

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

UNIVERSITÉ de BLIDA 1

Faculté de Technologie

Département de Génie des Procédés



Mémoire

En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER EN GENIE DES PROCEDES

Spécialité : pharmacie industrielle

Intitulé du mémoire

**Biosynthèse des nanoparticules d'argent :
caractérisation et application**

Présenté par :

M^{elle} LANDJAS Soumia

M^{elle} HADJ BACHIR zahra

Encadré par :

Dr.BRAHIM meriem

Année universitaire 2022/2023

ملخص

ترتكز هذه الدراسة على تصنيع جسيمات الفضة النانوية بالطريقة الخضراء باستخدام خمسة محاليل من المستخلصات المائية لنبات شجرة النيم البري ونبته الفليون بالإضافة إلى خليطهما بكميات حجمية مختلفة كمخفضات حيوية لأيونات الفضة

توصف محاليل AgNPs ب: الأشعة تحت الحمراء والأشعة فوق البنفسجية المرئية وإمكانات زيتا وبالإضافة إلى

DRX

تم استخدام محلول AgNPs ذو الامتصاص الأفضل في النطاق المرئي للأشعة فوق البنفسجية كعنصر نشط لصناعة

كريم مضاد للفطريات

تم توصيف هذه الصيغة لاحقًا من الناحية الحسية والبيولوجية والمكروبيولوجية.

Résumé

Cette étude porte sur la synthèse des nanoparticules d'argent par procédé vert en utilisant des extraits aqueux des plantes *Mentha pulegium* L. et *Melia azedarach* ainsi que leurs mélanges d'extrait à différentes teneurs en volume, comme des bioréducteurs des ions d'argent.

Les solutions des AgNPs ainsi obtenues sont caractérisées par: infrarouge (FTIR), UV-visible, potentiel zêta et DRX.

La solution des AgNPs à une meilleure absorbance dans le domaine UV-visible à été utilisé comme principe actif pour la formulation d'une crème antifongique.

Cette formulation à été par la suite caractérisées organoleptiquement, rhéologiquement et microbiologiquement.

Abstract

This study focuses on the synthesis of silver nanoparticles by a green process using aqueous extracts of the plants *Mentha pulegium* L. and *Melia azedarach* as well as their extract mixtures at different volume contents, as bioreducers of silver ions.

The solutions of AgNPs thus obtained are characterized by: infrared (FTIR), UV-visible, zeta potential and XRD.

The AgNPs solution with better absorbance in the UV-visible range was used as an active ingredient for the formulation of an antifungal cream.

This formulation was subsequently characterized organoleptically, rheologically and microbiologically



Dédicace

Je dédie ce modeste travail tout d'abord à mes très chères parents, mes conseillers, ma raison de vivre, mes sources de force, d'inspiration, de courage et d'espoirs ; L'éducation que vous m'avez transmise, les valeurs que vous m'avez inculqué, vos innombrables sacrifices, vos soutiens et ses prières, font de moi aujourd'hui tout ce que je suis.

Puisse Allah vous accorder une très longue vie.

A tous les professeurs qui mon enseigne tout au long de mon cursus, sans qui je n'aurais jamais atteint ce niveau. A toute la promotion 2023, pour leurs encouragements, dévouement et leur soutien inébranlable.

A tous mes frères et sœurs pour les soutiens et accompagnement dans ce cadre.

A vous tous qui avez et qui auront une place importante dans mon cœur et ma vie.

LANDJAS SOUMIA



Dédicace

J'ai l'immense plaisir de dédier ce modeste travail: A ma très chère mère et mon père qui m'ont toujours poussé à être la meilleure merci pour leur soutien, leur sacrifice, leur amour et leur irremplaçable présence.

A mon frère Abdelhakim, je lui exprime mes sentiments de fraternité et d'amour à travers ce travail.

A ma sœur et ma nièce Meriem que j'aime beaucoup et qui m'ont apporté un grand soutien moral tout au long de mon travail.

A ma collègue et mon amie zoubida ammamri qui m'a aidée et elle était toujours à mes côtés pendant mon parcours.

Et je n'oublie certainement pas mon cher mari et sa mère. Pour être à mes côtés et élever mon esprit et toujours pousser pour plus de succès

Nos sincères et vifs remerciements s'adressent également à tous nos proches, famille et amis, qui nous ont aidés, soutenus, encouragés et accompagnés tout au long de la réalisation de ce travail.

Nos remerciements s'adressent également à tous nos professeurs pour leur générosité et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges administratives et pédagogique

HADJBACHIR ZAHRA

Remerciements

Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer nos remerciements et notre profonde gratitude avant tout à Dieu qui nous a donné la force, le courage et la volonté d'élaborer ce mémoire scientifique

Nos sincères remerciements vont à Mr MATTAY, pour son aide précieuse. Nous lui exprimons notre gratitude pour sa disponibilité, sa compréhension et ces encouragements.

Nous exprimons également nos plus vifs remerciements à Mme MERIEM BRAHIM pour avoir accepté d'encadrer notre travail

Nous tenons aussi à exprimer nos sincères remerciements à Madame, HANIYA ingénieure de laboratoire, Mr RACHID, et Mr TAHAR.

Nous remercions vivement également messieurs les membres de jury Pour l'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant de juger notre travail.

Finalement, nous exprimons chaleureusement nos profondes gratitudees à nos familles qui nous ont toujours soutenu et encouragé. Ainsi que l'ensemble des enseignants qui ont contribué à notre formation....

