conférer à la nanoparticule sa propriété de réactivité avec le milieu où elle se présente (**Comité de la prévention et de la précaution, 2006**).

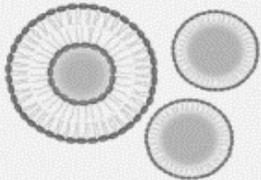
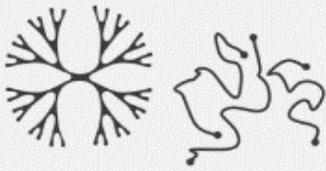
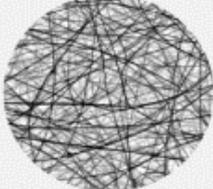
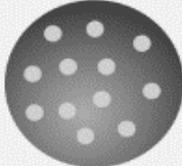
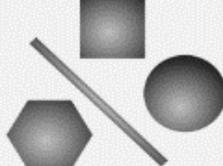
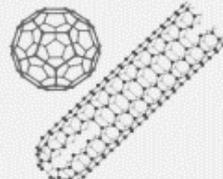
Grâce à cette caractéristique, plus la surface spécifique augmente, plus la taille des particules va diminuer, donc, plus leur réactivité chimique et biologique va augmenter.

Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser les NPs. Il est grandement recommandé d'utiliser plus d'une technique à la fois pour établir ces mesures.

I.1.5 Applications des nanoparticules

Les nanoparticules possèdent plusieurs applications, le tableau suivant donne quelques exemples de ces applications en biologie et en médecine en fonction de types des nanoparticules ; organique et inorganique chacune d'elles comprend des propriétés qui lui sont utiles ...

Tableau 1 : Composition des nano-objets utilisés en biologie et médecine et leurs principales applications (Santelli, 2018)

Organique	Phospholipides	Polymères	Assemblages
	<ul style="list-style-type: none"> • Liposomes • Micelles  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Encapsulation de drogues ▶ Imagerie 	<ul style="list-style-type: none"> • Dendrimères • Polymères linéaires  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Transport de drogues ▶ Imagerie 	<ul style="list-style-type: none"> • Fibres • Matrices  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Reconstruction tissulaire
	Nanosphères	Nanoparticules	Carbones
<ul style="list-style-type: none"> • Nanoparticules mésoporeuses  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Encapsulation de drogues 	<ul style="list-style-type: none"> • Métaux nobles • Semi-conducteurs • Métaux de transition • Lanthanides  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Imagerie ▶ Thérapie par ondes électromagnétiques ▶ senseurs et détecteurs 	<ul style="list-style-type: none"> • Fullerenes • Nanotubes de carbone  <ul style="list-style-type: none"> ▶ Imagerie ▶ Encapsulation de drogues ▶ Hyperthermie ▶ Reconstruction tissulaire 	
Inorganique			

I.2 Nanoparticules d'argent

L'argent est un métal gris blanc, de masse atomique 107,87 g/mol. Il est solide à température ambiante. Sa densité est de 10,5 et son point de fusion est de 960 °C. Il s'oxyde peu. Il est ductile, malléable et bon conducteur thermique et électrique, (**Gordon Pedersen & Bryan Frank, 2013**), Ce métal est utilisé depuis des siècles dans le traitement des plaies et des brûlures. Avec l'avènement actuel des nanotechnologies, l'engouement pour les nanoparticules d'argent (AgNPs) et leur pouvoir antibactérien s'est accru.

Les nanoparticules d'argent (AgNPs) sont de fines particules d'argent métallique connues sous le nom d'argent colloïdal depuis plus de 100 ans, peuvent être de différentes formes (sphères, tiges, fils, triangles) (**Reidy et al., 2013**).

I.2.1 Propriétés des nanoparticules d'argent

I.2.1.1 Propriétés physiques

L'argent est un métal noble qui a une conductivité électrique élevée, une stabilité thermique et stabilité à la chaleur ainsi que d'autres propriétés spéciales (voir Tableau 2)

Les nanoparticules d'argent ont des propriétés uniques en raison de leur petite taille quels que soient leurs constituants chimiques, ils ont des rapports surface/volume extrêmement élevés. Ainsi, de nombreuses propriétés physiques des nanoparticules telles que la solubilité et la stabilité sont dominées par la nature de la surface des nanoparticules (**Ranganayaki et al., 2017**).

Tableau 2 : Propriétés physiques de l'argent (Ranganayaki et al, 2017)

Numéro atomique	Poids / masse atomique	État standard	Numéro de groupe	Classe	Point de fusion	Point d'ébullition	spécifique la gravité
47	107.8682 amu	solide à 298 degrés Kelvin	11	Métal, Transition	961.93° C	2212.0°C.	10.50 (20 ° C).

I.2.1.2 Structure chimique

Les cations d'argent peuvent être complexés avec divers ligands organiques, et même si des cations d'argent sont toujours présents dans la molécule, la charge globale du complexe peut être connue, car ils ne se dissocient pas dans les solutions ou les liquides biologiques (figure 07) (**More S. B et al, 2018**).

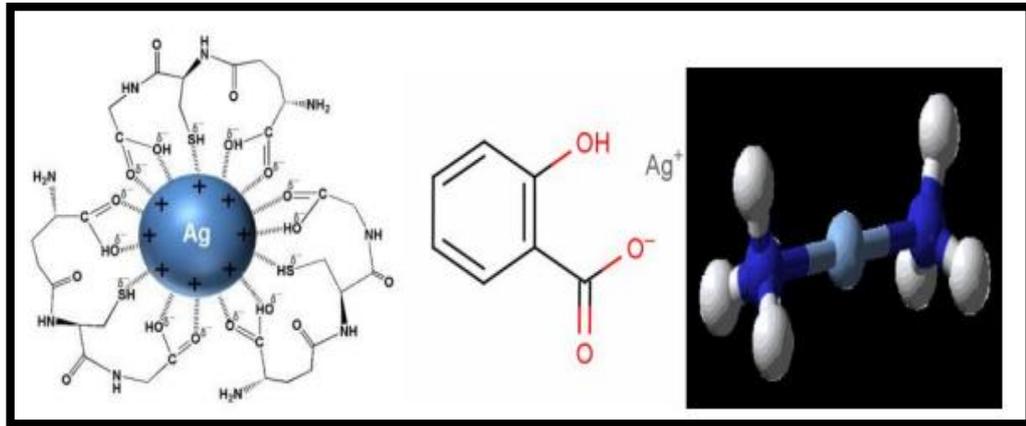


Figure 7 : Structure chimique d'argent (Ranganayaki et al., 2017)

I.2.1.3 Propriétés optiques

On s'intéresse de plus en plus à l'utilisation des propriétés optiques de nanoparticules d'argent comme composant fonctionnel dans divers produits et capteurs.

Les propriétés optiques d'une nanoparticule métallique dépendent principalement sur sa résonance plasmon de surface, où le plasmon fait référence à l'oscillation collective des électrons libres dans la nanoparticule métallique (figure 8). Il est bien connu que les pics de résonance plasmon et les largeurs de ligne sont sensibles à la taille, la forme de la nanoparticule, les espèces métalliques et le milieu environnant (Berciaud et al., 2005 ; El-Sayed, 2001).

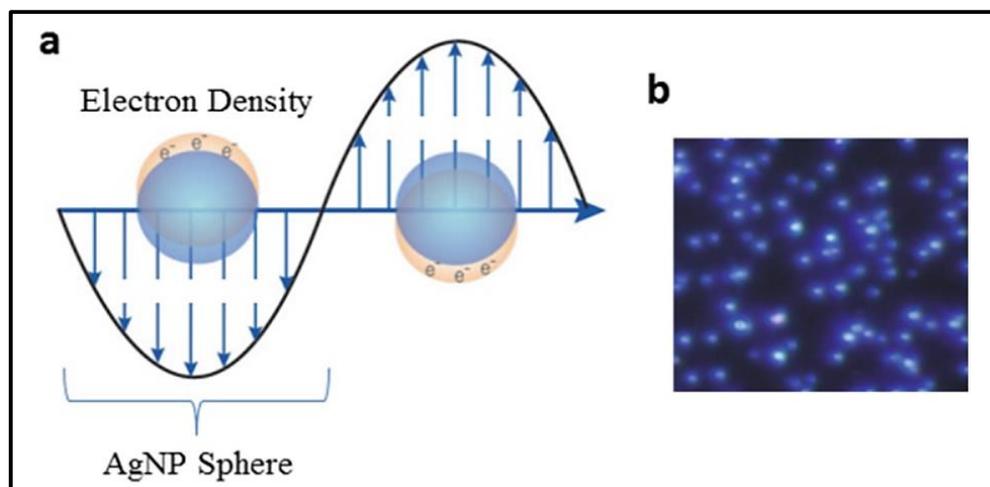


Figure 8 : a) Résonance plasmonique de surface (SPR) pour les AgNPs à une longueur d'onde spécifique ; b) Image de microscopie en champ noir des AgNPs (Yusuf.M, 2019)

I.2.2 Méthodes d'élaboration des nanoparticules d'argent

I.2.2.1 Approches utilisées

La synthèse de nanoparticules d'argent est réalisée par deux approches :

- a) L'approche « ascendante » bottom-up, consiste à assembler des composants élémentaires (atomes, molécules, agrégats) pour fabriquer des structures plus complexes.
- b) L'approche « descendante » top-down, consiste à miniaturiser des objets déjà existants de taille micro ou macrométrique pour se rapprocher des dimensions nanométriques (**Djighboub, 2010**).

Quelle que soit l'approche adoptée, les méthodes de synthèses sont subdivisées en deux grandes catégories ainsi qu'une troisième qui est récente :

I.2.2.2 Méthodes de synthèse utilisées

- **Physique**

Les méthodes physiques les plus importantes pour la synthèse des nanoparticules d'argent sont : l'évaporation-condensation, l'ablation laser, l'irradiation électrique, l'irradiation gamma et la lithographie, etc (voir figure 9) (**Güzel & Erdal, 2017**).

- **Chimique**

L'approche la plus courante pour la synthèse des NP d'argent est la réduction chimique par des agents réducteurs organiques et inorganiques.

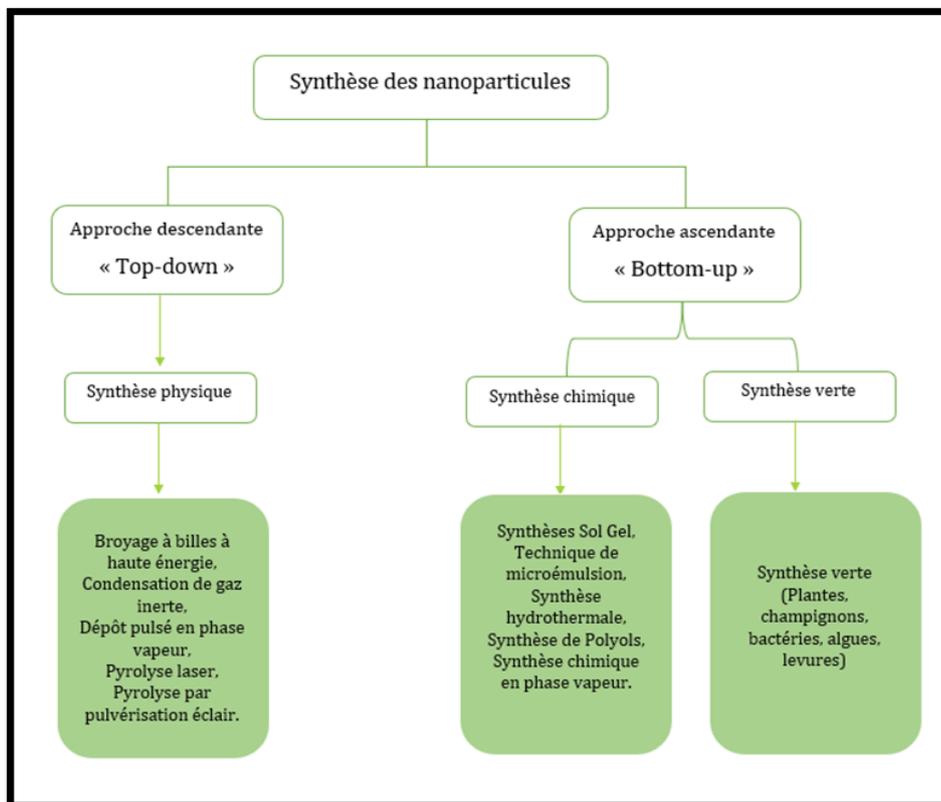
En général, différents agents réducteurs tels que le citrate de sodium, l'ascorbate, le borohydrure de sodium (NaBH_4), l'hydrogène élémentaire, le procédé polyol, le réactif de Tollens, le N, N-diméthylformamide (DMF) et les copolymères séquencés de poly (éthylène glycol) sont utilisés pour la réduction d'ions argent (Ag^+) dans des solutions aqueuses ou non aqueuses (voir figure 09) (**Wiley B et al., 2005 et Evanoff & Chumanov, 2004**).

- **Biologique (verte)**

Elle consiste en la production des nanoparticules à l'aide d'entités biologiques telles que les micro-organismes, les extraits ou les biomasses de plantes (feuilles, fleurs, écorces, graines, etc.) (voir figure 09 et Tableau 03) et les enzymes et pourrait être une suppléante des méthodes chimiques et physiques dans le cadre du respect d'environnement.

Tableau 3 : Principaux réducteurs et stabilisants biologiques des nanoparticules (Beldjilali & Zenasni, 2017)

Réducteur	Agent stabilisant	Morphologie et tailles des particules
Peptide	Peptide	Nanohexagones, nanosphères et nanotriangles
Plantes du luzerne	Tissus de luzerne	Nanosphères et nanofils
Feuille de Géranium	Protéines ou enzymes	Nanosphères et nanotiges
Souche de levure	Protéines	Nanosphères 2-5 nm
Champignon	Protéines ou enzymes	Nanosphères 5-15 nm
Feuille de Neem	Flavanones, Terpènes	Nanosphères 5-35 nm

**Figure 9 : Représentation schématique des différentes méthodes de synthèse des AgNPs (Dhand ,2015)**

La méthode de synthèse biologique est préférée sur les deux autres, car elle offre de nombreux avantages comme le montre le tableau 4, non seulement du point de vue écologique, mais aussi pour sa compatibilité à des applications pharmaceutiques et biomédicales.

Tableau 4 : les avantages et les inconvénients de différentes techniques de la synthèse des AgNPs (Arshad., 2017)

Technique	Avantages	Inconvénients	Produits chimiques / micro-organismes utilisés
Physique	La production en une seule étape, précurseurs et potentiel de production à grande échelle avec des rendements élevés	Jointure ferme, déconcertée dans les données et la note d'efficacité étant des NPs Fournit l'expansion cristalline, synthèse des particules	
Chimique	Monodispersité élevée (5–15%)	Coûteux d'esprit faible en figure et sortie par conséquent réclamation de produits chimiques mortels Remarque environnemental facile à traiter résolution de NP Gérer le développement des cristaux, synthèse des particules faible rendement	Agents réducteurs, tels que le méthoxy polyéthylène glycol, le borohydrure de sodium, le bitartrate de potassium, l'hydrazine Des agents stabilisants tels que la polyvinylpyrrolidone, le dodécyl benzyl sulfate de sodium.
Biologique	Faible monodispersité (~ 40–50%), respectueux de l'environnement	Il est difficile de déterminer les composants réactifs des plantes car les extraits de plantes contiennent de nombreux composés organiques. Pas économique car la culture des bactéries est fastidieuse.le processus de réduction est également lent, allant d'une heure à plusieurs jours	Levures, bactéries, champignons, algues, plantes, virus et actinomycètes

Cela est lié au fait qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits chimiques toxiques lors du processus de synthèse. En outre, l'utilisation d'extraits de végétaux est potentiellement bénéfique que les microorganismes en raison de la facilité d'amélioration et le processus laborieux de conservation des cultures cellulaires, selon les besoins du processus de microorganismes (Ahmed *et al.*, 2016).

I.2.3 Mécanisme de formation dans la synthèse verte des AgNPs

Les nanoparticules sont synthétisées à la fois par l'utilisation des plantes, des microorganismes et des organismes marins (voir figure 10), plusieurs chercheurs ont proposé diverses approches mécanistes pour comprendre la voie cachée derrière la synthèse verte des AgNPs.

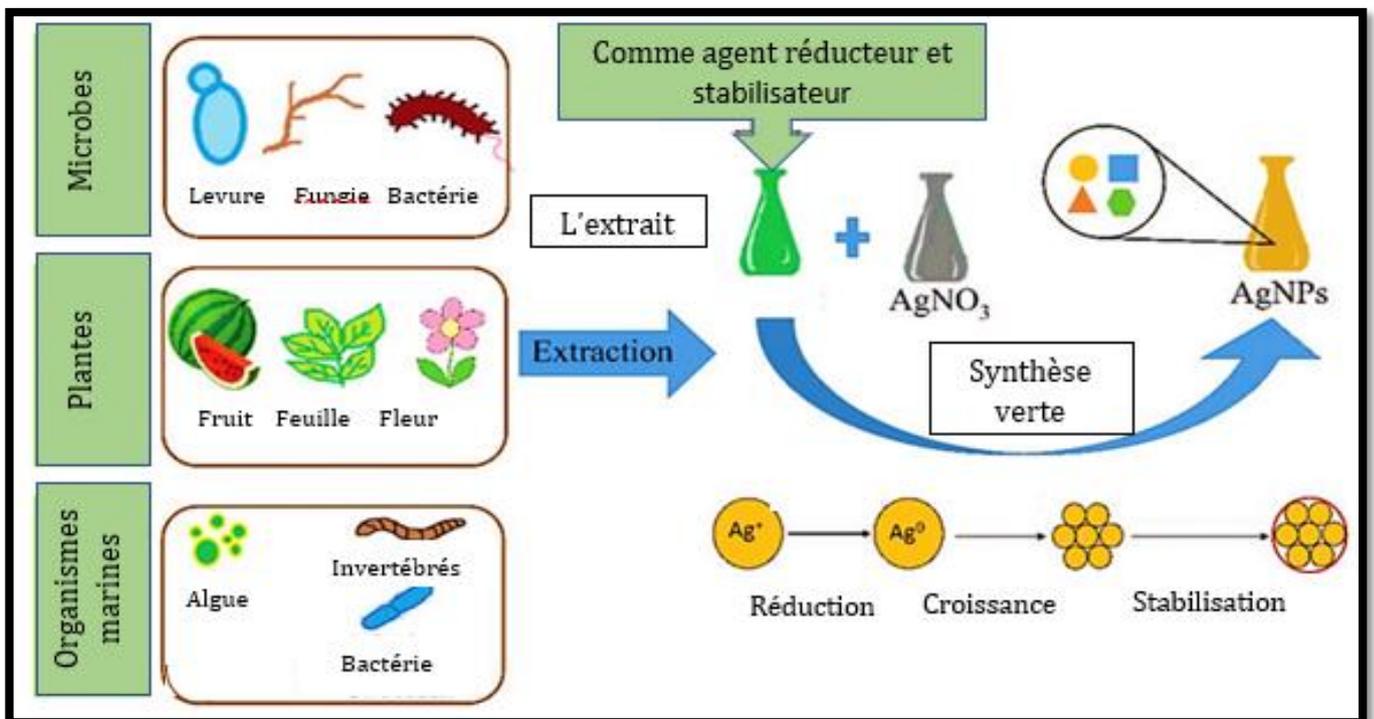


Figure 10 : Schéma représentatif de la synthèse des nanoparticules d'argent par voie biologique (Rosman *et al.*, 2021)

Le mécanisme préliminaire implique l'accumulation de nanoparticules après la réduction de l'ion métallique et le processus de réduction est médié par certains agents réducteurs ou implique certaines enzymes qui sont liées à la paroi cellulaire. Kesharwani *et al* (2009) ont démontré que lors de la synthèse verte des AgNPs, lorsque l'extrait de feuille est ajouté à l'AgNO₃ aqueux, l'ionisation se déroule comme suit :



Les parties des plantes comme les racines, la tige, les graines et les feuilles sont principalement utilisées pour la synthèse des AgNPs. Le point intéressant est l'agent actif, présent dans ces parties (Muhammad *et al.*, 2016).

La bio-réduction de l'Ag a été postulée comme piégeant des ions Ag^+ à la surface des protéines en raison des interactions électrostatiques entre ces deux dans l'extrait de matériel végétal. Les protéines réduisent les ions Ag^+ , entraînant leur changement de structure secondaire et la formation de noyaux d'argent qui se développent successivement par la réduction supplémentaire des ions Ag^+ et leur accumulation au niveau des noyaux conduisant à la formation des AgNPs (**Rajeshkumar & Bharath, 2017**).

Bien que le mécanisme exact impliqué dans la production d'AgNPs par les plantes ne soit pas entièrement déchiffré. On pense que les biomolécules sont directement impliquées dans la réduction des ions et la formation des AgNPs (**Jha et al., 2009**).

I.3 Nanoparticules d'argent et applications biomédicales

Les nanotechnologies offrent la possibilité de modifier la taille, la charge de surface ainsi que les groupements fonctionnels de molécules à usage thérapeutique (**Chen X & Mao SS, 2007**).

Ces possibilités semblent illimitées (**Papakostas et al., 2011**) ; Les modifications de surface apportées aux nanoparticules dépendent de l'application potentielle envisagée en biomédecine, tels que : l'élaboration de traitements plus sûrs et la possibilité de ciblage thérapeutique font des applications prometteuses en cancérologie ou en dermatologie par exemple.

I.3.1 Modification de surface et/ou fonctionnalisation des AgNPs

Les propriétés et les effets biologiques des AgNPs sont fortement liés aux caractéristiques physico-chimiques : la taille, la charge de surface, le rapport hydrophilie / hydrophobie, la forme, la composition chimique. Afin de bénéficier pleinement des propriétés des AgNPs, celles-ci sont généralement modifiées en surface (**Petros & De Simone, 2010**). La fonctionnalisation vise à améliorer la stabilité des AgNPs en suspension, à limiter la toxicité des AgNPs (**Wang et al., 2014**), ou encore à la formation de la couronne de protéines, l'internalisation cellulaire et à modifier leur bio distribution (**Gary-Bobo et al., 2013**), par ciblage actif ou passif.

- **Amélioration de la stabilité en solution colloïdale**

La fonctionnalisation des nanoparticules par des polymères augmente leur stabilité en solution colloïdale et leur biodisponibilité. De ce fait, il est possible de recouvrir la particule d'un produit chimique comme le polyéthylène glycol (PEG) ou le procédé polyol afin

d'augmenter la stabilité et le temps de présence de la molécule dans la circulation sanguine (**Papakostas et al., 2011**).

- **Ciblage thérapeutique**

Les applications possibles de la fonctionnalisation des nanoparticules dans le domaine médical sont par conséquent très étendues. Pour exemples, des particules poreuses renfermant des molécules à usage thérapeutique permettent de livrer des médicaments de façon sélective à certains organes (**Morris, 2012**). La surface des nanoparticules peut également être utilisée comme plateforme de fixation de ligands.

- **Prévention de l'opsonisation**

La modification de surface des nanoparticules contribue également à prévenir leur opsonisation. L'opsonisation est un processus immunologique qui permet de recouvrir la molécule d'anticorps spécifiques (opsonine) afin d'induire sa phagocytose. Les opsonines sont donc des anticorps et certaines fractions du complément (groupe de protéines présentes dans le sérum sanguin) se liant aux antigènes de surface du corps étranger (**Papakostas et al., 2011**).

- **Fonctionnalisation par un agent fluorescent pour l'imagerie**

La fonctionnalisation des produits de contraste nano-particulaires par des agents fluorescents offre la possibilité d'une meilleure capacité de détection en imagerie médicale. Une large palette d'agents de contraste, de sondes fluorescentes et de radio-traceurs propose un éventail important d'opportunités pour l'imagerie du vivant et le développement d'approches diagnostiques (**Michalet et al., 2005**).

I.3.2 Applications biomédicales

- **AgNPs et Activité antimicrobienne**

Les nanoparticules d'argent sont bien connues pour avoir des propriétés antimicrobiennes (**Marambio & Hoek, 2010 ; Zheng et al., 2018**) et heureusement semblent être des agents antimicrobiens puissants et efficaces par rapport aux autres nanomatériaux de métaux nobles, en raison de leurs caractéristiques comme un grand rapport surface/volume (**Morones et al., 2005**), toxicité (**Morones et al., 2005 ; Navarro et al., 2008 ; Kruszewski et al., 2011 ; Beer et al., 2012**), interaction possible avec les composés soufrés et phosphorés présents dans les cellules qui est l'élément clé de sa propriété antibactérienne les AgNPs réagissent avec les protéines contenant du soufre à l'intérieur ou à l'extérieur de la membrane cellulaire, ce qui affecte à son tour la viabilité cellulaire (**Hamouda et al., 2000 ; Morones et al., 2005 ; Yin et al., 2013**) (voir la figure 11), caractéristiques cristallographie, etc., qui leur

permettent d'être des agents utiles pour traiter diverses maladies infectieuses microbiennes et peut également servir comme agents utiles pour surmonter la résistance microbienne contre les médicaments conventionnels, utilisés seuls ou en conjugaison avec des formulations thérapeutiques antimicrobiennes (Morones *et al.*, 2005 ; Khatoun *et al.*, 2019).

Par contre, elles sont relativement non toxiques pour les cellules humaines et animales et ont une probabilité beaucoup moindre de provoquer une résistance bactérienne que les antibiotiques (Li *et al.*, 2016).

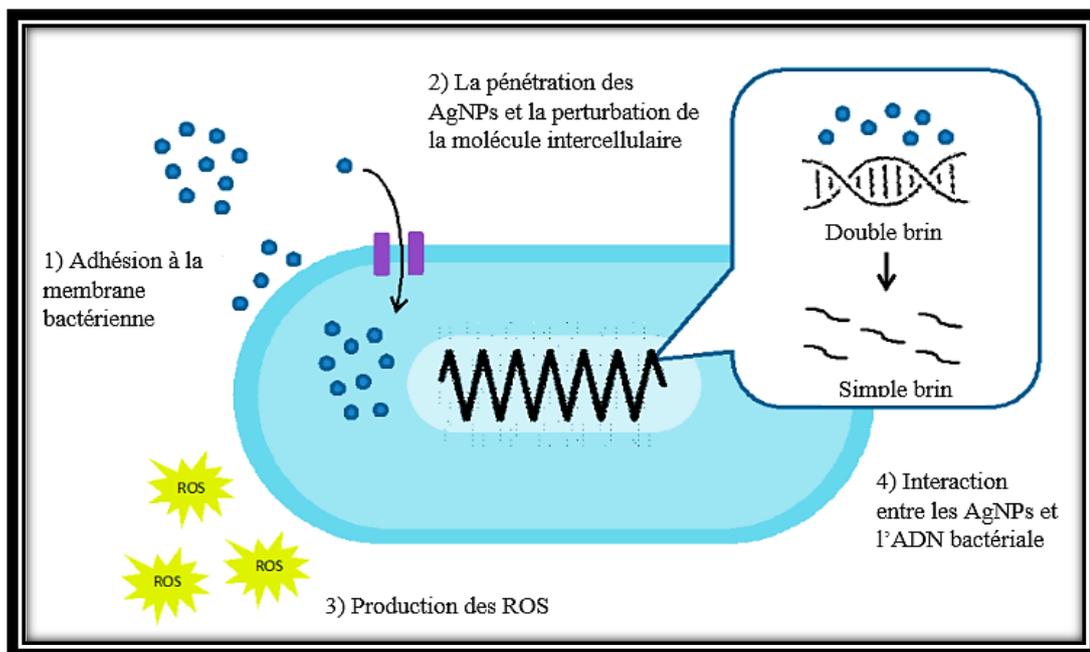


Figure 11 : Schéma représentatif de mécanisme d'action des AgNPs dans les bactéries (Salleh *et al.*, 2020)

▪ AgNPs et Activité anticancéreuse

Nanomatériaux à base d'oxydes métalliques (Martinez-Boubeta *et al.*, 2013 ; Zhou *et al.*, 2014 ; Vinardell & Mitjans, 2015) et des nanoparticules métalliques (Conde *et al.*, 2012 ; Sharma *et al.*, 2015) ont été particulièrement efficaces comme agents anticancéreux. Conjugués de nanomatériaux avec anticancéreux chimiothérapeutiques : doxorubicine (Kievit *et al.*, 2011), fluorouracile (Ashwanikumar *et al.*, 2014), méthotrexate, (Wu *et al.*, 2014), etc. ; biopolymères (Carvalho *et al.*, 2019) ; marées de pep (Yeh *et al.*, 2016) ; acides nucléiques (Guo *et al.*, 2016) ; acide folique (Boca-Farcau *et al.*, 2014) et ainsi de suite, ont créé une synergie approche du traitement du cancer. Les nanoparticules d'argent et les nano-composites sont très impliqués dans la liste de la recherche scientifique et la littérature pour avoir des propriétés anticancéreuses (El-Naggar *et al.*, 2017 ; Yuan *et al.*, 2017).

I.3.3 Toxicité des nanoparticules d'argent

Différentes études et rapports suggèrent que le nano-argent peut également avoir des effets néfastes sur la santé humaine que sur l'environnement. Dans les déchets industriels, des tonnes d'argent sont évacuées dans la nature, provoquant ainsi une toxicité dans l'environnement.

Les ions d'argent libres ont des effets néfastes ou nocifs sur les humains et tous êtres vivants, y compris la décoloration permanente gris bleuâtre de la peau (argyrie) ou des yeux (argyrose), et l'exposition à des composés d'argent solubles peut produire des effets toxiques comme les lésions hépatiques et rénales ; les irritations des yeux, de la peau, des voies respiratoires et intestinales et des modifications significatives dans les cellules sanguines. De nombreux rapports suggèrent que le nano-argent ne peut pas faire la différence entre microbes nuisibles ou utiles à l'écologie (**Prabhu et al ,2012**).

Chapitre II :

Matériel & Méthodes

II. Matériel et méthodes

Notre stage expérimental porte sur l'élaboration et la caractérisation des nanoparticules d'argent vers des applications biomédicales. Il s'est réalisé pendant trois mois au niveau du laboratoire : Biomolécules et Effets Thérapeutiques au niveau du Centre de Recherche et d'Analyses Physico-Chimiques CRAPC de Bousmail (TIPAZA).

Ce chapitre se compose de trois parties ; la première est une description du matériel utilisé, la seconde représente l'extraction et la synthèse des nanoparticules. Dans la troisième partie, nous avons présenté le test antibactérien ainsi que les techniques de caractérisation de ses nano-objets (UV-Vis, FTIR, MEB, DLS et Potentiel Zeta) pour examiner l'aspect morphologique, la disposition des nanoparticules, la taille et la chimie de surface ...etc.

II.1 Matériel

II.1.1 Matériel non biologique

Le tableau ci-dessous récapitule l'ensemble des produits chimiques utilisés au cours de ce travail et qui nous ont été aimablement fournis par le Centre de Recherche et d'Analyses Physico-Chimiques CRAPC de Bousmail.

Tableau 5 : Représentation du matériel non biologique utilisé dans la partie expérimentale

<i>Produit</i>	<i>Formule chimique</i>	<i>Masse molaire</i>	<i>Fournisseur</i>	<i>Caractéristiques</i>
<i>Nitrate d'argent</i>	AgNO ₃	169,87 g/mol	R.P.NORMAPUR	Soluble dans l'eau
<i>Ethanol</i>	C ₂ H ₅ OH	46,07 g/mol	Panreac	Soluble dans l'eau
<i>Citrate de sodium</i>	Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	258,06 g/mol	BIOCHEM	Soluble dans l'eau
<i>Hydroxyde de sodium</i>	NaOH	39,997g/mol	SIGMA	Soluble dans l'eau, l'éthanol, méthanol...

II.1.2 Matériel biologique

II.1.2.1 L'algue brune

L'algue brune est également appelée « chromophyte », jamais unicellulaire, à appareil végétatif souvent complexe et de dimensions très variables, elle possède toute une structure pluricellulaire, sa couleur est brunâtre (figure 12) est due à l'abondance de la xanthophylle et de la fucoxanthine, qui domine les autres pigments comme la chlorophylle a et c, ainsi que le β -carotène (**Garon-lardiere, 2004**).

Des études ont montré que les composés phénoliques retrouvés dans l'algue possèdent la capacité d'inhiber la croissance de différents microorganismes pathogènes. Des extraits obtenus à partir de certaines espèces d'algues ont été testés contre des bactéries pathogènes et ont montré une activité antibactérienne remarquable (**Jimenez-Lopez et al., 2020**).



Figure 12 : Images prises de différentes algues brunes (<https://www.guidedesespeces.org>)

La poudre d'algue brune qu'on a utilisé dans ce travail a été obtenue après récolte et traitement de cette algue en commençant par : un lavage par l'eau de mer puis un rinçage avec de l'eau distillée, ensuite un séchage à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 72h ainsi qu'un broyage. La poudre est extrêmement fine, de couleur brune et d'aspect sableux, elle nous a été aimablement fourni par (**Mr. Bouhenna**) au niveau du laboratoire de Biomolécules et Effets Thérapeutiques.

II.1.2.2 Les souches bactériennes

Les cultures standard pour les tests antibactériens ont été obtenues auprès de American Type Culture Collection (ATCC), qui nous ont été aimablement fournis par le centre de

recherche et d'analyses physico-chimiques CRAPC de Bousmail. Ceux-ci incluent les Gram positif + (*Staphylococcus aureus*) et Gram négatif - (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*).

II .2 Méthodes

II.2.1 Préparation d'extrait hydro éthanolique et hydrosoluble d'une algue brune

- *L'extrait hydrosoluble (HS)*

L'extrait hydrosoluble a été préparé en mettant 20 g de biomasse végétale dans 200 ml d'eau distillée, ce mélange a subi une agitation ainsi qu'un chauffage à 40° C à l'aide d'une plaque chauffante pendant 24h, et une filtration à l'aide d'un dispositif pour finalement obtenir un extrait pur et clair (Mollick et al., 2015).

- *L'extrait hydroéthanolique (HE)*

L'extrait hydro éthanolique a été préparé en mettant 20 g de biomasse végétale dans 200 ml d'éthanol 70°. Le tout a subi une agitation pendant 24h, et une filtration de la même manière que l'extrait hydrosoluble.

II.2.2 Biosynthèse des nanoparticules d'argent

50 ml d'extrait (**hydrosoluble ou hydro éthanolique**) ont été ajoutés à 950 ml de solution de nitrate d'argent (1mM) ; Le mélange réactionnel a été maintenu sous agitation à 40 °C, 400 rpm pendant 24h. Le changement de couleur de la solution de nitrate d'argent indique la formation d'AgNPs (Mollick et al., 2015).

Après la synthèse des AgNPs, la solution contenant des nanoparticules a été centrifugée à 3500 tr / 30 min pour récupérer les AgNPs, le culot a été lavé quatre fois par de l'eau distillée pour éliminer les impuretés et obtenir des AgNPs pure. Ces dernières ont été mises dans une étuve pour le séchage pendant 48h.

II.2.3 Synthèse chimique des nanoparticules d'argent

En premier lieu, deux solutions incolores d'AgNO₃ et de citrate de sodium ont été préparées en parallèle. En second la solution d'AgNO₃ est mise sous agitation et un pH mètre a été utilisé pour stabiliser le pH de la solution à 10 en ajoutant une solution de NaOH à 0.1 N. Puis, un volume de 10 ml de citrate de sodium a été ajouté à la solution d'AgNO₃ (1mM), la solution est donc mise sous agitation à 80 °C, 600 rpm pendant 120min ; le changement de couleur de la solution indique la formation des AgNPs.

Après la synthèse des nanoparticules d'argent par voie chimique, la solution a été centrifugée à 5500 tr/min pendant 20 min pour séparer le AgNPs, puis elle a subi quatre lavages avec de l'eau distillée, ces dernières ont été mises en étuve pour le séchage pendant 48h (Mousavi-Khattat *et al.*, 2018).