SOMMAIRE

Sommaire

Liste des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction générale	1
Généralité sur les plantes médicinales	
1. Plantes médicinales.....	3
1.1. Généralité sur les plantes médicinales.....	3
1.2. Origine des plantes médicinales.....	3
1.2.1. Plantes spontanées.....	3
1.2.2. Plantes cultivées.....	4
1.3. Définition de la phytothérapie.....	4
1.3.1. Phytothérapie en Algérie.....	4
1.3.2. Avantages de la phytothérapie.....	4
1.4. Lilas de Perse (<i>Melia azedarach</i>), faux Neem.....	5
1.4.1. Généralité sur le faux Neem.....	5
1.4.2. Composition chimique de faux Neem.....	5
1.4.3. Origine et distribution géographiques de faux Neem.....	6
1.4.4. Description botanique de faux Neem.....	6
1.4.5. Utilisations médicinales traditionnelles de faux Neem.....	7
1.4.6. Utilisations traditionnelles.....	7
1.4.7. Utilisations pharmaceutiques.....	7
1.5. Menthe pouliot (<i>Mentha pulegium</i> L.).....	8
1.5.1. Généralité sur les Menthes.....	8
1.5.2 . Généralité sur les Menthes pouliot	8
1.5.3. Composition chimique de la menthe pouliot.....	9
1.5.4. Origine et distribution géographiques de la mente pouliot.....	9
1.5.5. Description botanique de la menthe pouliot.....	9
1.5.6. Utilisations médicinales traditionnelles de la menthe pouliot.....	10
1.5.7. Utilisations médicinales.....	10

Généralité sur les nanoparticules

2. Généralité sur les nanoparticules.....	11
2.1. Définition de Nanoparticules.....	11
2.2. Origine des nanoparticules.....	12
2.2.1 Les nanoparticules naturelles.....	12
2.2.2 Les nanoparticules artificielles (industrielles ou manufacturées).....	12
2.2.3 Les nanoparticules accidentelles.....	12
2.3 Les nanoparticules d'argent.....	12
2.3.1 Définitions.....	12
2.3.2 Les propriétés des nanoparticules d'argent.....	13
2.3.2.1 Propriétés physiques et chimiques de l'argent.....	13
2.3.2.2 Propriétés biocides de l'argent.....	13
2.3.2.3 Propriété désodorisante.....	13
2.3.3. Les méthodes de synthèses d'AgNPs.....	14
2.3.3.1 Méthodes physiques.....	14
2.3.3.2 Méthodes chimiques.....	14
2.3.3.3 Les méthodes biologiques (la bio-réduction).....	14
2.3.3.4 Les bactéries.....	14
2.3.3.5 Les champignons.....	15
2.3.3.6 Les plantes.....	15

Matériels et méthodes

3. Synthèse verte des Nanoparticules d'argent.....	17
3.1 Mécanisme de formation de nanoparticules d'argent.....	18
3.1.1 La nucléation	18
3.1.2 La croissance.....	19
3.1.3 Le murissement.....	19
3.2 caractérisation des nanoparticules d'argent	19
3.3 Applications médicales des nanoparticules d'argent.....	20
3.3.1 Implants cardiovasculaires.....	20
3.3.2 Cathéters.....	20
3.3.3 Pansements.....	20

3.3.4 Dentisterie.....	20
3.3.5 Tissus imprégnés de nanoparticules pour vêtements cliniques.....	21
3.3.6 Utilisation de nanomatériaux pour l'administration de médicaments.....	21
3.4. Activités biologiques des nanoparticules d'argent.....	21
3.4.1 Activités antibactérienne	21
3.4.2 Activités antifongique	22
3.4.3 Activités anti-inflammatoire.....	22
3.4.4 Activité antiviral	22
3.4.5 Activité Anti cancéreuse.....	22
3.5.6 Activité antidiabétique.....	23
3.5.5 La toxicité des AgNPs3.....	23

Résultats et discussion

4. Matériel et méthode.....	24
4.1 Matériel utilisé.....	24
4.1.1 Balance électrique.....	24
4.1.2 Agitateur magnétique chauffant.....	24
4.1.3Homogénéiseur.....	24
4.1.4 Microscope optique.....	24
4.1.5 PH mètre.....	24
4.1.6 Centrifugeuse.....	24
4.1.7 Chauffe ballon.....	25
4.1.8 Spectroscopie UV-Vis.....	25
4.1.9 La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).....	25
4.1.10 Diffraction des rayons X (DRX).....	25
4.1.11 Potentiels zêtas.....	25
4.2 Produit utilisés.....	25
4.2.1 Matière végétale utilisés	25
4.2.2 Réactif.....	26
4.2.3 Présentation des excipients de la formulation.....	26
4.2.3.1 Émulsifiants.....	26

4.2.3.2 Acidifiants.....	27
4.2.3.3 Agents stabilisant.....	27
4.3 caractérisation des solutions d'argent colloïdal	27
4.3.1 UV-visible.....	27
4.3.2 La spectroscopie Infrarouge à transformé de fourrier (FT-IR).....	28
4.3.3 Diffraction des rayons X (DRX).....	28
4.3.4 Potentiels zêtas.....	28
4.4 Méthode de biosynthèse des nanoparticules d'argent	29
4.4.1 La préparation de solution AgNO ₃	29
4.4.2 Préparation de l'extrait de plantes.....	30
4.4.3 Préparation des échantillons études	31
4.5 Méthodes de fabrication de la crème.....	32
4.5.1 Caractérisation de la crème	33
4.6 Activité antimicrobienne	33
4.6.1 Souches de référence utilisées	33
4.6.2 Application des disques d'antibactérienne	34
4.6.3 Méthode de diffusion sur gélose	34
4.6.3.1 Principe.....	34
4.6.3.2 Préparation des disques.....	34
4.6.3.3 Diffusion de la solution.....	35
Synthèse, caractérisation et application	
5. Résultats de la biosynthèse des AgNPs.....	36
5.1 Virage de couleur des solutions.....	36
5.2. Caractérisation des solutions colloïdales.....	38
5.2.1 pH mètre	38
5.2.2 UV-visible.....	39
5.2.3 Analyse des spectres FTIR	41
5.2.4 Potentiel zêta.....	45
5.2.5 Diffraction des rayons X (DRX).....	47
5.3 Formulation de la crème à base d'AgNPs	47
5.3.1 Caractérisation de la crème	47

5.3.1.1 Propriété organoleptique	48
5.3.1.2 Mesure de PH.....	48
5.3.1.3 Teste de centrifugation.....	49
5.3.1.4 Observation au microscope optique	49
5.3.1.5 Teste du comportement rhéologie	50
5.4 Activité antimicrobienne	51
Conclusion	54

Liste des abréviations

Ag : métal d'argent

AgNPs : nanoparticule d'argent

AgNPs : nanoparticules d'argent.

AgNO₃ : Nitrate d'argent

Ag₂O : Oxyde d'argent

Ag⁺ : Ion d'argent

Ag₀ : Argent de charge neutre

ABS : Absorbance

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HCl : Acide chlorhydrique

NPs : Nanoparticules

NaOH : Hydroxyde de sodium

PA: Principe actif

SPR : Résonance plasmonique de surface

Liste des figures

Figure 1 : Les plantes médicinales.