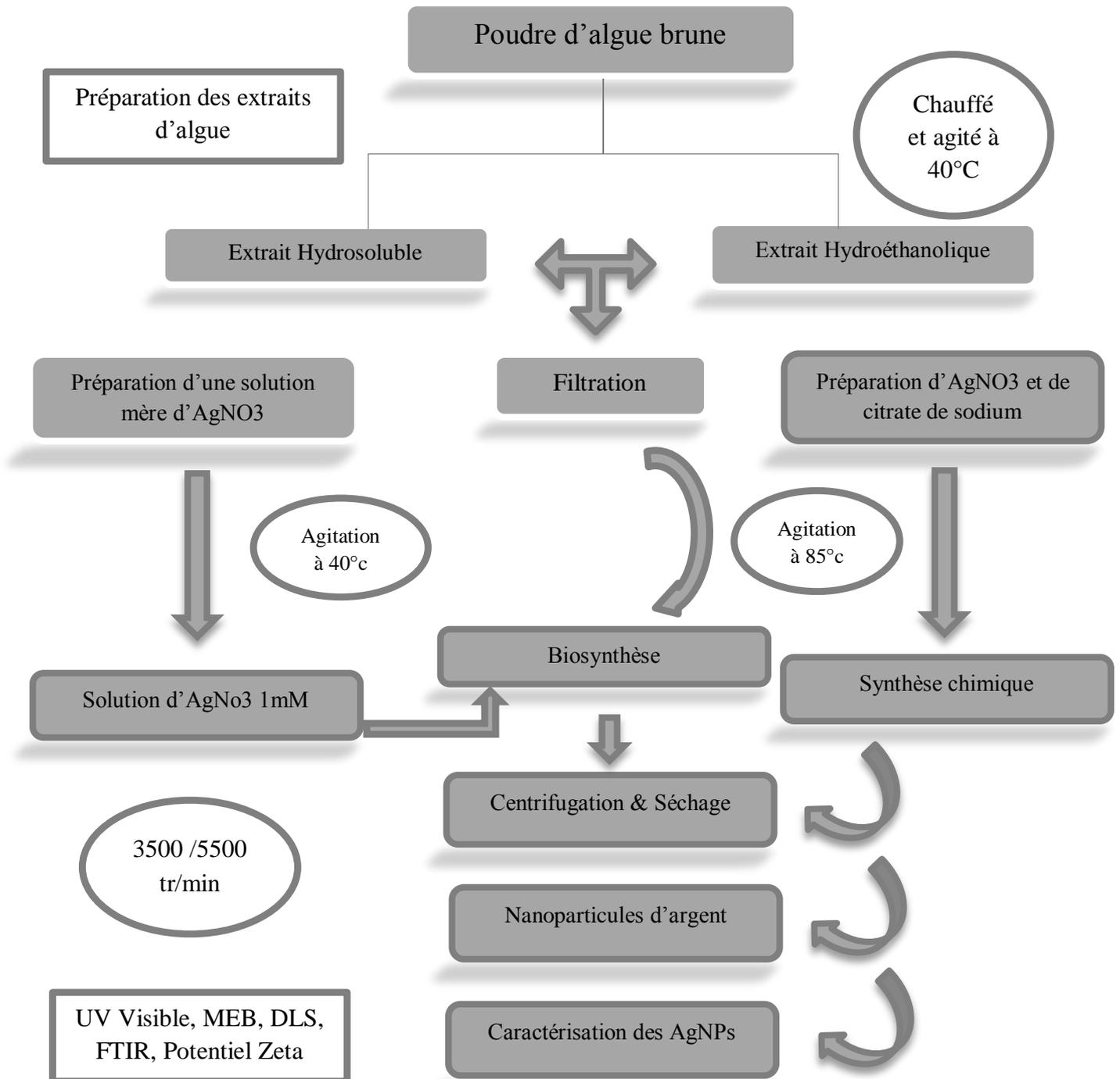


Figure 13 : L'organigramme récapitulatif de la préparation des nanoparticules d'argent à partir des deux extraits d'algue brune et du citrate de sodium jusqu'à caractérisation

II.2.4 Caractérisation des AgNPs préparées par l'extrait d'algue brune et citrate de sodium

Il existe plusieurs manières de caractériser les nanoparticules, le premier et le plus pratique est le changement de couleur de la solution.

Pour la détermination des différents paramètres des AgNPs biosynthétisées et chimiquement synthétisées, nous avons tout d'abord caractérisé par spectroscopie par la bande de résonance plasmonique de surface en utilisant une spectroscopie UV-Visible puis par la Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et le Potentiel Zeta, par le microscope électronique à balayage (MEB) et par Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR).

a) Caractérisation par Spectrophotomètre UV Visible

Le spectrophotomètre UV-Visible est un appareil qui consiste à mesurer l'absorbance (la quantité de la lumière absorbée par nos échantillons en phase liquide) en fonction de la longueur d'onde.

Les mesures spectrophotométriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UV-visible (**Specord 210**). L'analyse est effectuée entre **200 et 800 nm**, l'appareil est relié à un micro-ordinateur. Le logiciel **WinASPECT Plus** permet l'enregistrement et la visualisation des spectres des échantillons analysés.

b) Caractérisation par Diffusion dynamique de la lumière (DLS) et Potentiel Zeta

Cet appareil consiste à déterminer la taille de nos particules en mesurant les changements aléatoires de l'intensité de la lumière diffusée à partir de notre échantillon.

Les échantillons sont d'abord passés par une sonde de sonication, la distribution granulométrique des AgNPs ont été déterminées à **25 °C** à l'aide d'un analyseur de taille de particules et de potentiel Zêta (**SZ-100 HORIBA Scientific**) avec un angle de détection de **173°** pour déterminer la taille et à une conductivité de **0,218 mS/cm** pour déterminer le potentiel Zêta.

c) Caractérisation par Microscope électronique à balayage (MEB)

L'observation des échantillons a été réalisée par la microscopie électronique à balayage MEB, qui contient un faisceau électronique qui va balayer la surface de notre échantillon pour au final obtenir des images en haute résolution.

Les échantillons des nanoparticules d'argent ont été visualisés (Morphologie) par un MEB de type (**Quanta 250**) à une échelle de **5 µm** et un grossissement de **×12000**.

d) Caractérisation par Spectrophotomètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR)

Le FTIR repose sur l'absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon qui a été mesurée en fonction de la longueur d'onde. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes sur la surface des échantillons.

Nous avons utilisé un Spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) de type (ALPHA), la poudre des nanoparticules d'argent préparées à base d'extraits d'algue brune et du citrate de sodium a été déposée entre deux plaques **KBr** et les spectres sont enregistrés dans l'intervalle de **3500 à 500 cm⁻¹**.

Ces techniques ont été utilisés pour caractériser les différents échantillons (**HS, HE et CITR**) de nanoparticules d'argent de la même manière.

II.2.5 Applications biomédicales

II.2.5.1 Activité antibactérienne des nanoparticules d'argent vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*

L'objectif de notre travail dans cette partie est d'optimiser les propriétés antibactériennes de nos différentes nanoparticules d'argent préparées à base (d'extraits hydro éthanolique, hydrosoluble et de citrate de sodium) sur différentes souches bactériennes qui ont été conservées dans des milieux de gélose nutritive inclinés au niveau du Laboratoire de Biomolécules et Effets Thérapeutiques au niveau du CRAPC (Bousmail) ;

- ✓ *Escherichia coli*
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa*
- ✓ *Enterobacter cloacae*

Afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées servant à préparer d'éventuels inoculum bactériens, les différentes souches ont étéensemencée sur milieu Muller Hinton (MH) par la méthode des stries puis incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

À partir de cette culture jeune de 18 à 24 heures, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur puis immergées dans de l'eau physiologique stérile jusqu'à l'obtention d'une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland, équivalente à une densité optique de 0,08 à 0,13 à 625 nm.

À la surface des boîtes de Petrie préalablement coulées avec du milieu Mueller-Hinton, les souches bactériennes ont étéensemencées par des stries serrées, à l'aide d'un écouvillon

stérile légèrement imbibé de suspension bactérienne. Cette opération est répétée trois fois en tournant la boîte de 60°.

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, trois puits par boîte de Petrie ont été introduits sur la gélose MH ensemencée. Ensuite les puits ont été numérotés ; le premier puit a été remplie par une dose (1 ou 2 mg/ml) de nanoparticules (**HE, HS, CITR**), le deuxième a été remplie de la solution de nitrate d'argent (1mM) et le troisième puit a été remplie de l'ATB de référence (10µg/ml de la Gentamicine). Les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats se fait par la mesure (en mm), à l'aide d'une règle du diamètre d'inhibition caractérisé par une zone dépourvue de croissance bactérienne autour du puit comparé à la zone de notre antibiotique de référence (Gentamicine).

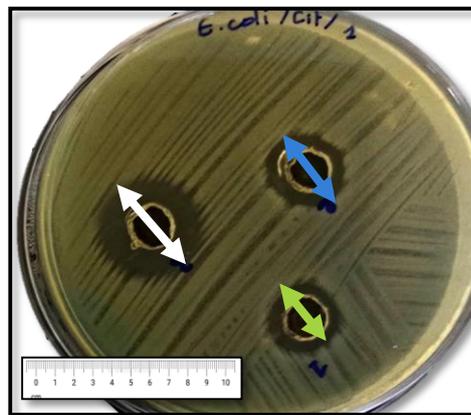


Figure 14 : Photo réelle d'un exemple de lecture des zones d'inhibition sur une des boîtes d'antibiogramme



Chapitre III :

Résultats & Discussion

III. Résultats et Discussion

III.1 Biosynthèse des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent synthétisées à l'aide d'extrait d'algue brune (hydrosoluble / hydro éthanolique) ont montré un passage d'une solution incolore vers une solution brune jaunâtre, cette coloration est un indicateur principal de la formation des nanoparticules d'argent.

Selon l'étude de Roohi et ses collègues (2020), un changement de couleur passant d'une solution incolore au brun jaunâtre puis au brun rougeâtre révèle clairement la synthèse des AgNPs par une algue rouge *Portieria hornemannii*, et selon Ravichandran et ses collègues (2019), un extrait aqueux de feuilles de *P. Speciosa* a été utilisé pour réduire l'AgNO₃ en Ag⁰ où la réduction a été confirmée par un changement de couleur de l'incolore en brun jaunâtre.

A partir de données publiées, il est connu que les NPs présentent une couleur brune en solution aqueuse en raison de l'excitation des vibrations de plasmon de surface dans les AgNPs biosynthétisés (Geethalakshmi et Sarada, 2010 ; Shuguang Wang et al., 2011).

Le changement de couleur de la solution après interaction avec l'extrait d'algue aborde le rôle joué par les biomolécules pour synthétiser et équilibrer les NPs d'argent dans les milieux aqueux ce qui était aussi confirmé par l'étude Roohi et al (2020).

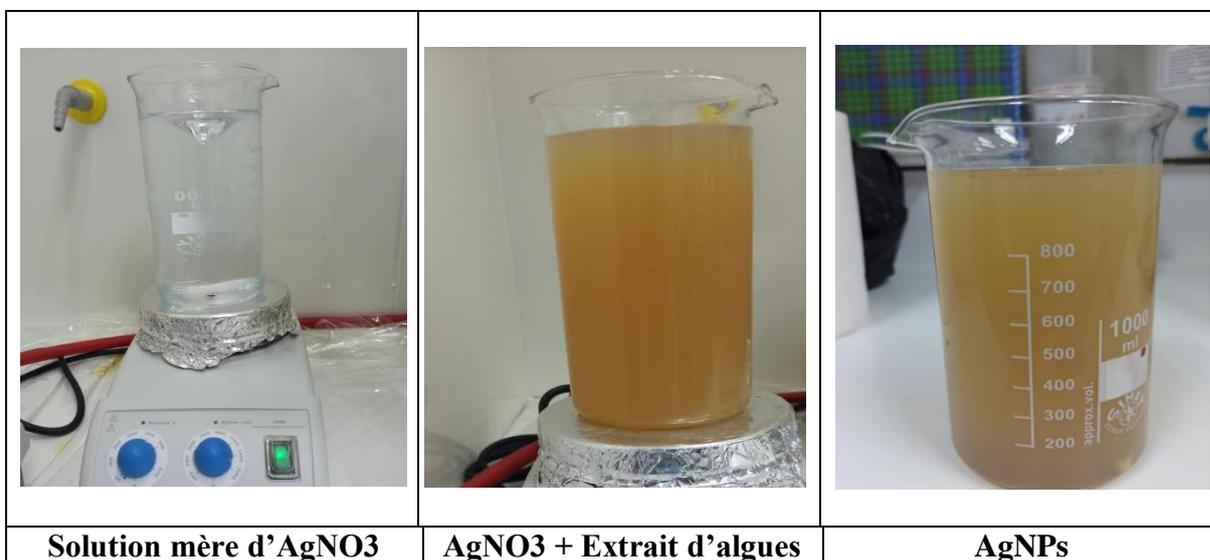


Figure 15 : résultat de biosynthèse (changement de couleur vers un brun jaunâtre)

III.2 Synthèse chimique des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules d'argent synthétisées à l'aide d'un solvant chimique citrate de sodium ont montré un passage d'une solution incolore à une solution grise verdâtre, qui est un indicateur principal de la formation des nanoparticules d'argent, comme il a été démontré dans une étude similaire de Mousavi-Khattat et al (2018).

Et selon Suriati (2014) et Prem Santhi Yerragopu et ses collègues (2020) l'indication de la formation d'AgNPs réduit par Tri-sodium Citrate a été observée par un changement de couleur de la solution de jaune clair au jaune puis au verdâtre, avant de se stabiliser.

III.3 Caractérisation des AgNPs préparées par l'extrait d'algue brune et citrate de sodium

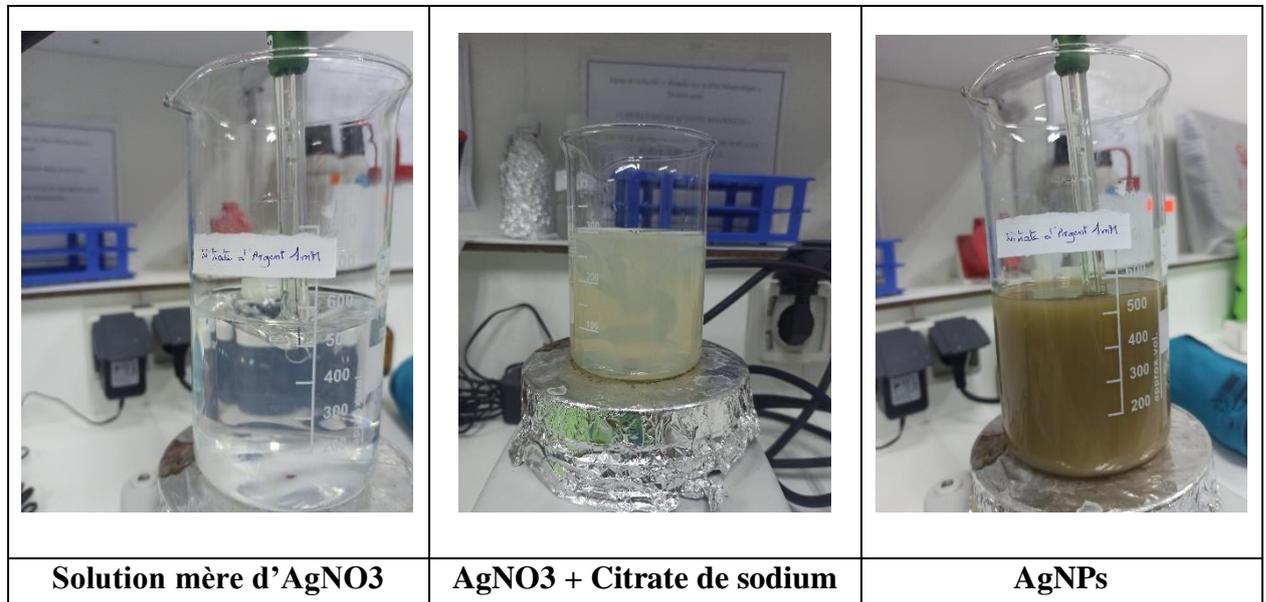


Figure 16 : résultat de synthèse chimique (changement de couleur vers un gris verdâtre)

▪ Caractérisation des nanoparticules d'argent par Spectroscopie UV-Visible

Pour déterminer si les AgNPs sont développées ou non, l'aspect visuel et colorimétrique des échantillons à l'état liquide est vérifié par spectrophotomètre UV-Visible. Une fois les AgNPs sont synthétisées, la solution de nitrate d'argent développe une couleur brune jaunâtre après interaction avec l'extrait hydrosoluble ou hydro éthanolique d'algue brune ou une couleur grise à verte après interaction avec citrate de sodium, ce qui était confirmé par la résonance plasmonique de surface SPR et l'absorption UV visible dans les illustrations fig17, fig18, fig19 et les résultats de caractérisation par UV-visible des AgNPs synthétisées en utilisant le balayage spectral 200 – 800 nm sont représentés dans le tableau 6 qui englobe tous les pics d'absorption maximale dans l'intervalle de 390-425 nm.

Tableau 6 : Représentation des résultats des AgNPs synthétisées par UV-Visible

Les échantillons analysés	Absorbance (nm)
AgNPs (extrait hydrosoluble)	420
AgNPs (extrait hydro éthanolique)	390
AgNPs (citrate de sodium)	425

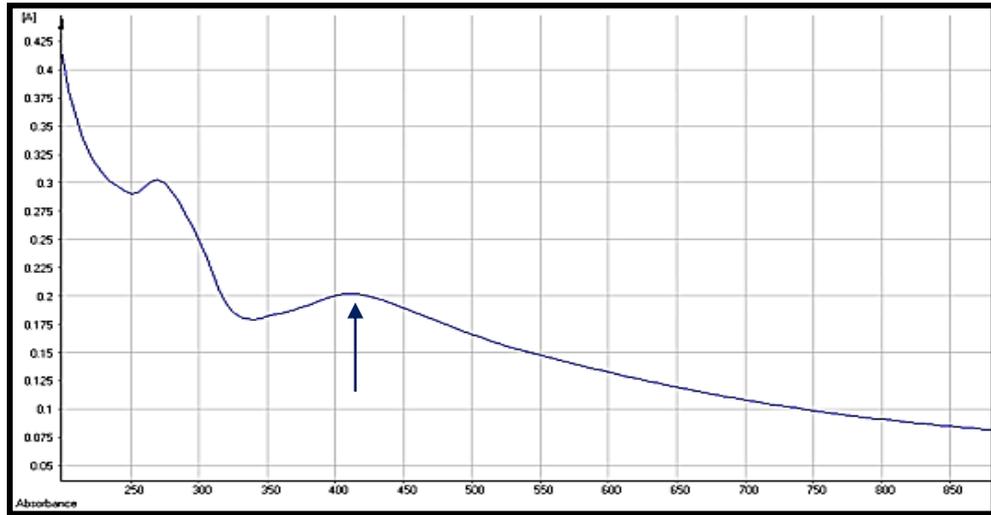


Figure 18 : Spectre d'absorbance des AgNPs HS obtenu par UV-Visible

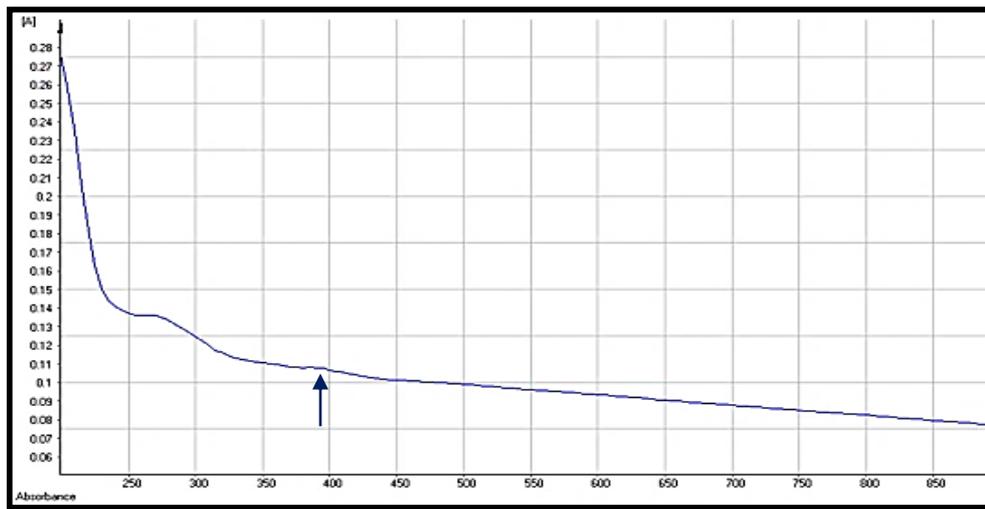


Figure 19 : Spectre d'absorbance des AgNPs HE obtenu par UV-Visible

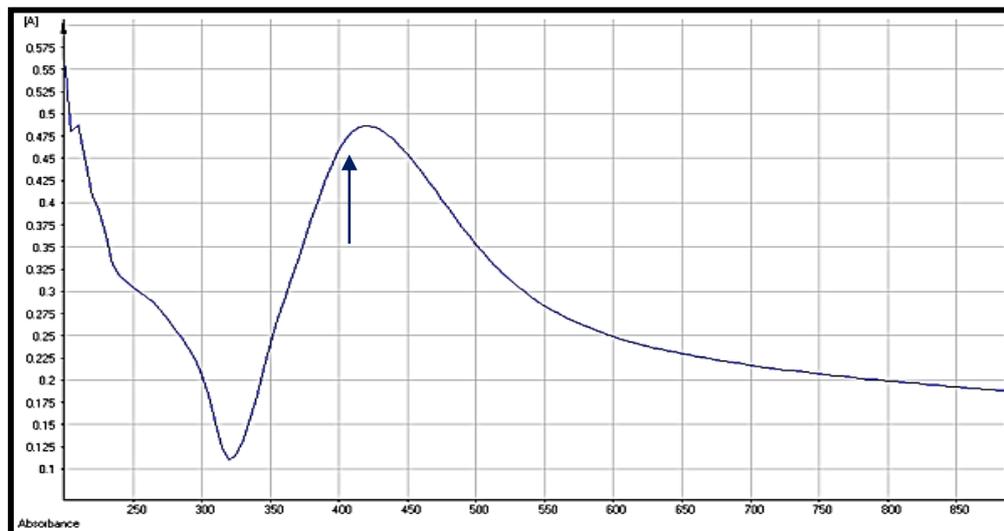


Figure 17 : Spectre d'absorbance des AgNPs CTR obtenu par UV-Visible

Des résultats de caractérisation par UV - Visible sont rapportés dans la littérature ; Selon Roohi Fatima et ses collègues (2020) les AgNPs biosynthétisées par l'algue rouge *Portieria hornemannii* ont révélé une longueur d'onde dans un spectrophotomètre à **420 nm**.

Dans une autre étude, un extrait aqueux de feuilles de *P. Speciosa* a été utilisé pour réduire l'AgNO₃ en Ag⁰, où la réduction était confirmée par une absorbance maximale à **463 nm** d'après Ravichandran et al (2019).

Selon Shanmugam et ses collaborateurs (2014), la bande de résonance plasmonique de surface pour les nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait d'algue brune *Sargassum longifolium* était positionnée à environ **460 nm**.

Dans une étude réalisée par Tanur Sinha et ses collègues (2012), les AgNPs synthétisées chimiquement par du SDS présentent une bande à environ **420 nm**. Dans une autre étude réalisée par Prem Santhi Yerragopu et ses collègues (2020), le spectre d'absorption UV-Visible des nanoparticules d'argent synthétisées à l'aide d'un mélange d'hydrazine et de citrate de sodium comme agent réducteur et de SDS comme agent stabilisant a révélé la formation de nanoparticules d'argent en montrant le maximum d'absorption des plasmons de surface à **412 nm**.

D'après Link S et al (2003), Noginov M et al (2007) Nath S.S & Gope D.G (2007) l'absorption des AgNPs dépend de la taille des particules, du milieu diélectrique et de l'environnement chimique.

▪ Caractérisation des nanoparticules d'argent par DLS et Potentiel Zeta

L'analyse de distribution de taille et de Potentiel Zeta des AgNPs hydrosolubles par DLS a été illustrée dans les figures suivantes (Fig 20,21) respectivement ;

La taille des AgNPs a été observée dans l'analyse DLS à environ **244,2 nm** avec une polydispersité moyenne.

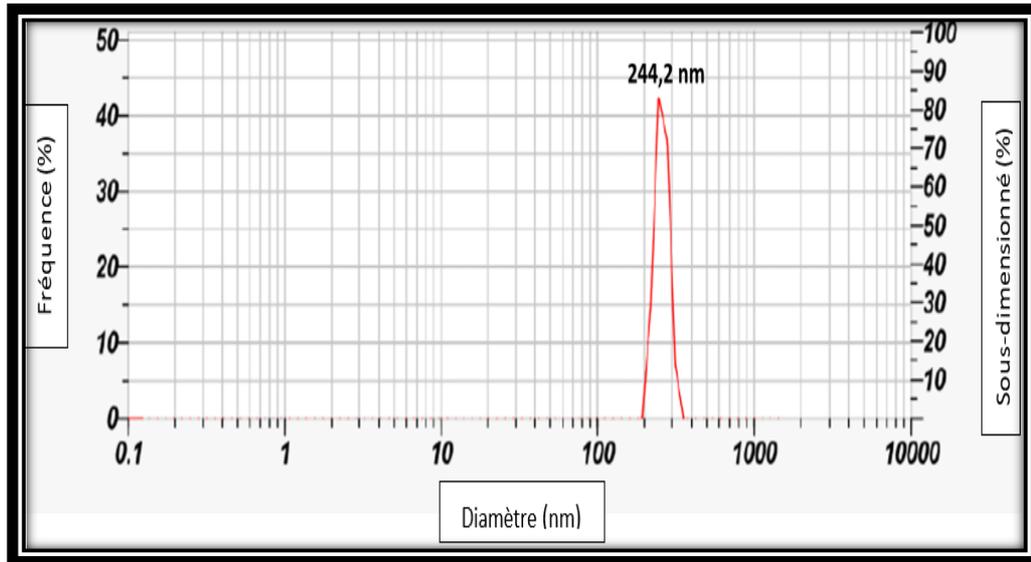


Figure 20 : Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par l'extrait hydrosoluble de l'algue brune à l'aide de DLS

La stabilité des nanoparticules a été confirmée par le potentiel Zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydro soluble qui s'est avéré être de **-38,5 mV** (Fig 21) avec une meilleure stabilité. La valeur potentielle négative montrée par les AgNPs biosynthétisées reflète la présence de composants bio-organiques dans l'extrait en tant qu'agent de coiffage.

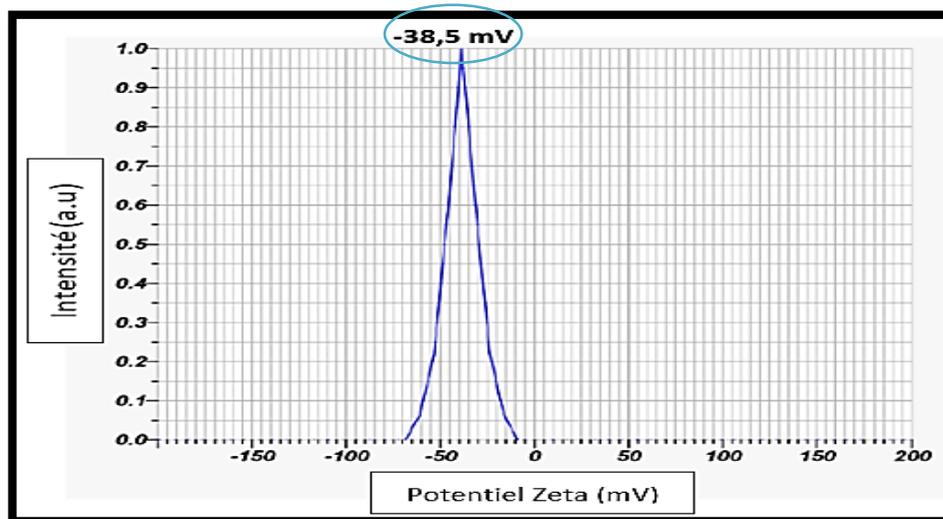


Figure 21 : Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydrosoluble

L'analyse de distribution de taille et de Potentiel Zeta des AgNPs hydro éthanoliques par DLS a été montrée dans les figures suivantes (Fig 22, 23), la taille des AgNPs a été observée dans l'analyse DLS à environ **174,5 nm** avec une faible polydispersité.

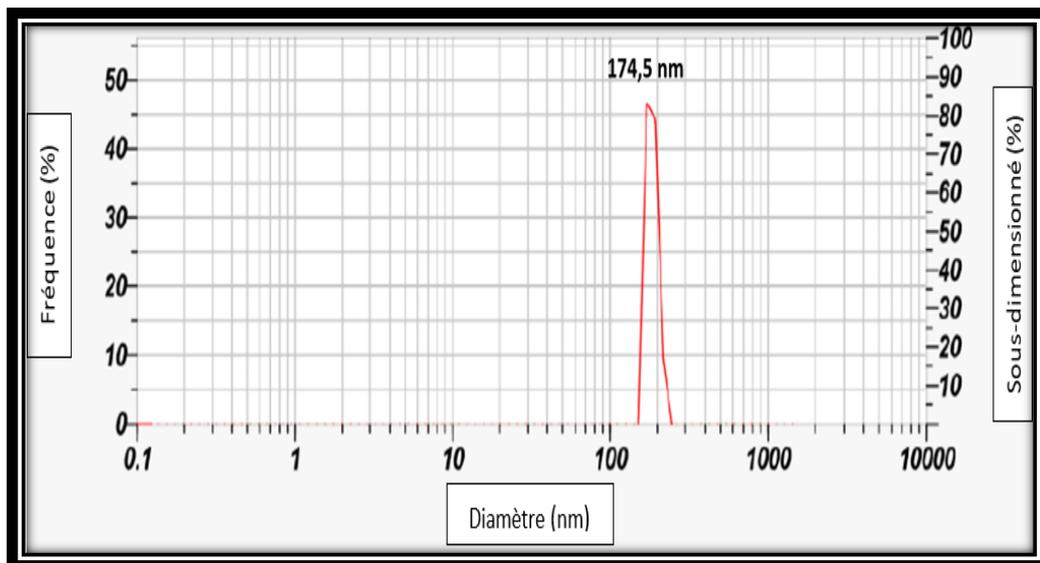


Figure 22 : Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par l'extrait hydro éthanologique de l'algue brune à l'aide de DLS

La stabilité des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydro éthanologiques a été confirmée par le potentiel Zêta qui s'est avéré être de **- 43, 1 mV** (Fig 23), elles sont donc bien dispersées dans la solution colloïdale.

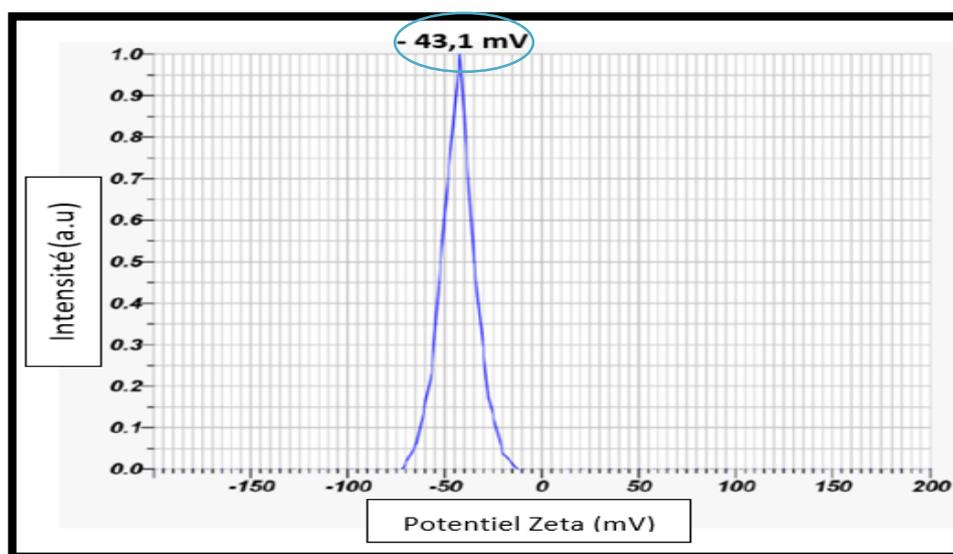


Figure 23 : Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par l'extrait hydro éthanologique.

L'analyse de distribution de taille et de Potentiel Zeta des AgNPs par citrate de sodium par DLS a été montré dans les figures suivantes (Fig 24, 25), la taille des AgNPs a été observée dans l'analyse DLS à environ **279,6 nm** avec une polydispersité moyenne.

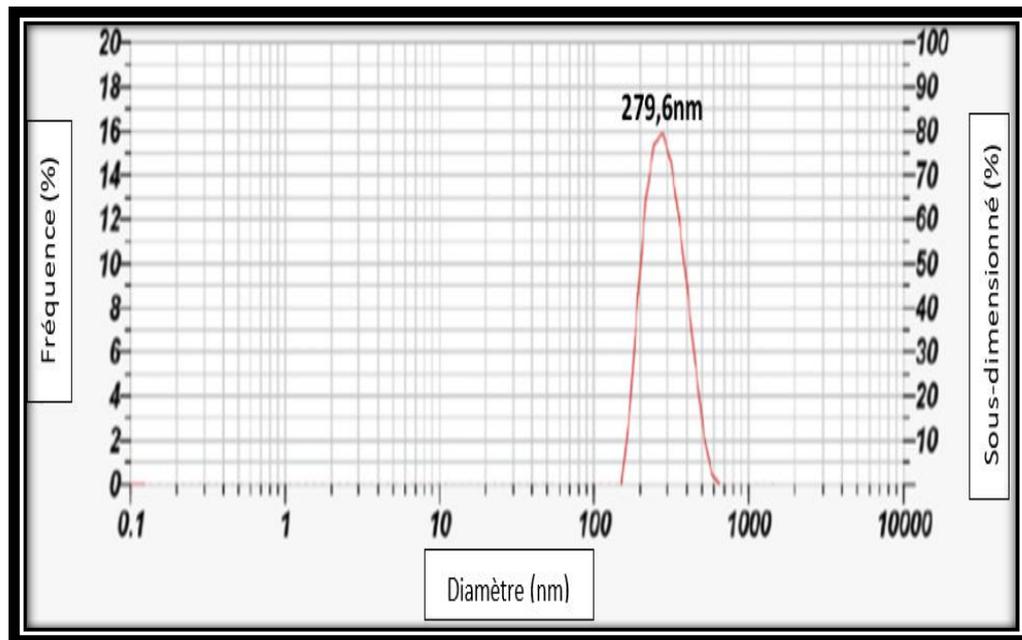


Figure 24 : Analyse de la taille des particules d'AgNps synthétisées par Citrate de sodium à l'aide de DLS

La stabilité des nanoparticules d'argent synthétisées par citrate de sodium a été confirmée par le potentiel zêta qui s'est avéré être de **- 51,1 mV**. Les AgNPs sont donc bien dispersées dans la solution colloïdale (Fig 25).