Figure 2 : Plante de faux Neem.

Figure 3 : Structure chimique de faux Neem.

Figure4 : Arbre de Neem et ses composants.

Figure 5 : Plante de la menthe pouliot

Figure 6: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques

Figure 7: Mécanisme de la biosynthèse des nanoparticules d'argent à base des bactéries

Figure 8: la réduction des AgNO_3 en nanoparticules d'argent

Figure 9 : les caractérisations des nanoparticules

Figure 10: Les mécanismes possibles des AgNPs à induire une cytotoxicité dans les lignées cellulaires cancéreuses

Figure11: Appareil d'UV-visible équipé d'un microordinateur

Figure 12 : Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Figure 13 : Potentiel zêta.

Figure14 : préparation de la Solution d' AgNO_3 .

Figure 15 : la macération de la plante de melia Azadirachta

Figure16 : Incorporation des matières premières

Figure 17 : la dissolution de laurylsulfate de sodium dans l'eau purifiée.

Figure18 : Disque à papiers Whatman de 6 mm de diamètre

Figure 19 : Principe de la méthode de diffusion par disque.

Figure20: Image représente le virage de couleur de la solution 1

Figure21: Image représente le virage de couleur de la solution 2

Figure: 22:Image représente le virage de couleur de la solution 3

Figure23: Image représente le virage de couleur de la solution 4

Figure24: Image représente le virage de couleur de la solution 5

Figure25: Valeurs des pH des cinq solutions

Figure26: Balayage des spectre des solutions d'AgNPs.

Figure 27: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées :solution 1

Figure 28: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées :solution 2

Figure 29: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées :solution 3

Figure 30: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées :solution 4

Figure 31: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées : solution 5

Figure 32: Résultats de DRX des AgNPs

Figure 33: l'aspect, couleur de la crème formulée à base d'AgNPs.

Figure 34 : appareille qui mesure le pH de la crème à base des AgNPs.

Figure 35 : Résultat de test de centrifugeuse

Figure 36 : Résultats de la crème au Microscope optique grossissement x60

Figure 37 : résultat d'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les 3 crèmes

Figure 38 : activité d'inhibition des AgNPs de la solution 5 et la crème contre 3 souches (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*)

Liste des tableaux

Tableau 1: propriété physique de l'argent

Tableau 2: les excipients utilisés dans la crème formulée

Le tableau 3: Méthode de synthèse de cinq solutions des AgNPs à base des extraits aqueux différents.

Tableau 4 : Résultat des spectres infrarouge de la solution 1

Tableau 5 : Résultat des spectres infrarouge de la solution 2

Tableau 6 : Résultat des spectres infrarouge de la solution 3

Tableau 7 : Résultat des spectres infrarouge de la solution 4

Tableau 8: Résultat des spectres infrarouge de la solution 5

Tableau 9: plage distribution de taille d'essais de la solution 2

Tableau 10 : plage distribution de taille d'essais de la solution 3

Tableau 11: plage distribution de taille d'essais de la solution 4

Tableau 12: plage distribution de taille d'essais de la solution 5

Tableau 13: Résultats de la stabilité des 5 solutions

Tableau 14 : Caractéristiques organoleptiques de la crème à base d'AgNPs.

Tableau 15 : Activité antibactérienne de la crème formulée et de la cinquième solution des AgNPs.

INTRODUCTION

GENERALE

Introduction générale

La dépendance de la vie humaine à l'égard des nanotechnologies trouve ses racines naturelles dans l'Ayurveda, un système de médecine indien vieux de 5 000 ans. Bien que la science moderne ait commencé à explorer le mot "nano", le système de médecine ayurvédique du XXI^e siècle utilise des métaux précieux tels que l'or et l'argent sous forme nano en tant que matériau de base pour diverses applications médicales [1].

La nanotechnologie est devenue l'un des domaines de recherche les plus passionnants et les plus vastes avec d'énormes opportunités [2]. En raison des propriétés exceptionnelles des nanoparticules, notamment une surface spécifique élevée et des propriétés magnétiques, mécaniques, optiques et chimiques, elles sont remarquablement prometteuses dans des domaines émergents tels que l'alimentation, la biomédecine, l'agriculture et la génétique [3].

Les Nanoparticules d'argent (AgNPs) jouent un rôle important en médecine et en biologie. [4] Le nano argent a été signalé comme ciment anticancéreux, antimicrobien, antiviral, dentaire et osseux, matériel de ligature des plaies et purificateur d'eau. [5]

Ces particules sont synthétisées selon différentes méthodes physiques et chimiques telles que la méthode de réduction en solution, la méthode de décomposition thermique et la méthode de réduction biologique qui sont chères et utilisent des substances toxiques, alors que les méthodes biologiques sont rentables, respectueuses de l'environnement et elles peuvent également être utilisées pour produire de grandes quantités de Nanoparticules de taille et de morphologie définies. Ces dernières années, la synthèse de nanoparticules en utilisant des ressources naturelles telles que des extraits de plantes, exprimer d'utiliser des enzymes et des micro-organismes comme agents réducteurs, agents de colmatage et stabilisants [6,7].

Dans ce contexte nous nous sommes intéressées à la synthèse et à la caractérisation des nanoparticules d'argent en utilisant des extraits aqueux de deux plantes médicinales à savoir *Mentha pulegium* L. et *Melia azedarach*, ainsi que leurs mélange d'extrait à des teneurs différentes en volume, et de la valoriser par une formulation pharmaceutique.

A cet égard notre mémoire s'est exposé sur cinq principaux chapitres : après une introduction générale ;

Les trois premiers chapitres portent sur une étude bibliographique sur les matières végétales utilisées et les nanoparticules ;

Le quatrième chapitre : donne l'ensemble des matériels utilisés et les méthodes suivies lors de cette recherche

Le cinquième chapitre : est dédié à la présentation et l'interprétation des résultats obtenus ; et enfin nous terminerons par une conclusion générale et quelques perspectives.

Chapitre1:

Généralité sur les plantes médicinales



1. Plantes médicinales

1.1. Généralité sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales sont l'ensemble des espèces végétales possédant des propriétés thérapeutiques, ces traitements naturels phytothérapeutiques peuvent s'avérer dans de nombreux cas plus économiques, plus efficaces, plus sûrs que bien des médicaments (moins d'effets secondaires), les plantes médicinales peuvent être un arbre, un buisson, un champignon, un légume, une racine, une algue. Depuis longtemps le but l'utilisation des plantes médicinales c'est : l'amélioration de la santé humaine «aujourd'hui elles sont exploitées à tous les niveaux notamment au niveau thérapeutique [8].