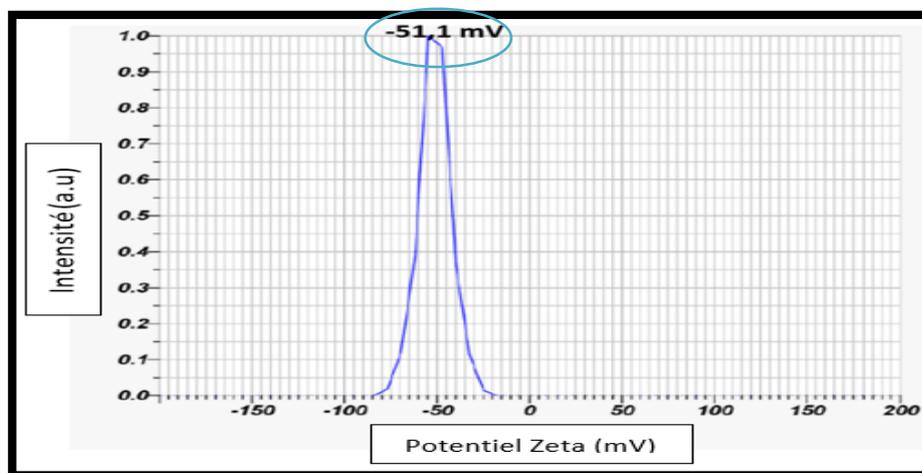


Figure 25 : Le graphique représente la valeur négative du potentiel zêta des nanoparticules d'argent synthétisées par Citrate de sodium

La caractérisation faite par Ravichandran et ses collègues (2019), a montré que la taille des AgNPs synthétisées par l'extrait hydrosoluble de *Parkia speciosa* a été observée à environ **155,3 nm** dans l'analyse DLS avec un faible indice de polydispersité (PDI) de 0,381, Dans une autre étude Ke Zhang et ses collègues (2019) ont trouvé la taille des nanoparticules d'Ag synthétisées par *S. miltiorrhiza* de **128 nm**.

Une analyse faite par l'équipe de Natarajan (2018), a montré que la taille des nanoparticules d'Ag synthétisées à partir de *B. brevis* KN8 était de **313,6 nm**.

Et un résultat d'analyse de taille d'AgNPs synthétisées par citrate de sodium, obtenu était de **95,5 nm** d'après Mahsa et al (2020).

Alors que l'analyse du potentiel Zeta de nos nanoparticules d'argent HE, HS et CTR nous a révélé la charge de surface de chacune dans les figures 21, 23, 25 respectivement dont nous avons remarqué que les nanoparticules d'argent synthétisées à partir de l'extrait hydrosoluble ont eu une meilleure stabilité de **-38,5 mV**.

Une analyse de charge de surface des AgNPs synthétisées par l'algue rouge *Portieria hornemannii* était de **-44,5 mv**, Cela a évidemment rapporté que les AgNPs étaient très stables par des moyens électrostatiques, d'après Roohi et al (2020), Des observations similaires ont été trouvées dans l'étude réalisée par Jamshed Khan et al (2019) , le potentiel Zeta a été enregistré à **-47,5 mV** (C0), **-46,5 mV** (C1) et **-39,3 mV** (C2) pour des concentrations différentes de l'extrait du *Curcumin* ; Dans une autre étude Mahsa et ses collaborateurs (2020) ont trouvé la charge de surface des AgNPs synthétisées à partir de citrate de sodium de **-34,5 mV**.

▪ Caractérisation des nanoparticules d'argent par Microscopie électronique à balayage

Dans le cadre de notre étude, Les caractéristiques morphologiques des AgNPs biosynthétisées et chimiquement synthétisées ont été étudiées par microscopie électronique à balayage.

L'analyse par Microscopie électronique à balayage des nanoparticules d'argent hydrosoluble et hydro-éthanolique a montré que la plupart des particules ont une forme sphérique et forment des agrégations voir les illustrations (26 ,27).

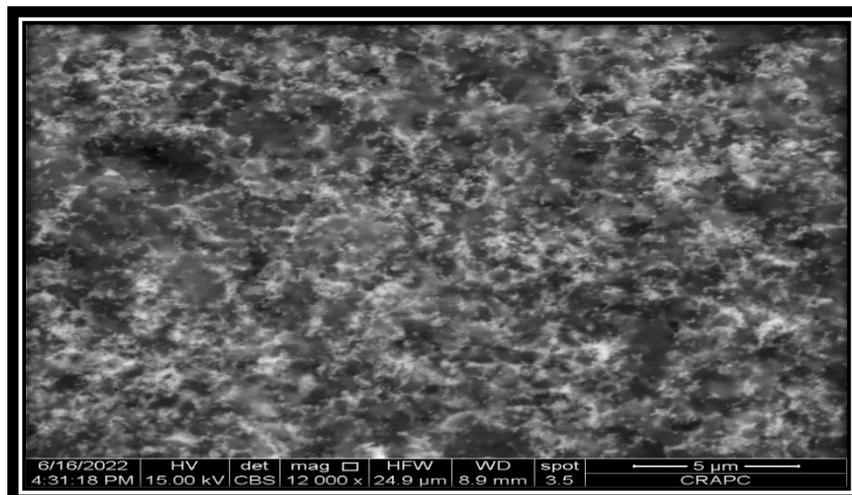


Figure 26 : Image MEB d'une analyse morphologique des AgNPs HS à une échelle de 5 µm

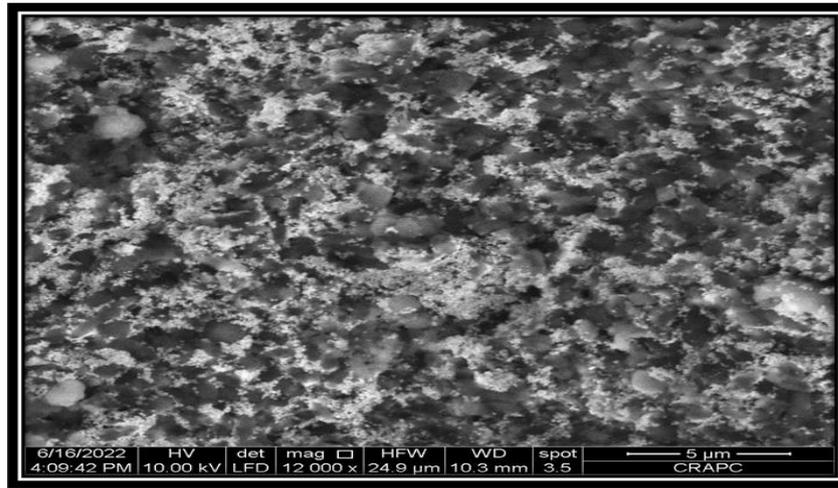


Figure 27 : Image MEB d'une analyse morphologique des AgNPs HE à une échelle de 5 µm

La morphologie sphérique montrée par notre analyse MEB des nanoparticules d'argent bio et chimiquement synthétisées concorde avec les résultats obtenus par d'autres études antérieures ; L'observation des nanoparticules d'argent biosynthétisées par l'extrait d'algue brune *Padina sp* faite par Prakash Bhuyar et ses collègues (2020) ont montré que les nanoparticules étaient de forme **sphérique, polydispersées, fortement distribuées avec agrégation**. Une autre étude faite par Abiola et ses collègues (2019) a démontré que la morphologie des AgNPs biosynthétisées par l'extrait de *Gleichenia Pectinata* était **sphérique**. Une observation des nanoparticules d'argent synthétisées par citrate de sodium faite par Prem Santhi Yerragopu et ses collègues (2020) a montré également qu'elles sont de forme **sphérique**.

▪ **Caractérisation de la chimie de surface des nanoparticules d'argent par FTIR**

Des mesures FTIR ont été réalisées afin d'identifier la présence de divers groupements fonctionnels des biomolécules responsables de la bio-réduction de l'AgNO₃ et du coiffage/stabilisation des nanoparticules d'argent (**HE, HS et CITR**). Les résultats obtenus ont montré des bandes enregistrées entre un intervalle de 3500 et 500 cm⁻¹ (Voir les figures 28, 29,30 et le tableau 6).

Les bandes intenses observées ont été comparées aux valeurs standard pour identifier les groupements fonctionnels en suivant la méthode de Dominique Gennet & Christian Ley (2004).

La figure 28 représente le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par extrait hydro-éthanolique d'algue brune dans la gamme 500-3500 cm^{-1} , ce spectre révèle des groupements fonctionnels tels que :

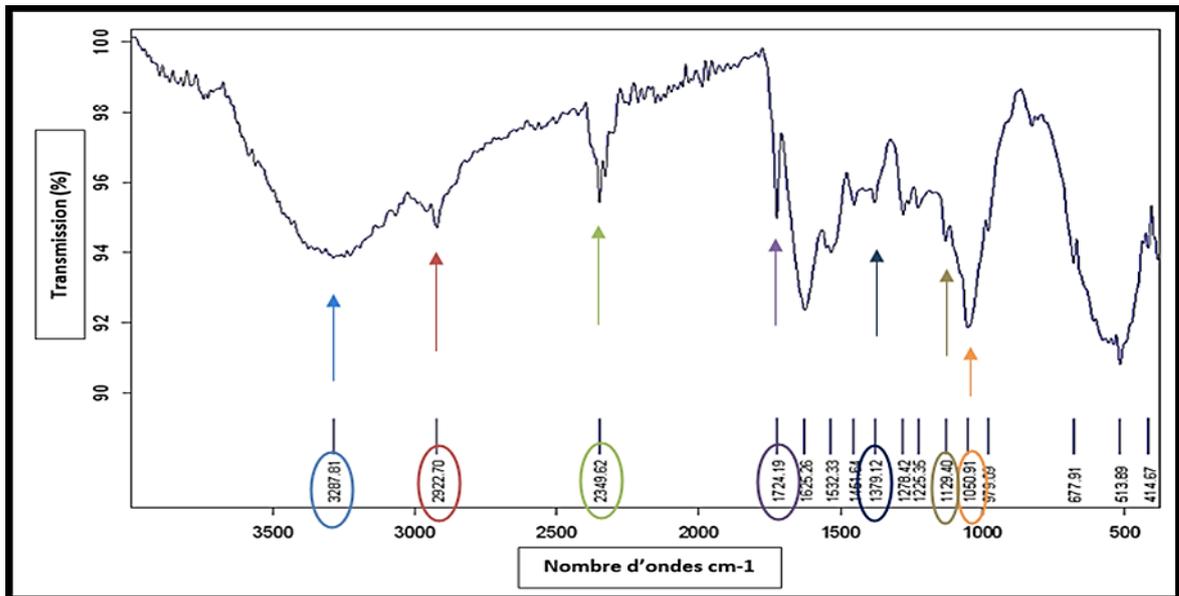
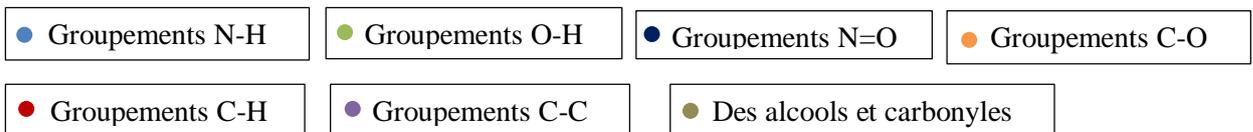


Figure 28 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par extrait hydro-éthanolique d'algue brune



La figure 29 représente le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par extrait hydrosoluble d'algue brune dans la gamme 500-3500 cm^{-1} , ce spectre révèle des groupements fonctionnels tels que ;

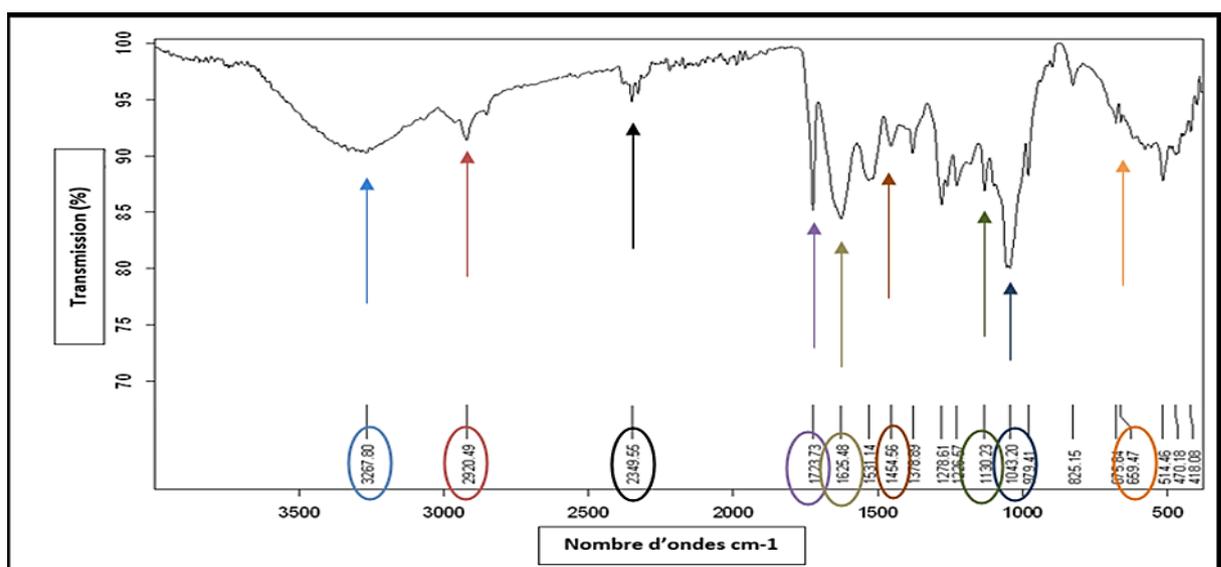
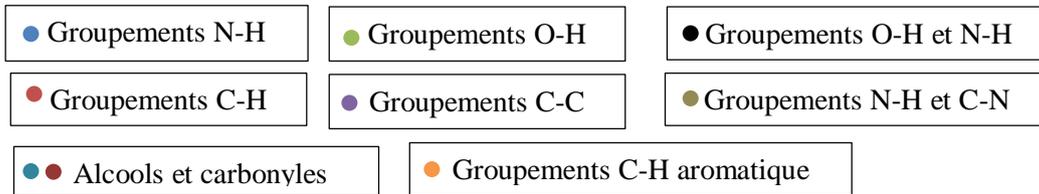


Figure 29 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par extrait hydrosoluble d'algue brune



La figure 30 représente le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par citrate de sodium dans la gamme 500-3500 cm^{-1} , ce spectre révèle des groupements fonctionnels tels que ;

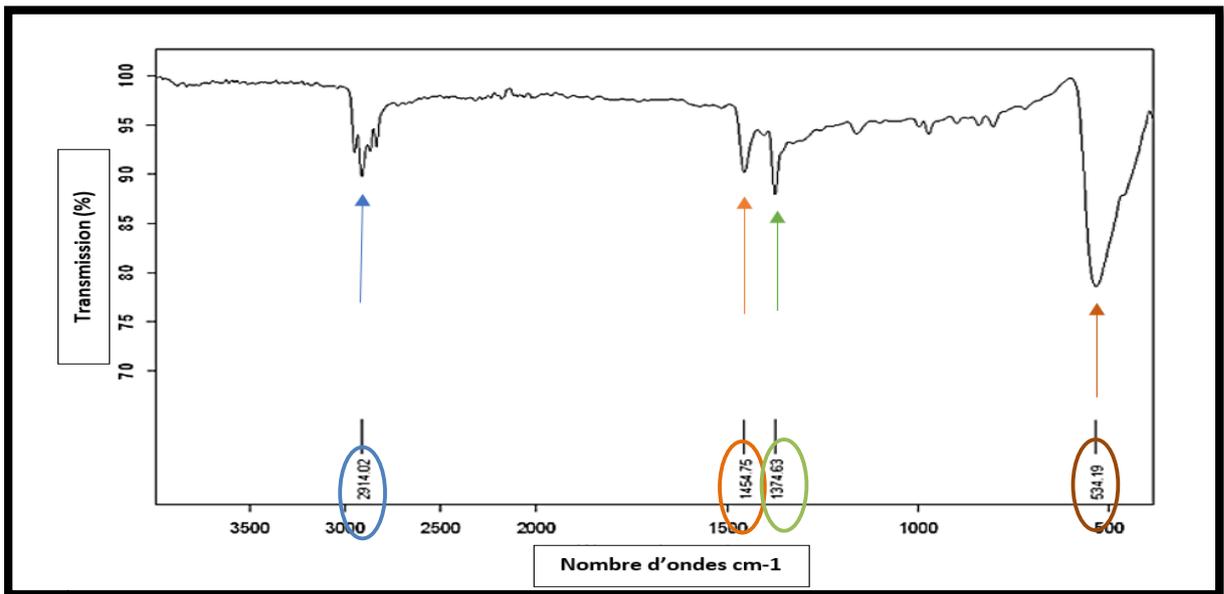


Figure 30 : Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées par citrate de sodium



Tableau 6 : Représentation des groupements fonctionnels montrés sur la surface des AgNPs bio et chimiquement synthétisées

<i>Les groupements fonctionnels</i>	<i>Références</i>	<i>AgNPs HE</i>	<i>AgNPs HS</i>	<i>AgNPs CITR</i>
O-H	Selon Sankar Narayan Sinha et ses collègues (2015) que le pic était de 2359 cm ⁻¹	2349 cm ⁻¹	2349 cm ⁻¹	-
N-H	Selon Mubarak Ali et ses collègues (2011) le pic était de 3394 cm ⁻¹	3287cm ⁻¹	3267 cm ⁻¹	-
C-H	Selon Kumari Jyoti (2015) le pic était de 2921 cm ⁻¹	2922 cm ⁻¹	2920 cm ⁻¹	2914 cm ⁻¹
C-C	Selon Kumari Jyoti (2015) montre que le pic était de 1742 cm ⁻¹	1724 cm ⁻¹	1723 cm ⁻¹	-
N=O	Kumari Jyoti (2015) le pic était de 1377 cm ⁻¹	1379cm ⁻¹	-	-
Des carbonyles et alcools	Selon l'étude de Raj kuberan et ses collaborateurs (2016) le pic était de 1120 cm ⁻¹	1129 cm ⁻¹	1130 cm ⁻¹	-
C-O aromatique	Selon Munesh Kumar et ses collègues (2017) dont le pic était à 1053,43 cm ⁻¹	1050 cm ⁻¹	-	-
C- N	Selon Dominique Gennet & Christian Ley (2004)	-	1454 -1043 cm ⁻¹	-
C-H aromatique	Selon Taşkıran et ses collaborateurs (2017) le pic était à 660 cm ⁻¹	-	659 cm ⁻¹	-
C=C aromatique	Selon Dominique Gennet & Christian Ley (2004)	-	-	1454-1374 cm ⁻¹
Ag-O de l'oxyde d'argent	Selon Dominique Gennet & Christian Ley (2004)	-	-	534 cm ⁻¹

L'étude spectroscopique FTIR a montré que les nanoparticules d'argent **HS** et **HE** ont révélé un large spectre de groupements fonctionnels et qui pratiquement se ressemblent avec quelques changements de la position et d'intensité des bandes de transmission et la disparition ou l'apparition de quelques bandes, ces groupements ont la plus forte capacité à lier le métal de

sorte que les protéines pourraient former un revêtement recouvrant les nanoparticules métalliques pour empêcher l'agglomération des particules et se stabiliser dans le milieu contrairement aux nanoparticules d'argent **CITR** qui ont montré qu'ils sont pauvres en groupements fonctionnels alors que dans une étude similaire, des AgNPs synthétisées par citrate de sodium ont montré qu'à leur surface aucun groupement fonctionnel n'a été trouvé par analyse FTIR d'après Shaik et *al* (2016). Ce qui nous mène à éviter leur utilisation pour des applications biomédicales.

III.4 Evaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent vis-à-vis des souches *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*

L'activité antibactérienne de nos échantillons, a été évaluée *in vitro*, par la méthode de diffusion en milieu solide, vis à vis d'une souche bactérienne à Gram positif : *Staphylococcus aureus* et trois souches bactériennes à Gram négatif : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter cloacae*.

Cette méthode consiste à déposer des échantillons dans des puits sur un milieu nutritif dans lequel une souche bactérienne a été inoculée. Elle permet de voir directement l'effet antibactérien de l'échantillon par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des puits de l'échantillon.

Après 24h d'incubation, les zones d'inhibitions apparues sont mesurées et le tableau 8 représente les résultats dont les souches bactériennes *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* ont montré des valeurs intéressantes contrairement à *Escherichia coli* et *Enterobacter cloacae*.

Tableau 8 : Zones d'inhibition (mm) de différentes AgNPs (**HS**, **HE** et **CITR**), AgNO_3 et *Gentamicine* contre les quatre souches bactériennes (Gram + / Gram -) étudiées :

Souche bactérienne	AgNPs												AgNO ₃		Gentamicine	
	HS 1 mg/ml		HS 2 mg/ml		HE 1 mg/ml		HE 2 mg/ml		CITR 1 mg/ml		CITR 2 mg/ml		1 mM		10 µg/ml	
<i>E.coli</i>	12	+	14	+	12	+	14	+	14	+	16	++	14	+	20	+++
<i>P.aeruginosa</i>	15	++	20	+++	17	++	17	++	15	++	18	++	16	++	21	+++
<i>S.aureus</i>	11	+	20	+++	16	++	18	++	19	++	20	+++	19	++	23	+++
<i>E.cloacae</i>	10	+	12	+	12	+	11	+	12	+	12	+	12	+	21	+++

L'échelle d'estimation de l'activité antimicrobienne est donnée par Ponce et *al* (2003) ; Ils ont classé le diamètre des zones d'inhibition (**D**) de la croissance microbienne comme suit :

- **Non sensible (-) :** $D \leq 8\text{mm}$
- **Sensible (+) :** $9 \leq D \leq 14\text{ mm}$
- **Très sensible (++) :** $15 \leq D \leq 19\text{ mm}$
- **Extrêmement sensible (+++) :** $D > 20\text{ mm}$

D'après l'évaluation de l'activité antibactérienne de nos échantillons des AgNPs, de nitrate d'argent AgNO_3 et d'antibiotique de référence la Gentamicine, nous avons observé que les quatre souches bactériennes testées ont réagi différemment aux différents types de AgNPs testées.

▪ *Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs vis-à-vis de **Staphylococcus aureus***

Staphylococcus aureus a montré une sensibilité vis-à-vis des deux concentrations (1 et 2 mg/ml) d'AgNPs **HS** testées avec des zones d'inhibition de 11 et 20 mm respectivement. La valeur obtenue avec la dose de 2mg/ml est presque identique à celle d' AgNO_3 (19mm) mais inférieure à celle du contrôle positif (Gentamicine) (23 mm).

Une sensibilité avec des zones d'inhibition de 16 et 18 mm a été observée avec 1 et 2 mg/ml d'AgNPs **HE** respectivement. La valeur obtenue avec la dose de 2mg/ml est presque identique à celle d' AgNO_3 mais inférieure à celle obtenue avec l'ATB de référence la Gentamicine. Ainsi qu'une sensibilité a été observée avec des zones d'inhibition de 18 et 20 mm avec 1 et 2 mg/ml d'AgNPs **CITR** respectivement et qui est presque identique à celle d' AgNO_3 et inférieure à celle de Gentamicine.

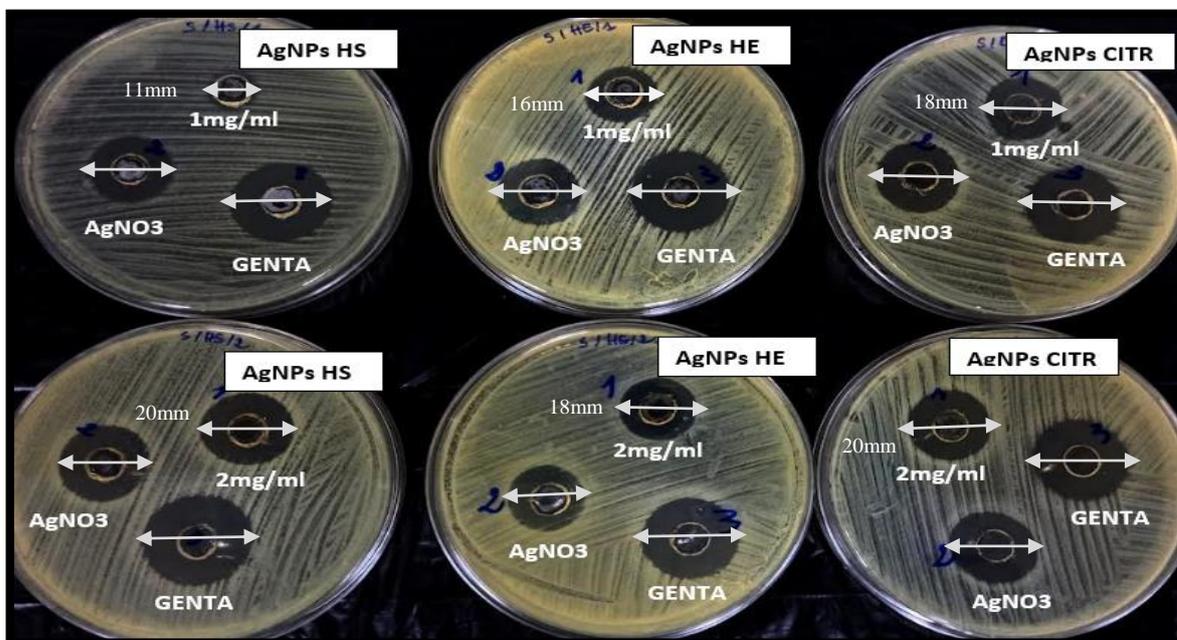


Figure 31 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

- *Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs vis-à-vis de Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa a montré une sensibilité avec des zones d'inhibition de 15 et 20 mm avec les deux concentrations 1 et 2 mg/ml d'AgNPs HS testées. Le diamètre de la zone d'inhibition avec d'AgNO₃ (16mm) est presque identique à celui obtenu avec la dose de 1mg/ml. Alors que l'ATB de référence a montré une zone d'inhibition presque identique à celle obtenue avec la dose de 2mg/ml (21mm).

Une sensibilité a été observée vis-à-vis des deux concentrations (1 et 2 mg/ml) d'AgNPs HE avec des zones d'inhibition de 17mm presque identique à celle obtenue avec AgNO₃ et inférieure à celle obtenue avec la Gentamicine.

Une sensibilité de *Pseudomonas aeruginosa* a été également observée vis-à-vis d'AgNPs CITR à 1 et 2 mg/ml avec des zones d'inhibition de 15 et 18 mm respectivement. Ces deux valeurs sont inférieures à celle obtenue avec la Gentamicine. La valeur obtenue avec la dose de 1mg/ml est presque identique à celle obtenue avec AgNO₃.

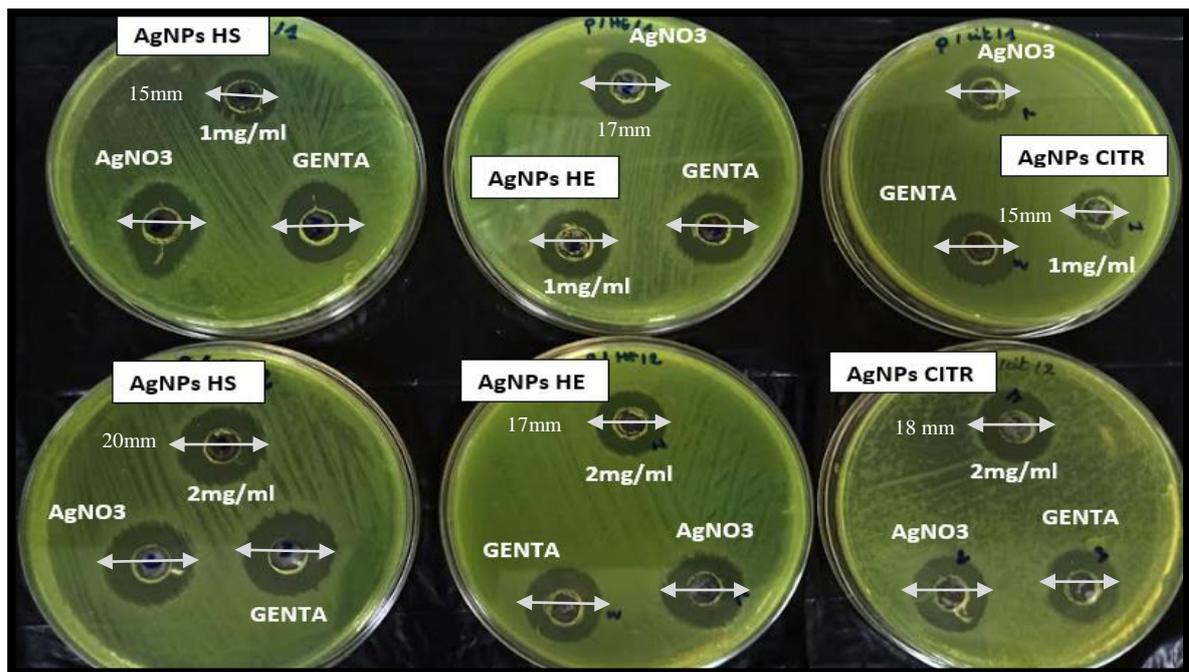


Figure 32: Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*

- *Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs vis à vis de Escherichia Coli*

Escherichia Coli a montré une sensibilité vis-à-vis des concentrations (1 et 2 mg/ml) d'AgNPs HS, avec des zones d'inhibition respectivement de 12 et 14 mm. La valeur obtenue avec la dose de 2mg/ml est similaire à celle obtenue avec AgNO₃ (14mm). Le diamètre de la zone d'inhibition obtenue avec le contrôle positif (Gentamicine) était de 20mm, supérieur aux deux valeurs obtenues avec les deux doses d'AgNPs HS testées.

Une sensibilité avec des zones d'inhibition de 12 et 14 mm à des concentrations de 1 et 2 mg/ml d'AgNPs HE a été observée, similaire à celle d'AgNO₃ et inférieure à celle de Gentamicine ; Ainsi qu'une sensibilité a été observée vis-à-vis des concentrations 1 et 2 mg/ml d'AgNPs CITR avec des zones d'inhibition de 14 et 16 mm. La valeur obtenue avec la dose de 1 mg/ml est similaire à celle obtenue avec AgNO₃ (14mm). L'ATB de référence a montré une activité supérieure aux deux doses d'AgNPs CITR testées.

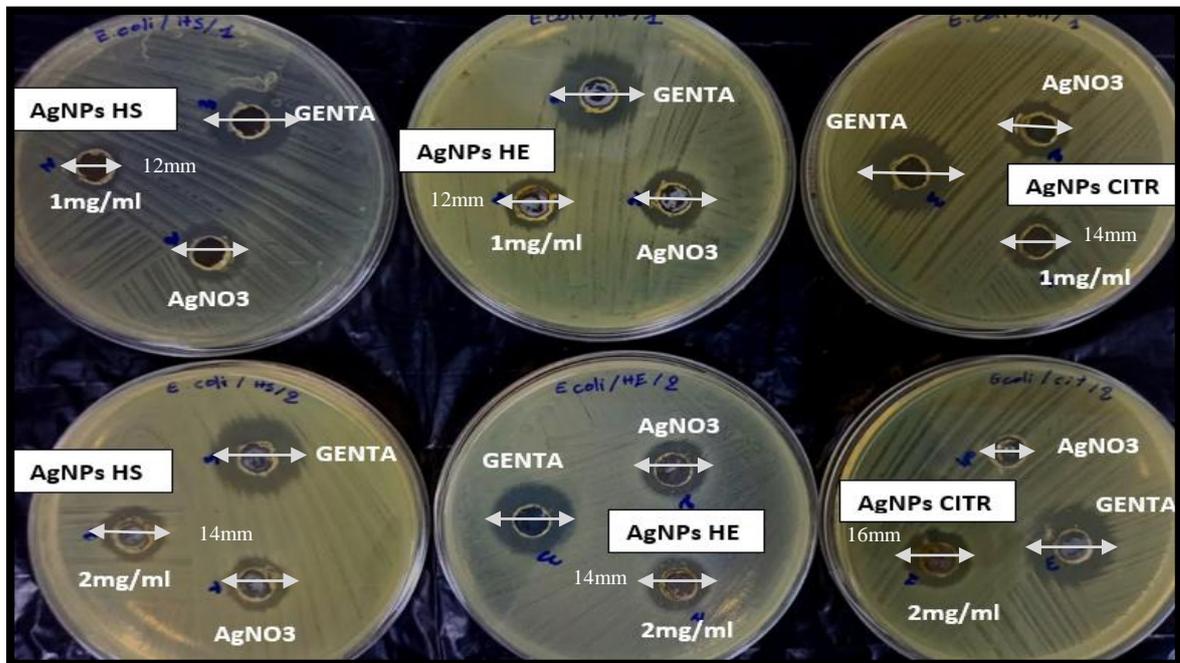


Figure 33 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de *Escherichia Coli*

▪ *Evaluation de l'activité antibactérienne des AgNPs vis-à-vis de Enterobacter cloacae*

Enterobacter cloacae a montré une sensibilité vis-à-vis des deux concentrations (1 et 2 mg/ml) d'AgNPs HS avec des zones d'inhibition respectivement de 10 et 12 mm. La valeur obtenue avec la dose de 2 mg/ml est similaire à celle obtenue avec AgNO₃ (12mm). L'ATB de référence a montré une activité supérieure aux deux doses d'AgNPs HS testées (21mm).

Une sensibilité d'*Enterobacter cloacae* a été observée à 1 et 2 mg/ml d'AgNPs HE avec des zones d'inhibition de 12 et 11 mm respectivement. Ces deux valeurs sont presque similaires à celle obtenue avec AgNO₃ et inférieures à celle de la Gentamicine.

Enterobacter cloacae a été également sensible vis-à-vis des deux concentrations (1 et 2 mg/ml) d'AgNPs CITR avec des zones d'inhibition de 12 mm et qui sont similaires à celle d'AgNO₃ et inférieures à la Gentamicine.

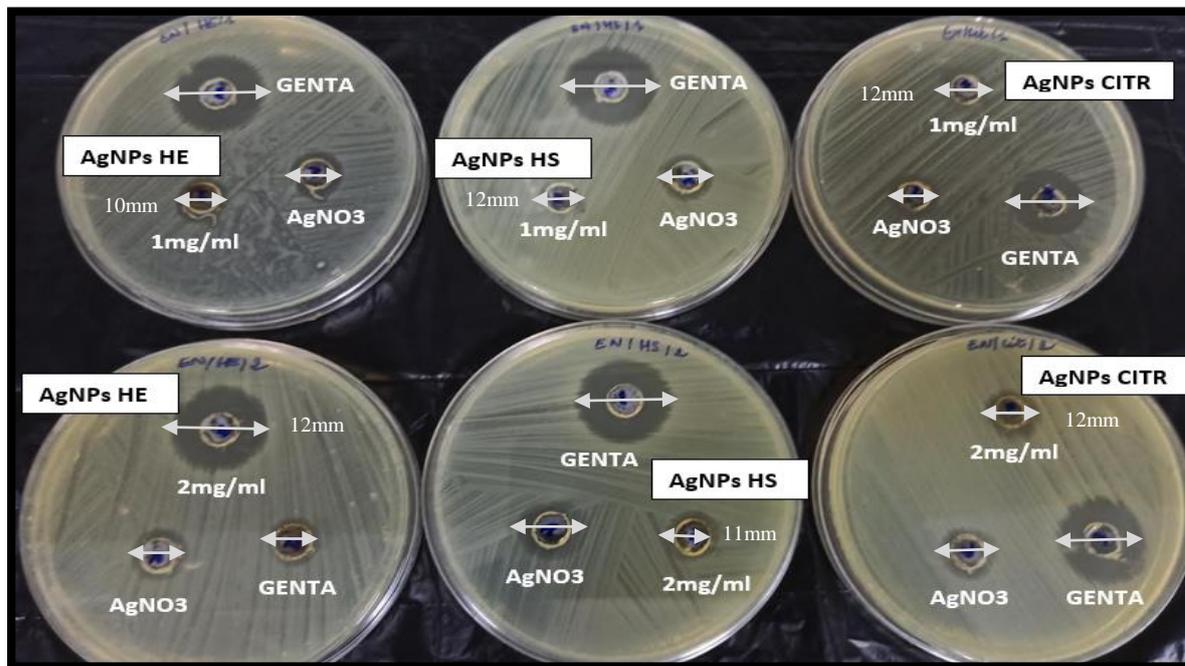


Figure 34 : Activité antibactérienne des AgNPs synthétisées vis-à-vis de *Enterobacter cloacae*

Nous avons remarqué que les nanoparticules d'argent **HS** ont donné de bons résultats contre les quatre souches et en particulier envers *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-), *Staphylococcus aureus* (Gram+) par rapport aux nanoparticules d'argent **HE** et **CITR**. Il semble également que la concentration des nanoparticules d'argent testées joue un rôle primordial dans l'activité antibactérienne car nous avons remarqué qu'en augmentant la concentration d'AgNPs, la zone d'inhibition augmentait en retour.