Figure 1 : Les plantes médicinales.

1.2. Origine des plantes médicinales

Elle porte sur deux origines à la fois. En premier lieu les plantes spontanées dites "sauvages" ou "de cueillette", puis en second les plantes cultivées :

1.2.1. Plantes spontanées

Elles furent les seules utilisées autre fois et représentent encore aujourd'hui un pourcentage notable du marché. Leur répartition dépend du sol et surtout du climat. Nous pouvons répertorier les principaux facteurs influençant leur développement ci-après.

Les plantules se développent efficacement et naturellement dans le sol qui leur est le plus favorable. Aussi les conditions climatiques exercent une part importante sur la répartition des plantes médicinales. C'est en fait un ensemble de plusieurs facteurs qui constitue le climat et ceux-ci vont donc permettre un développement plus ou moins poussé de la plante jeune [9].

1.2.2. Plantes cultivées

Les plantes médicinales sont cultivées pour plusieurs avantages en effet évidents :

- Disponibilité des plantes sans besoin d'aller dans la forêt pour détruire les espèces ;
- Apports substantiels de revenus pour les paysans qui les cultivent ;
- Disponibilité prévisible des plantes médicinales au moment voulu et en quantité voulue ;
- Disponibilité et protection des plantes actuellement rares ou en voie de disparition dans la nature ;
- Contrôle plus facile de la qualité, de la sécurité et de la propreté des plantes.

La teneur en principes actifs d'une plante médicinale varie avec l'organe considéré, mais aussi avec l'âge de la plante, l'époque de l'année et l'heure de la journée. Il y'a donc une grande variabilité dont il faut tenir compte pour récolter au moment le plus opportun [10].

1.3. Définition de la phytothérapie

Le terme « Phytothérapie », provient du grec « phyton » qui signifie « plante » et «thérapie» qui signifie « soigner ». La phytothérapie désigne la médecine basée sur les extraits de plantes et les principes actifs naturels [11].

La phytothérapie est une discipline qui studio les plantes médicinales donc est une façon de mettre à profit les propriétés médicinales des végétaux en utilisant les plantes sous forme de préparations dites "galéniques" afin de soigner ou de prévenir les maladies [12].

1.3.1. Phytothérapie en Algérie

En Algérie, les plantes médicinales et les remèdes n'ont jamais été abandonnés et les gens n'ont jamais cessé de faire appel à la phytothérapie traditionnelle [13]

L'Algérie est réputée par la richesse et la diversité de sa flore avec environ 4000 espèces végétales. Ces dernières constituent des remèdes naturels potentiels, qui peuvent être utilisés en traitement curatif et préventif [14]

1.3.2. Avantages de la phytothérapie

L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne et connaît actuellement un regain d'intérêt auprès du public. Il est possible d'utiliser les plantes entières ou les produits d'extraction qu'elles fournissent [15]. Il est estimé qu'au moins 25% de tous les médicaments modernes sont dérivés, directement ou indirectement, à partir de plantes médicinales,

principalement grâce à l'application des technologies modernes aux connaissances traditionnelles [16].

1.4. Lilas de Perse (*Melia azedarach*), faux Neem

1.4.1. Généralité sur le faux Neem

M.azedarach, connue sous le nom de chinaberry ou lilas de Perse est un arbre qui appartient à la famille des Méliacées [17]. Elle est généralement propagée par des graines et des boutures, et peut également être multipliée in vitro à partir de différents explants de jeunes plants et plantes matures [18]. Pendant de nombreuses années elle a été utilisée en Jordanie et en Afrique comme plante ornementale et d'ombrage résistant à la sécheresse [19]. Elle est plantée au Liban et d'autres pays méditerranéens pour avoir de l'ombre [20].



Figure 2: Plante de faux Neem.

1.4.2. Composition chimique de faux Neem

10-(acétyloxy)- 3,5-dihydroxy- 4-[(1*S*,2*S*,6*S*,8*S*,9*R*,11*S*)- 2-hydroxy- 11-méthyl- 5,7,10-trioxatétracyclo[6.3.1.0^{2,6}.0^{9,11}]dodec- 3-èn- 9-yl]- 4-méthyl- 8-[[*(2E)*- 2-méthylbut- 2-énoyl]oxy}octahydro- 1*H*-furo[3',4':4,4a]naphtho[1,8-*bc*]furan- 5,10a(8*H*)-dicarboxylate de diméthyle [21]

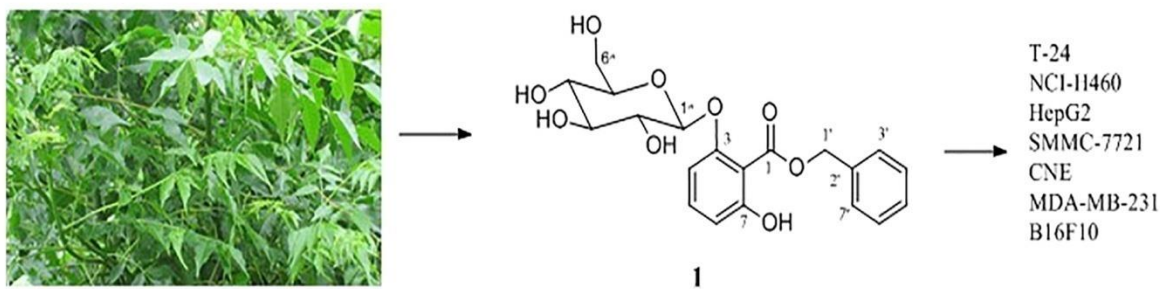


Figure 3:Structure chimique de faux Neem.

1.4.3. Origine et distribution géographiques de faux Neem

Son centre d'origine se situe au sud de l'Himalaya et particulièrement au Cachemire (Inde – Pakistan – Chine) mais par extension, beaucoup évoque des origines plus vastes, de l'Irak au Japon et particulièrement en Perse.

Il s'est naturalisé aussi bien en Amérique du Sud, en Australie, en Afrique qu'aux îles Mascareignes [22].