Plusieurs travaux antérieurs réalisés sur l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent biosynthétisées à l'aide d'extrait de plantes et d'algues ont mené à des résultats qui concordent avec notre étude. Selon Krishna Gudikandula et Singara Charya Maringanti (2016), l'activité antibactérienne la plus élevée des nanoparticules a été observée contre *E. coli* et *S. aureus* suivis de *B. subtilis* et *K. pneumonia* aussi bien pour les AgNPs biosynthétisées que celles synthétisées par voie chimique.

Behravan et ses collaborateurs (2019) ont synthétisé des nanoparticules d'argent à l'aide d'extrait aqueux de feuilles et de racines de *Berberis vulgaris* et d'après cette étude, ces nanoparticules d'argent ont présenté une activité très élevée contre les bactéries à Gram positif.

Prakash et ses collaborateurs (2020) ont synthétisé des nanoparticules d'argent à l'aide d'extrait d'algue brune *Padina sp*, l'activité antibactérienne la plus élevée a été observée contre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Murugesan et ses collègues (2017) ont testé des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de l'extrait l'algue *S. fusiformi* vis à vis des différentes bactéries dont *E. coli* et *K. pneumonia* ont montré une inhibition imposante par rapport à *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Selon l'étude réalisée par Alfuraydi et ces collaborateurs en 2019 et Maghimaa & Alharbi en 2020, les ions d'argent (Ag^+) sont des agents antimicrobiens responsables de la perturbation de la membrane externe de la cellule cible.

Et d'après l'étude de Judith Vijaya et ces collaborateurs (2017), la taille des nanoparticules semble jouer aussi un rôle important dans le mécanisme d'action antibactérien.

En raison de leur grande surface, Manikprabhu et ces collaborateurs (2016), ont suggéré que les AgNPs se fixent aux membranes cellulaires et pénètrent facilement dans les bactéries, causant ainsi des dommages au niveau de la membrane cellulaire.

Les données obtenues par cette évaluation d'activité antibactérienne des AgNPs synthétisées contre les souches bactériennes étudiées, nous ont montré que dans les générations à venir, les nanoparticules d'argent seront utilisées comme un outil potentiel pour lutter contre l'augmentation rapide de la résistance aux antibiotiques.

Conclusion générale



Conclusion générale

L'objectif de ce travail était de réaliser deux synthèses d'AgNPs dont l'une est biologique dite verte (utilisant des algues brunes) et une synthèse chimique utilisant le citrate de sodium comme agent réducteur et de comparer entre leurs propriétés physico-chimiques ainsi que d'évaluer leurs activités antibactériennes.

Dans cette étude, nous avons démontré que l'extrait d'algue brune utilisé est un bon agent réducteur riche en composés qui agissent sur la réduction du nitrate d'argent pour l'obtention des nanoparticules d'argent comme observé dans notre expérience.

La caractérisation des nanoparticules d'argent bio et chimiquement synthétisées a été réalisée par plusieurs techniques d'analyses physico-chimiques, le changement de couleur en brun jaunâtre observé après réduction par l'extrait hydrosoluble et hydro éthanolique d'algue brune et en gris verdâtre par citrate de sodium est le premier indicateur de la formation des AgNPs. Cette dernière a été confirmée par UV-visible en représentant des pics d'absorption de 420 et 390 nm par les AgNPs HS et HE respectivement et un pic de 425 nm par les AgNPs CITR. La forme sphérique commune des nanoparticules d'argent était confirmée par analyse MEB et leur composition chimique a été validée par FTIR dont elle a démontré cinq pics de groupements similaires et d'autres différentes représentée à la surface des nanoparticules d'argent HS et HE par contre trois pics différents se sont retrouvés à la surface des nanoparticules d'argent CITR, une information à prendre en considération lors des applications biomédicales. La distribution de taille des nanoparticules et la charge de la surface des AgNPs ont été déterminés à l'aide de DLS et Potentiel Zeta respectivement en démontrant de différents pics de distribution de charge globale selon le type des nanoparticules analysé avec une bonne distribution chez les AgNPs hydro éthanoliques de 174,5 nm et une bonne stabilité de -38,5 mV chez les AgNPs hydrosolubles, ce qui explique l'efficacité de la synthèse biologique par rapport à la synthèse chimique. Les AgNPs ont montré une activité antibactérienne potentielle contre les agents pathogènes humains étudiés : *E. coli*, *S. aureus*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa* et *E. cloacae* avec des zones d'inhibition significatives dont nous avons obtenu des valeurs très élevées vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-) et *Staphylococcus aureus* (Gram+) par les nanoparticules d'argent hydrosolubles, on tire information que la synthèse biologique donne une activité antibactérienne efficace par rapport à la synthèse chimique ce qu'il nous incite à éviter l'utilisation de son effet bactéricide moyen.

Les perspectives d'avenir de cette recherche seraient :

- La production à grande échelle d'AgNPs utilisant l'extrait de cette algue brune et la vérification de son efficacité contre un large spectre de population microbienne.
- Une étude comparative entre l'utilisation de l'or et l'argent en synthétisant des nanoparticules d'argent et d'autres d'or par la synthèse verte.
- Une étude sur l'activité antioxydante et l'activité anticancéreuse des AgNPs biosynthétisées.
- Un profil de TEM serait un plus dans notre travail pour l'obtention de la taille exacte des particules ainsi qu'un profil de DRX afin d'identifier le ou les composés cristallisés présents dans les AgNPs synthétisées.
- Une modification de surface des AgNPs par des biomolécules pour but de diagnostic ou de thérapie.
- Réaliser une application biomédicale de diagnostic ou de thérapie par des AgNPs biosynthétisées qui sera bénéfique pour la santé humaine à l'échelle mondiale.

Références bibliographiques



(A)

Abiola Grace Femi-Adepoju , Adewumi Oluwasogo Dada , Kabir Opeyemi Otun , Adeyinka Olufemi Adepoju , Ojo Paul Fatobae (2019) , Green synthesis of silver nanoparticles using terrestrial fern (*Gleichenia Pectinata* (Willd.) C. Presl.): characterization and antimicrobial studies.

Akram A Alfuraydi , SandanasamyDevanesan , Mysoon Al-Ansari , Mohamad S AlSalhi , Amirtham J Ranjitsingh , (2019) , Eco-friendly green synthesis of silver nanoparticles from the sesame oil cake and its potential anticancer and antimicrobial activities, doi:10.1016/j.jphotobiol.2019.01.011.

Allhoff F. (2009), « The Coming Era of Nanomedicine », *The American Journal of Bioethics*, 9/10, p. 3-11.

Anal K. Jha, K. Prasad, Kamlesh Prasad, A.R. Kulkarni, (2009) , Plant system: Nature's nanofactory , *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* Volume 73, Issue 2, 15 October 2009, Pages 219-223.

Angélique S.D., Audureau E., Franco M., et al., (2018). Substantial modification of the gene expression profile following exposure of macrophages to welding-related nanoparticles. *J Sci Rep.* ; 4 ;8(1) :8554. doi: 10.1038/s41598-018-26988-z.

Ashwanikumar, N., Kumar, N.A., Asha Nair, S., Vinod Kumar, G.S., (2014). 5- Fluorouracil–lipid conjugate :potential candidate for drug delivery through encapsulation in hydrophobic polyester-based nanoparticles. *Acta Biomater.* 10 (11), 4685–4694.

(B)

Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H., (2012). Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208 (3), 286–292.

Benjamin Wiley, Yugang Sun Dr., Brian Mayers Dr., Younan Xia Prof, 2004 , *Shape-Controlled Synthesis of Metal Nanostructures: The Case of Silver*.

Boca-Farcu, S., Potara, M., Simon, T., Juhem, A., Baldeck, P., Astilean, S., (2014). Folic acid-conjugated, SERS-labeled silver nanotriangles for multimodal detection and targeted photothermal treatment on human ovarian cancer cells. *Mol. Pharm.* 11 (2), 391–399.

Bogumiła Reidy, Andrea Haase, Andreas Luch, Kenneth A. Dawson, Iseult Lynch (2013), *Mechanisms of Silver Nanoparticle Release, Transformation and Toxicity: A Critical Review of Current Knowledge and Recommendations for Future Studies and Applications*, <https://doi.org/10.3390/ma6062295>.

Bo Pan and Baoshan Xing. (2010) *Manufactured Nanoparticles and Their Sorption of Organic Chemicals*, *Advances in Agronomy*, pages 137-181. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(10\)08003-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(10)08003-X).

(C)

C. AUPLAT et A. DELOMARLE, (2012), « Mieux comprendre les nouvelles opportunités liées aux nanotechnologies », *Entreprendre & Innover* vol.16, n°4, p.65.

Carvalho, S.M., Leonel, A.G., Mansur, A.A.P., Carvalho, I.C., Krambrock, K., Mansur, H. S.,(2019). Bifunctional magneto-polymersomes of iron oxide nanoparticles and carboxymethyl cellulose conjugated with doxorubicin for hyperthermochemotherapy of brain cancer cells. *Biomater. Sci.* 7 (5), 2102–2122.

Cecilia Jimenez-Lopez, Catarina Lourenço-Lopes, Paula Garcia-Oliveira ,Maria Carpena, Maria Fraga-Corral, ,Antia G. Pereira,Miguel A. Prieto , andJesus Simal-Gandara, (2020) , *Scientific Approaches on Extraction, Purification and Stability for the Commercialization of Fucoxanthin Recovered from Brown Algae* .

Chandrasekaran Rajkuberan, Seetharaman Prabukumar, Gnasekar Sathishkumar, Arockiasamy Wilson, Keepanan Ravindran, Sivaperumal Sivaramakrishnan (2017), Facile synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia antiquorum* L. latex extract and evaluation of their biomedical perspectives as anticancer agents.

Chen X, Mao SS. Titanium dioxide nanomaterials :synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem. Rev*, (2007) Jul;107(7):2891–959.

COMITÉ DE LA PRÉVENTION ET DE LA PRÉCAUTION. NANOTECHNOLOGIES NANOPARTICULES QUELS DANGERS, QUELS RISQUES ? [En ligne]. Mai (2006)

Cristina Buzea , Ivan I. Pachecob, Kevin Robbicc , (2007) , *Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity*.

(D)

David D. Evanoff , George Chumanov (2004) , *Size-Controlled Synthesis of Nanoparticles*. 1. “Silver-Only” Aqueous Suspensions via Hydrogen Reduction.

Deene Manikprabhu , Juan Cheng , Wei Chen , Anil Kumar Sunkara , Sunilkumar B Mane , Ram Kumar , Mousumi das , Wael N Hozzein , Yan-Qing Duan , Wen-Jun Li (2016) ; Sunlight mediated synthesis of silver nanoparticles by a novel actinobacterium (*Sinomonas mesophila* MPKL 26) and its antimicrobial activity against multi drug resistant *Staphylococcus aureus* .

D.MubarakAli ,N.Thajuddin, K.Jeganathan, M.Gunasekaran ,(2011) , Plant extract mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and its antibacterial activity against clinically isolated pathogens, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.03.009>.

Dominique Gennet, Christian Ley , (2004), *Introduction à la spectroscopie Infrarouge (I.R.)* , Culture Sciences-Chimie.

Drexler, K. E. & Macé, M. (2005) ;Engins de création (Paris, Vuibert) .

(E)

El-Naggar, N.E.A., Hussein, M.H., El-Sawah, A.A., (2017). Bio-fabrication of silver nanoparticles by phycocyanin, characterization, in vitro anticancer activity against breast cancer cell line and in vivo cytotoxicity. *Sci. Rep.* 7 (1), 1–20.

El-Sayed, M.A. (2001) Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes. *Accounts of Chemical Research*, 34, 257-264.

Eric Gaffet (2008), *Nano Matériaux : Différentes voies de synthèse, propriétés, applications et marchés*.

Eric Gaffet, (2011), *Nanomaterials : A review of the definitions, applications, health effects. How to implement secure development*.

(F)

Fahriye TAŞKIRAN, Deniz UZUNOĞLU, Ayla ÖZER (2017), Biosynthesis, characterisation and determination of adsorbent properties of silver nanoparticles with cyprus acacia (*acacia cyanophylla*) leaf extract , <https://doi.org/10.18038/aubtda.299006>.

Feynman, Richard P. (1960) ; *There's Plenty of Room at the Bottom*. *Engineering and Science*, 23 (5). pp. 22-36.

Freitas R. A. (2009), « Welcome to the Future of Medicine », *Studies in Health Technology and Informatics*, 149, p. 251-256.

(G)

Garon-Lardiere Sandrine (2004). *Etude structurale des polysaccharides pariétaux de l'algue rouge Asparagopsis armata (Bonnemaisoniales)*. PhD Thesis, Université de Bretagne.

Gary-Bobo M, Vaillant O, Maynadier M, Basile I, Gallud A, El Cheikh K, Bouffard E, Morere A, Rebillard X, Puche P, Nirde P, Garcia M. (2013). Targeting multiplicity: the key factor for anti-cancer nanoparticles. *Curr Med Chem* 20(15):1946-1955.

Gordon Pedersen, Bryan Frank , (2013) *The Most Precious Metal Book* , Volume ; 98 pages.

Guo, J., O'Driscoll, C.M., Holmes, J.D., Rahme, K., (2016). Bioconjugated gold nanoparticles enhance cellular uptake :a proof of concept study for siRNA delivery in prostate cancer cells. *Int. J. Pharm.* 509 (1-2), 16–27.

(I)

Instituts de recherche en santé du Canada (2006), Médecine régénératrice et nanomédecine. Investir aujourd'hui dans les promesses de demain, Ottawa, Instituts de recherche en santé du Canada.

(J)

J. ARNAULD, (2011) « Nanotechnologies. De retour d'un débat national », Revue Ethique et Théologie Morale, vol.264, n°2, p.109.

J. Wesley Alexander, (2008), History of the Medical Use of Silver <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>.

Jayendra Kesharwani , Ki-Young Yoon , Jungho Hwang , Mahendra Rai , 2009 ; Phytofabrication of Silver Nanoparticles by Leaf Extract of Datura metel: Hypothetical Mechanism Involved in Synthesis.

João Conde , Gonçalo Doria, Pedro Baptista,(2012) .Noble metal nanoparticles applications in cancer. doi: 10.1155/2012/751075.

J. SCHUMMER, (2007) « Identifier les questions éthiques des nanotechnologies », in Henk A.M.J.T. HAVE (dir.), Nanotechnologies, éthique et politique, UNESCO, p.87.

(K)

Kadukova JS, Velgosova O, Vosatka M, Lukavsky J, Dodd J, Willner J, Fornalczyk, A. (2017) ; Control over the biological synthesis of Ag nanoparticles by selection of the specific algal species. Archives of Metallurgy and Materials.

Kasivelu Govindaraju, Sabjan Khaleel Basha, Vijayakumar Ganesh Kumar, Ganesan Singaravelu (2008) ,Silver, gold and bimetallic nanoparticles production using single-cell protein (Spirulina platensis) Geitler.

Ke Zhang ,Xiaodong Liu ,Samson Oliver Abraham Samuel Ravi, Arunkumar Ramachandran, Ibrahim Abdel Aziz Ibrahim (2019) , Synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) from leaf extract of Salvia miltiorrhiza and its anticancer potential in human prostate cancer LNCaP cell lines.

Khan, I., Abdalla, A., Qurashi, A., (2017). Synthesis of hierarchical WO₃ and Bi₂O₃/WO₃ nanocomposite for solar-driven water splitting applications. Int. J. Hydrogen Energy 42, 3431–3439.

Khatoon, N., Alam, H., Khan, A., Raza, K., Sardar, M.,(2019). Ampicillin silver nanoformulations against multidrug-resistant bacteria. Sci. Rep. 9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43309-0>.

Kievit, F.M., Wang, F.Y., Fang, C., Mok, H., Wang, K., Silber, J.R., Ellenbogen, R.G., Zhang, M.,(2011). Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multi drug resistance in cancer in vitro. *J. Control. Release* 152 (1), 76–83

Krishna Gudikandula & Singara Charya Maringanti ,(2016), Synthesis of silver nanoparticles by chemical and biological methods and their antimicrobial properties, <https://doi.org/10.1080/17458080.2016.1139196>.

Kruszewski, M., Brzoska, K., Brunborg, G., Asare, N., Dobrzyn' ska, M., Dušinská, M., Lankoff, A., (2011). Toxicity of silver nanomaterials in higher eukaryotes. In: *Advances in Molecular Toxicology*. Elsevier, pp. 179–218.

Kumar B, Kumari S, Cumbal L, Debut A. (2014). “Synthesis of silver nanoparticles using *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis* L.) leaf extracts” *Saudi Journal of Biological Science*.

Kumari Jyoti, Mamta Baunthiyal, Ajeet Singh,(2016) , Characterization of silver nanoparticles synthesized using *Urtica dioica* Linn. leaves and their synergistic effects with antibiotics, <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2015.10.002>.