1.4.4. Description botanique de faux Neem

Melia azedarach est un petit arbre, haut de 4 à 12m, au houppier aéré et plutôt arrondi avec des branches parfois un peu tordues ou désordonnées. Son feuillage fin produit un arbre utilisé en médecine traditionnelle depuis plus de 2000 ans [23][24]. C'est une plante verte attrayante avec une multitude de feuilles. Caractérisée par une croissance rapide et par certaines variétés résistantes aux gelées, mesurant de 6 à 15 m de haut [25], et pouvant atteindre 20 à 30 m [26]. Cet arbre est caractérisé aussi par un tronc solide dur, brun foncé avec une croûte brune fissurée de 75 à 150 cm, les feuilles, qui mesurent jusqu'à 25 cm de long, sont constituées de cinq à huit paires de folioles.. La fleur est aromatique et blanche, et le fruit peut atteindre un centimètre de long. Il est vert et devient jaune lorsqu'il mûrit, et a un goût amer de graine [27].

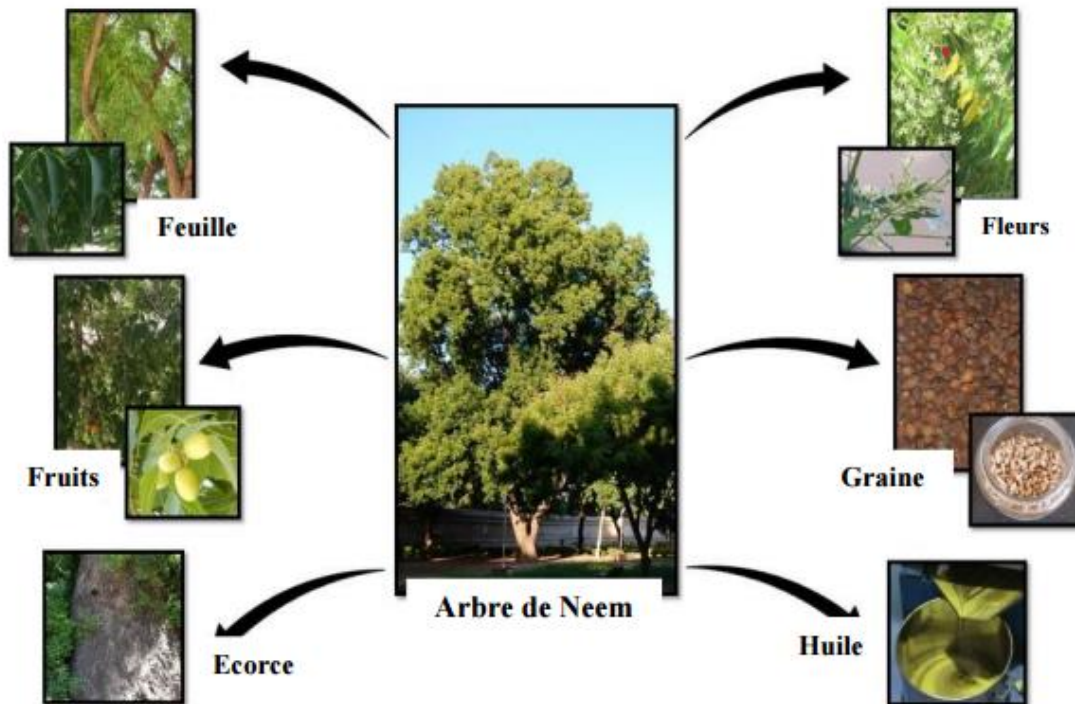


Figure 4 : Arbre de Neem et ses composants.

1.4.5. Utilisations médicinales traditionnelles de faux Neem

1.4.5.1. Utilisations traditionnelles

Melia azedarach (faux Neem) est connu depuis des siècles pour ses nombreuses vertus curatives. Baptisé parfois arbre aux merveilles ou arbre pharmacie du village, le faux Neem contient de nombreuses substances ayant des activités anti-inflammatoires, antibactériennes ou immunostimulantes.

Plusieurs écrits font référence aux effets bénéfiques de ses fruits, de ses graines, de son huile, de ses feuilles, de ses racines ou de son écorce. Chacun d'eux est utilisé depuis des siècles par la médecine ayurvédique pour traiter divers problèmes de santé [27].

1.4.5.2. Utilisations pharmaceutiques

Largement utilisé en médecine ayurvédique et en pharmacopée traditionnelle, il était parfois appelé 'l'arbre pharmacie du village' : anti-inflammatoire – antibactérien – immunostimulant – astringent – fébrifuge – vermifuge – antifongique... Racines, feuilles, graines (composées de 40 à 48 % d'huile), et écorce sont utilisées [27].

1.5. Menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.)

1.5.1. Généralité sur les Menthes

Les Menthes, du nom latin *Mentha*, font partie de ce grand cortège de substances, ce sont des plantes vivaces, herbacées indigènes et très odorantes appartenant à la famille des *labiacées*. Les Menthes conservent depuis l'antiquité une infinie diversité d'emplois et occupent une large place dans la thérapeutique. [28]

Les menthes étaient utilisées à des fins thérapeutiques au 16ème et 17ème siècle, actuellement elles sont employées dans plusieurs domaines. En thérapeutique, la menthe s'utilise contre la fièvre, la faiblesse, la toux, les nausées, les maux de l'estomac, la mélancolie, les maladies de poitrines, l'hystérie, les troubles de la vue, elle présente aussi des propriétés médicales, on cite à titre d'exemple : stimulante du système nerveux, tonique, stomachique, antiseptique, analgésique, vermifuge. On l'utilise aussi contre les parasites, les tiges et les fleurs de la menthe sont brûlés pour chasser les puces des matelas et des animaux domestiques, on peut aussi placer les sachets de menthe auprès des sacs de grains et de fromage pour chasser les rongeurs [29]

1.5.2. Généralité sur la menthe pouliot

La menthe pouliot (*Mentha pulegium* L.) est une plante herbacée de la famille des Lamiacées. Connue depuis l'Antiquité comme plante médicinale, elle ne fut rattachée aux menthes qu'à l'époque moderne. Après avoir été très estimée jusqu'à la Renaissance, sa consommation même sous forme d'infusion, est maintenant déconseillée en raison de la présence d'un composant très hépatotoxique, la pulégone, pouvant parfois être présent dans une concentration élevée [29]. Le pouliot a une odeur très pénétrante, une saveur âcre et amère [30].



Figure 5 : Plante de la menthe pouliot.

1.5.3. Composition chimique de la menthe pouliot

Selon les Normes ISO : NF T 75-233 (la menthe pouliot) contient :

- Huile essentielle : 1 à 5%, la plupart des huiles essentielles du commerce sont surtout riches en (R)-(+)-pulégone (teneur comprise entre 14 et 90 %) ; celle-ci est accompagnée de menthone (10 à 31%), de néo-isomenthol (jusqu'à 21 %)...;
- Dérivés d'acides hydroxycinnamiques (tanins typiques des lamiacées) =5%, composés surtout d'acide rosmarinique (=3%) ;
- Flavonoïdes : diosmine, hespéridine [31].
- Des matières celluloseuses et pectiques, du sucre etc... [32].

1.5.4. Origine et distribution géographiques de la menthe pouliot

C'est une espèce spontanée dans l'ensemble de l'Europe, l'ouest de l'Asie (de Chypre au Turkménistan) et le nord de l'Afrique (du Maroc à l'Égypte) ;

- Europe de l'Ouest, Ukraine, Russie ;
- Asie tempérée : Turquie, Iran, Israël, Liban, Syrie, Caucase, Russie, Kazakhstan, Turkménistan.

En France, cette plante est irrégulièrement répartie; tandis qu'elle manque dans de vastes contrées, même siliceuses, elle surabonde dans d'autres.

La menthe pouliot s'est naturalisée dans de nombreux pays : Australie, Nouvelle-Zélande, États-Unis, Brésil, Argentine, Chili, Uruguay. Elle est cultivée en Géorgie, Inde, Europe, Canada, États-Unis, Mexique, Cuba, Brésil, Chili [33].

1.5.5. Description botanique de la menthe pouliot

La menthe pouliot, de nom latin *Mentha pulegium* L., est une plante originaire d'Europe, d'Afrique du Nord et d'Asie mineure :

- Elle fait partie de la famille des Lamiacées.
- Elle mesure de 10 à 55 cm de haut.
- On la trouve principalement dans les milieux humides tels que les champs et les prairies, les bords des mares... C'est une plante vivace qui colonise rapidement les milieux qui lui sont favorables par son rhizome.
- Les tiges ont une section carrée, elles sont dressées ou couchées et très ramifiées.

- Les feuilles font 1 cm de long et sont ovales, opposées à apex obtus, légèrement dentées.
- La floraison a lieu de juillet à fin septembre. Les fleurs sont de couleur rose-mauve, formées de quatre lobes. Les quatre étamines sont saillantes [34].

1.5.6. Utilisations médicinales traditionnelles de la menthe pouliot

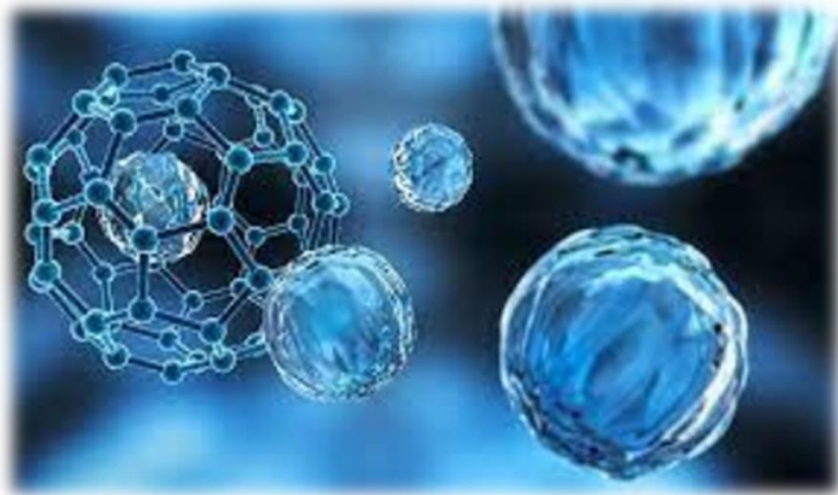
La plante *Mentha pulegium* L. a été utilisée généralement contre les maladies infectieuses et elle s'est révélée efficace contre ces problèmes sans aucune base scientifique pour expliquer cette action. L'augmentation de la résistance aux antibiotiques des agents pathogènes associés à des maladies infectieuses ainsi que des effets indésirables des antibiotiques a suggéré l'utilisation d'huile de *Mentha pulegium* L. comme l'antibiotique ou de remplacement. Une autre utilisation de cette plante est bien considérée comme un insectifuge, tant pour l'homme et des animaux domestiques [34]

1.5.7. Utilisations médicinales

Un bon tonique digestif, il stimule les sucs digestifs, soulage les flatulences et les coliques ; un bon remède pour les maux de tête et d'infections respiratoires mineures aidant à garder la fièvre et la congestion à vérifier ; un puissant stimulant au muscle utérin encourageant la menstruation ; l'externe il peut être utilisé pour soulager les rhumatismes et compris la goutte. [34]

Chapitre 2:

Généralités sur les nanoparticules d'argent



2. Généralité sur les nanoparticules

Les nanotechnologies sont l'objet d'un intérêt considérable ces dernières années. Définie par Ferrari comme étant la science impliquant la manipulation de la matière fabriquée par l'homme à l'échelle nanométrique, les nanoparticules (NPs) possèdent au moins une dimension comprise entre 1 et 100 nm. Les NPs possèdent des propriétés qui résultent du fait de leur très petite dimension qui se situe entre les atomes et les molécules.

2.1. Définition de nanoparticules

Une nanoparticule est un assemblage de quelques centaines à quelques milliers d'atomes. Cette définition exclut donc les objets dont la plus petite dimension inférieure à 100 nm. A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Figure 6).

La plupart des nanoparticules sont des agrégats de petites molécules ou d'atomes [35].