(L)

L Canivet , P Dubot , G Garçon , F-O Denayer,(2015).Effects of engineered iron nanoparticles on the bryophyte, *Physcomitrella patens* (Hedw.)Bruch & Schimp, after foliar exposure, PMID: 25576736 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.12.035

Li, Y., Guo, M., Lin, Z., Zhao, M., Xiao, M., Wang, C., Zhu, B.,(2016). Polyethylenimine functionalized silver nanoparticle-based co-delivery of paclitaxel to induce HepG2 cell apoptosis. *Int. J. Nanomed.* 11, 6693.

Link S., Ei-Sayed M.A,(2003) ,Optical Properties and Ultrafast Dynamics of Metallic Nanocrystals ,*Annual Review of Physical Chemistry*.

Ludivine CANIVET. Les nanoparticules et les nanotechnologies [Cours], 2015 – 2016.

(M)

Mahmoodreza Behravan, Ayat Hossein Panahi, Ali Naghizadeh , Masood Ziaee ,Roya Mahdavi ,Aliyar Mirzapour, (2018) , Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Berberis vulgaris* leaf and root aqueous extract and its antibacterial activity.

Mahsa Zarei, Ehsan Karimi ,Ehsan Oskoueian ,Ali Es-Haghi , Mohammad Ehsan Taghavi Zadeh Yazdi (2020) ; Comparative Study on the Biological Effects of Sodium Citrate-Based and Apigenin-Based Synthesized Silver Nanoparticles.

Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V., (2010). A review of the antibacterialeffects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanopart. Res.* 12 (5), 1531–1551.

Marina E. Vance, Todd Kuiken , Eric P. Vejerano, Sean P. McGinnis, Michael F. Hochella Jr., David Rejeski and Matthew S. Hull1 ,(2015), Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. , 6, 1769-1780,<https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>.

Martinez-Boubeta, C., Simeonidis, K., Makridis, A., Angelakeris, M., Iglesias, O., Guardia, P., Cabot, A., Yedra, L., Estradé, S., Peiró, F., Saghi, Z., Midgley, P.A., Conde- Leborán, I., Serantes, D., Baldomir, D., (2013). Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. *Sci. Rep.* 3 (1). <https://doi.org/10.1038/srep01652>.

Mathieu Noury, Céline lafontaine, June (2014), De la nanomédecine à la nanosanté : vers un nouveau paradigme biomédical *Socio-anthropologie* 29(29):13-35 DOI:10.4000/socio-anthropologie.1635.

Michalet X, Pinaud FF, Bentolila LA, Tsay JM, Doose S, Li JJ, et al (2005). Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics.

M. Maghimaa, Sulaiman Ali Alharbi ,(2020), Green synthesis of silver nanoparticles from *Curcuma longa* L. and coating on the cotton fabrics for antimicrobial applications and wound healing activity.

Mohammad Mousavi-Khattat, MehrnazKeyhanfar ,AmirRazmjou, (2018), A comparative study of stability, antioxidant, DNA cleavage and antibacterial activities of green and chemically synthesized silver nanoparticles.

Mohamed Taha Yassin, Ashraf Abdel-Fattah Mostafa, Abdulaziz Abdulrahman Al-Askar, Fatimah O. Al-Otibi , (2022), Facile Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aqueous Leaf Extract of *Origanum majorana* with Potential Bioactivity against Multidrug Resistant Bacterial Strains.

Mohammed Rafi Shaik,Ghadeer H. Albalawi , Shams Tabrez Khan, Merajuddin Khan ,Syed Farooq Adil, Mufsir Kuniyil, Abdulrahman Al-Warthan, Mohammed Rafiq H. Siddiqui. Hamad Z.Alkhatlan , Mujeeb Khan , (2016) , Miswak” Based Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Evaluation and Comparison of Their Microbicidal Activities with the Chemical Synthesis.

More Sonal Bhasker, Belapurkar Pooja, Patil Gaurav, Mohan Mahalaxmi, (2018), Toxicity of Silver Nanoparticles , *International Journal of Advance Research and Development*.

Morones, J.R., Elechiguerra, J.L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J.B., Ramírez, J.T., Yacaman, M.J., (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 16 (10), 2346.

Morris MC. (2012) Cancer et nanotechnologie. Innovation en diagnostic, vectorisation et thérapeutique. Rayonnement du CNRS. 2012 ;58.

Mostafa A. El-Sayed, (2001). Some Interesting Properties of Metals Confined in Time and Nanometer Space of Different Shapes , <https://doi.org/10.1021/ar960016n>.

Muhammad Jamshed Khan, Kamyar Shameli , Awis Qurni Sazili , Jinap Selamat , Suriya Kumari (2019) , Rapid Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles Arbitrated by Curcumin in an Alkaline Medium.

Muhammad R., Sadaf I., Rafique M., et al., (2016). A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal. ; 45(7) : 1272–1291. doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792.

Munesh Kumar, Ravi Berwal, Minakshi Lalit, Rawal Kumar, Rajesh Thakur , (2017), Plant-mediated Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Antibacterial Activities.

(N)

Nath S.S., Gope D.G. (2007) Synthesis of CdS and ZnS quantum dots and their applications in Electronics. Nano Trends. 2007 ;2 :20–28.

Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environ. Sci. Technol. 42 (23), 8959–8964.

N Jayaprakash, J Judith Vijaya, K Kaviyarasu, K Kombaiah, L John Kennedy, R Jothi Ramalingam , Murugan A Munusamy , Hamad A Al-Lohedan, (2017) , Green synthesis of Ag nanoparticles using Tamarind fruit extract for the antibacterial studies.

Noginov M.A., Zhu G., Bahoura M., Adegoke J., Small C., Ritzo B.A., Draciev V.P., Siialaev V.M. (2007) The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. Appl. Phys. B. 2007 ;86 :455–460. doi: 10.1007/s00340-006-2401-0.

(P)

Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. (2012) Nanoparticles in dermatology. Arch. Dermatol. Res. [Internet]. 2011 Oct [cited 2012 Oct 26] ;303(8):533–50. Available from : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21837474>

Patrick-Yves Badillo, Julien Haccoun, Didier Théron .January (2012) ; Les nanotechnologies : un nouveau paradigme.

Pereira, Antia G. ; Jimenez-Lopez, Cecilia ; Fraga, Maria ; Lourenço-Lopes, Catarina ; García-Oliveira, Paula; Lorenzo, Jose M.; Perez-Lamela, Concepcion; Prieto, Miguel A.; Simal- Gandara,

Jesus, (2020) , Extraction, Properties, and Applications of Bioactive Compounds Obtained from Microalgae,

Petros RA, De Simone JM. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov* 9(8):615-627.

Prabhu S, Poulouse EK. (2012) Silver nanoparticles:mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int Nano Lett.* 2012;2:32.

Prem Santhi Yerragopu, Sharanagouda Hiregoudar, Udaykumar Nidoni,K. T. Ramappa1, A. G. Sreenivas and S. R. Doddagoudar,(2020), Chemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Tri-sodium Citrate, Stability Study and Their Characterization.

Ponce A.G., Fritz R., Del Valle C., Roura S. I. (2003). Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensmittel- Wissenschaft und Technologic*, 36, 679-684.

(R)

R. Geethalakshmi, D. Sarada,(2010) , Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Trianthema decandra* extract and evaluation of their anti-microbial activities.

R. Ragupathi Raja Kannan ,R. Arumugam ,D. Ramya ,K. Manivannan , P. Anantharaman (2013) Green synthesis of silver nanoparticles using marine macroalga *Chaetomorpha linum*.

Raj Kuberan , Prabu Kumar Seetharaman , Gnansekar Sathishkumar , Arockiasamy Wilson , Keppanan Ravindran , Sivaperumal Sivaramakrishnan (2016) ; Facile synthesis of silver nanoparticles using *Euphorbia antiqorum* L. latex extract and evaluation of their biomedical perspectives as anticancer agents

Rajeshkumar S., Bharath L.V., (2017). Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. *Chemico-Biological Interactions Journal*. doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.019.

Ravichandran, V., Vasanthi, S., Shalini, S., Shah, S. A. A., Tripathy, M., &Paliwal, N. (2019). Green synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant and photocatalytic activity of *parkia speciosa* leaves extract mediated silver nanoparticles. *Results in Physics*, 15, 102565.

Remziye Güzel Gülbahar Erdal, (2018), Synthesis of Silver Nanoparticles, doi :10.5772/intechopen.75363.

Ronald Wennersten ,Jan Fidler, Anna Spitsyna (2008) ,Nanotechnology: A New Technological Revolution in the 21st Century,DOI:10.1007/978-1-84800-131-2_57.

Roohi Fatima , Monisha Priya , Lavanya Indurthi , Vidya Radhakrishnan , Raja Sudhakaran, (2020), Biosynthesis of silver nanoparticles using red algae *Portieria hornemannii* and its antibacterial activity against fish pathogens, DOI: 10.1016/j.micpath.2019.103780.

(S)

Sankar Narayan Sinha, Dipak Paul, Nilu Halder, Dipta Sengupta, Samir Kumar Patra (2014), Green synthesis of silver nanoparticles using fresh water green alga *Pithophora oedogonia* (Mont.) Wittrock and evaluation of their antibacterial activity.

Selon l'Organisation internationale de normalisation (ci-après « ISO), sous ISO/TS 1818110 : 2015.

Shakeel Ahmed, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, Saiqa Ikram ,(2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications : A green expertise. doi: 10.1016/j.jare.2015.02.007.

Shanmugam Rajeshkumar, Chelladurai Malarkodi, Kanniah Paulkumar, Mahendran Vanaja, Gnanadas Gnanajobitha, and Gurusamy Annadurai , (2014) , Algae Mediated Green Fabrication of Silver Nanoparticles and Examination of Its Antifungal Activity against Clinical Pathogens.

Stéphane Berciaud, Laurent Cognet, Philippe Tamarat, and Brahim Lounis , (2005), Observation of Intrinsic Size Effects in the Optical Response of Individual Gold Nanoparticles , <https://doi.org/10.1021/nl050062t>.

Suriati , M. Mariatti , A. Azizan, (2014), Synthesis of silver nanoparticles by chemical reduction method: effect of reducing agent and surfactant concentration.

(T)

Tahany Haggag , Elham F. Mahmoud, (2018), Histological study of reparative capacity of silver nanoparticles on age related changes of alveolar bone, cementum and periodontal ligament in rats.

Tanur Sinha, Venkatesh Gude , Nandiraju v s Rao, (2012) , Synthesis of Silver Nanoparticles Using Sodium Dodecylsulphate.

T. Kathiraven, A. Sundaramanickam N. Shanmugam , T. Balasubramanian , (2014) , Green synthesis of silver nanoparticles using marine algae *Caulerpa racemosa* and their antibacterial activity against some human pathogens.

(V)

Vinardell, M.P., Mitjans, M., (2015). Antitumor activities of metal oxide nanoparticles. *Nanomaterials* 5 (2), 1004–1021.

(W)

Wang S, Wang H, Liu Z, Wang L, Wang X, Su L, Chang J. (2014). Smart pH- and reduction-dual-responsive folate-PEG-coated polymeric lipid vesicles for tumor-triggered targeted drug delivery. *Nanoscale* 6(13):7635-7642.

W.djeghboub, thèse de doctorat, (2010) « Nanoparticules d'or et d'argent déposées sur oxyde de cérium synthétisées sous irradiation », université Constantine.

Wu, P.J., Ou, K.L., Chen, J.K., Fang, H.P., Tzing, S.H., Lin, W.X., Chang, J.Y., (2014). Methotrexate-conjugated AgInS₂/ZnS quantum dots for optical imaging and drug delivery. *Mater. Lett.* 128, 412–416.

(Y)

Yeh, C.Y., Hsiao, J.K., Wang, Y.P., Lan, C.H., Wu, H.C., (2016). Peptide-conjugated nanoparticles for targeted imaging and therapy of prostate cancer. *Biomaterials* 99, 1–15.

Yin, J., Yang, Y., Hu, Z., Deng, B., (2013). Attachment of silver nanoparticles (AgNPs) onto thin-film composite (TFC) membranes through covalent bonding to reduce membrane biofouling. *J. Membr. Sci.* 441, 73–82

Yon Ju-Nam, Jamie R Lead,(2008), Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *Journal Science of the Total Environment*, pages 396-414.

Yuan, Y.G., Wang, Y.H., Xing, H.H., Gurunathan, S., (2017). Quercetin-mediated synthesis of graphene oxide–silver nanoparticle nanocomposites : asuitable alternative nanotherapy for neuroblastoma. *Int. J. Nanomed.* 12, 5819.

(Z)

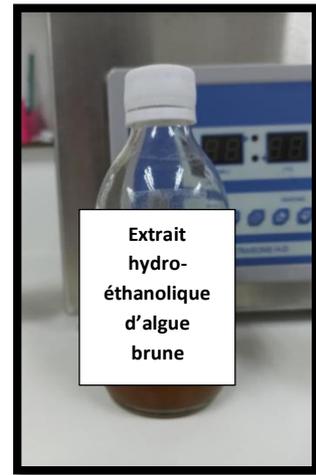
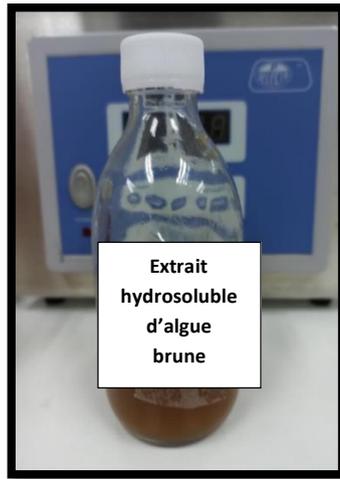
Zheng, K., Setyawati, M.I., Leong, D.T., Xie, J., (2018). Antimicrobial silver nanomaterials. *Coord. Chem. Rev.* 357, 1–17.

Zhou, Z., Kong, B., Yu, C., Shi, X., Wang, M., Liu, W., Yang, S., (2014). Tungsten oxide nanorods: an efficient nanoplatform for tumor CT imaging and photothermal therapy. *Sci. Rep.* 4, 3653.

Annexes



Annexe 01



Photos réelle des deux extraits d'algue brune (hydrosoluble / hydréthanolique)

Annexe 02

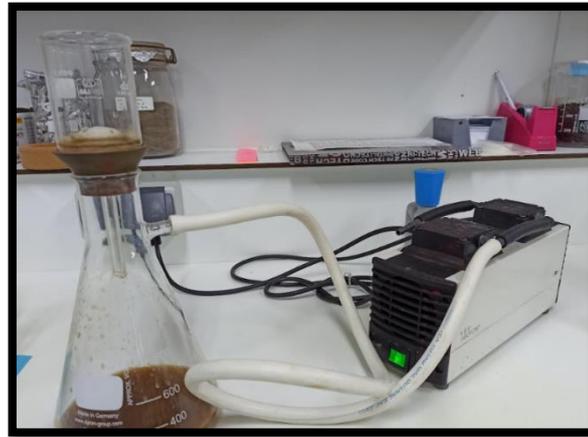
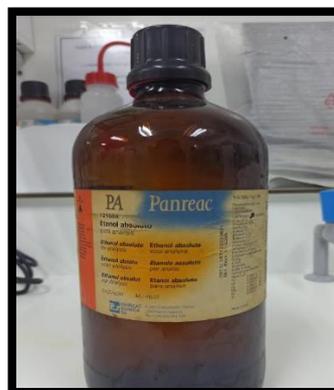


Photo réelle de dispositif de filtration

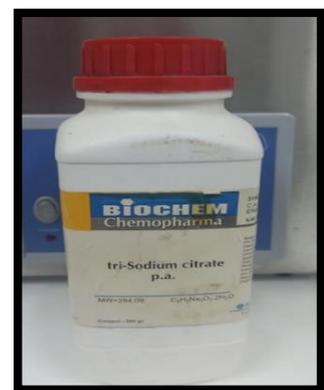
Annexe 03



Nitrate d'argent



Alcool Ethanol



Citrate de sodium

Photos réelles des produits chimiques utilisés

Annexe 04



Photo réelle de la poudre d'algue brune utilisé

Annexe 05



Balance électrique



Centrifugeuse



MEB



Appareil de DLS



Vortex



Etuve



FTIR



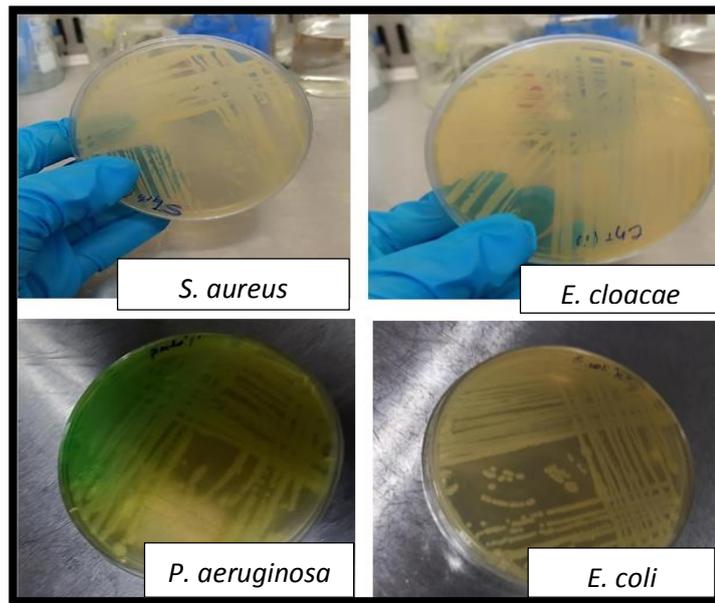
Sonde de sonification



UV Visible

Photos réelles du matériel utilisés

Annexe 06



Photos réelles de repiquage des souches bactériennes étudiées

Annexe 07

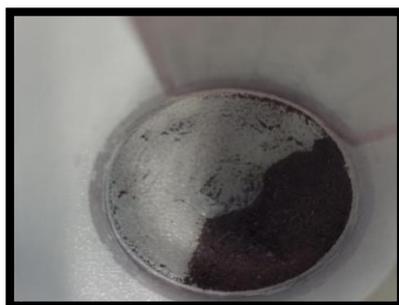


Photo réelle de l'aspect de la poudre des AgNPs obtenues