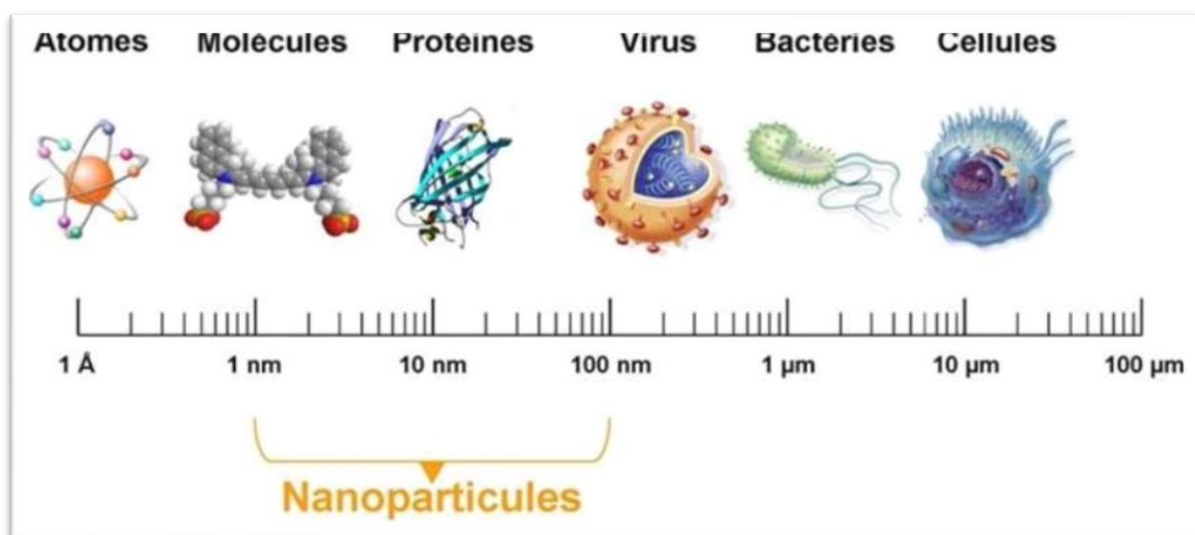


Figure 6: Gamme de tailles des nanoparticules comparées à celles des principales structures chimiques et biologiques.

2.2. Origine des nanoparticules

2.2.1. Nanoparticules naturelles

Elles sont produites à la fois à la suite d'événements naturels tels que l'activité volcanique, les réactions de photosynthèse ou encore l'activité marine. On peut en retrouver dans les poussières désertiques. Les nanoparticules sont aussi observées lors du phénomène de combustion. Certaines bactéries et levures peuvent réduire la toxicité d'un environnement agissant sur les ions métalliques et en formant des complexes insolubles sous forme des nanoparticules [36]

2.2.2. Nanoparticules artificielles (industrielles ou manufacturées)

Elles sont produites intentionnellement à l'échelle industrielle par l'homme, à l'aide de différents matériaux tels que les oxydes métalliques, les métaux, le carbone, les polymères et les lipides [37].

2.2.3. Nanoparticules accidentelles

Elles proviennent des procédés chauds par exemple: feux de bois, gaz d'échappement de véhicule, freinage... [38].

2.3. Nanoparticules d'argent

2.3.1. Définitions

Parmi les différentes nanoparticules métalliques, les nanoparticules d'argent (AgNPs) sont l'un des nanomatériaux les plus essentiels et les plus fascinant [39]. Et elles ont attiré beaucoup d'attention dans le domaine scientifique [40]. Grâce à leur taille extrêmement réduite, les AgNPs possèdent une grande surface, ce qui leur offre une énergie de surface élevée et plusieurs sites réactifs. Ces caractéristiques qualifient les AgNPs comme l'un des matériaux les plus prometteurs en catalyse[41], médecine, dispositifs médicaux, pharmacologie, biotechnologie, l'électronique, l'ingénierie, l'énergie, les champs magnétiques, ainsi que la remédiation environnementale [42].

2.3.2. Propriétés des nanoparticules d'argent

2.3.2.1. Propriétés physiques et chimiques de l'argent

Les propriétés physiques de l'argent sont données en tableau 1. Ses différents états d'oxydation sont : Ag^0 , Ag^+ , Ag^{2+} , Ag^{3+} . Il se trouve sous forme de trace dans la nature, d'un aspect brillant, de couleur blanc, et une forme malléable [43].

L'argent ionique Ag^+ , forme des sels ou des complexes (exemple : $AgNO_3$, $AgCl$) solubles ou insolubles par l'association avec d'autres éléments organiques ou inorganiques [43].

Tableau 1: Propriétés physique de l'argent.

Numéro atomique	47
Masse atomique (g/mol)	107.87
Densité (g/cm³)	10.5
Rayon atomique (nm)	0.153
Résistivité électrique ($\mu\Omega\text{cm}$)	1.59
Température de fusion (k)	1235.43
Température de d'ébullition (k)	2485
Conductivité thermique ($\text{w m}^{-1} \text{K}^{-1}$)	429
Électronégativité	1.93

2.3.2.2. Propriétés biocides de l'argent

Depuis la fin des années 1990, l'utilisation des nanoparticules d'argent colloïdal connaît un essor extrêmement important en raison de leur réactivité élevée, et leur pouvoir à limiter la propagation des infections, ainsi que l'amélioration de l'hygiène quotidienne. Elles ont également une capacité à libérer progressivement, et de manière contrôlée et durable, les ions Ag^+ .

Les nanoparticules d'argent sont couramment utilisées pour leurs propriétés bactéricides dont leur état d'oxydation joue un grand rôle. En effet, seules les nanoparticules d'argent contenant la forme oxydée sont toxiques au contraire des nanoparticules métalliques de degré d'oxydation nul. La toxicité augmente lorsque la taille des nanoparticules diminue ce qui est directement corrélé avec une augmentation de la fraction d'ions Ag^+ adsorbée en surface des particules [44].

2.3.2.3. Propriété désodorisante:

Le nano-argent a des propriétés désodorisantes employées dans des réfrigérateurs pour éliminer les mauvaises odeurs [44].

2.3.3. Méthodes de synthèses des AgNPs

2.3.3.1. Méthodes physiques

Les méthodes mécaniques, telles que l'homogénéisation et le broyage ont été utilisées pour préparer des nanoparticules d'argent pour application antimicrobienne. Cependant, les nanoparticules d'argent obtenues ont formé des agrégats et ont montré un mauvais effet bactéricide et inhibiteur. Dans les procédés physiques récents, les nanoparticules d'argent sont généralement synthétisées par évaporation-condensation [45].

2.3.3.2. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques de préparation de nanoparticules d'argent incluent la réduction chimique en solution aqueuse ou organique, la réduction électrochimique, la voie micellaire inverse, la réduction biochimique ...etc.

De par sa simplicité, la synthèse de nanoparticules par réduction chimique est la technique la plus utilisée pour former des solutions colloïdales de nanoparticules métalliques [46] [47].

2.3.3.3. Méthodes biologiques (la bio-réduction)

La synthèse verte des nanoparticules émerge progressivement comme une branche clé de la nanotechnologie dans laquelle les nanoparticules sont produites à l'aide d'entités biologiques [48], où la paroi cellulaire chargée négativement interagit électrostatiquement avec les ions métalliques chargés positivement et bio-réduit les ions métalliques en NPs.

Cette méthode peut être considérée comme une approche respectueuse de l'environnement et également comme une technique à faible coût à haut rendement, et non toxique, simple, fiable, une densité élevée, la stabilité et la solubilité immédiate des nanoparticules préparées dans l'eau [49].

a) Les bactéries

L'utilisation de bactéries gagne rapidement une importance en raison de son succès croissant, de sa facilité de manipulation et de sa modification génétique. Les AgNPs ont été synthétisées en utilisant à la fois des bactéries gram-positives et gram-négatives pour former

ces nanoparticules d'argent, il faut savoir que certaines bactéries ont la capacité de produire des nanoparticules intracellulaires tandis que d'autres produisent des AgNPs extracellulaire.

Les bactéries utilisent couramment le nitrate comme source principale d'azote, grâce à quoi le nitrate est converti en nitrite par la nitrate réductase, en utilisant le pouvoir réducteur d'une forme réduite de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) [50].

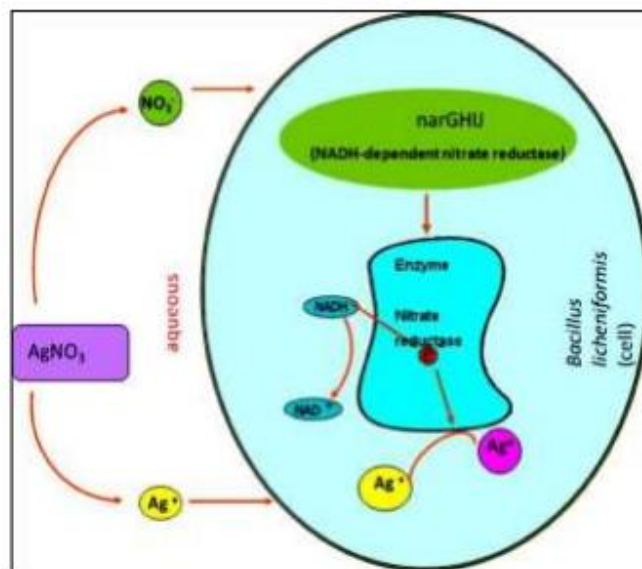


Figure 7: Mécanisme de la biosynthèse des nanoparticules d'argent à base des bacteries [50]

b) Les champignons

Les champignons ont un potentiel de synthèse de NPs métalliques en raison de la capacité de bioaccumulation des métaux et de leur tolérance, de leur capacité de liaison élevée et de leur absorption intracellulaire qui sont faciles à manipuler dans une installation de recherche par rapport aux bactéries, aussi ils sécrètent d'énormes enzymes catalysant la réduction de la solution d' AgNO_3 ce qui tend à augmenter considérablement la rentabilité de cette approche synthétique [51].

c) Les plantes

Les plantes sont considérées comme une très bonne méthode pour la synthèse rapide des nanoparticules d'argent en raison de leur large spectre de métabolites secondaires bioactifs, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les acides aminés, les protéines et les

enzymes, qui pourraient améliorer la synthèse des nanoparticules, en jouant un rôle d'agent stabilisant ou réducteur [52].

Les parties des plantes comme les racines, la tige, les graines et les feuilles sont principalement utilisées pour la synthèse des NPs. Le point intéressant est l'agent actif présent dans ces parties [53].

Chapitre 3:

Synthèse, caractérisation et application



3.1. Synthèse verte des nanoparticules d'argent

- ❖ La synthèse verte des nanoparticules émerge progressivement comme une branche clé de la nanotechnologie dans laquelle les nanoparticules sont produites à l'aide d'entités biologiques [54], où la paroi cellulaire chargée négativement interagit électrostatiquement avec les ions métalliques chargés positivement et bio réduit les ions métalliques en NPs [55].

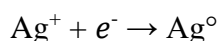
- ❖ Cette méthode peut être considérée comme une approche respectueuse de l'environnement et également comme une technique à faible coût à haut rendement, et non toxique [56], simple, fiable, une densité élevée, la stabilité et la solubilité immédiate des nanoparticules préparées dans l'eau [57], par rapport aux méthodes de synthèse chimique et physique qui indiquent une faible biocompatibilité et présentent des risques biologiques latents consommant une énergie importante, nécessitant une pression élevée, coûteuses et ont un faible rendement

- ❖ En raison de sa nature relativement polyvalente les extraits de métabolites secondaires collectés à partir des sources biologiques contiennent de nombreuses biomolécules tels que des enzymes, des protéines, des flavonoïdes, des stérols, des triterpènes, des triterpénoïdes et des saponines qu'ils ont des propriétés réductrices et antioxydantes responsables de la réduction des composés métalliques dans leurs nanoparticules respectives [58].

- ❖ Certains des agents réducteurs et /ou stabilisants utilisés pour la production de nanoparticules d'argent par synthèse verte sont : les bactéries, les champignons, les polysaccharides, et les plantes qui font l'objet du présent travail, et qui sont considérées comme une très bonne méthode pour la synthèse rapide des nanoparticules d'argent en raison de leur large spectre de métabolites secondaires bioactifs, tels que les polyphénols, les flavonoïdes, les terpénoïdes, les acides aminés, les protéines et les enzymes, qui pourraient améliorer la synthèse des nanoparticules, en jouant un rôle d'agent stabilisant

ou réducteur [59]. Les parties des plantes comme les racines, la tige, les graines et les feuilles sont principalement utilisées pour la synthèse des NPs. Le point intéressant est l'agent actif présent dans ces parties.

- ❖ 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 des 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 [60].



- ❖ Après la sélection de l'extrait de plante, les principaux paramètres affectant sont la concentration de l'extrait, la température, le sel métallique, le pH et le temps de contact.

3.1.1. Mécanisme de formation de nanoparticules d'argent [61]

Le processus de formation des nanoparticules métalliques est souvent vu comme la succession de plusieurs étapes. De nombreux paramètres peuvent intervenir dans la formation des nanoparticules: température, concentration et nature des réactifs et du réducteur.

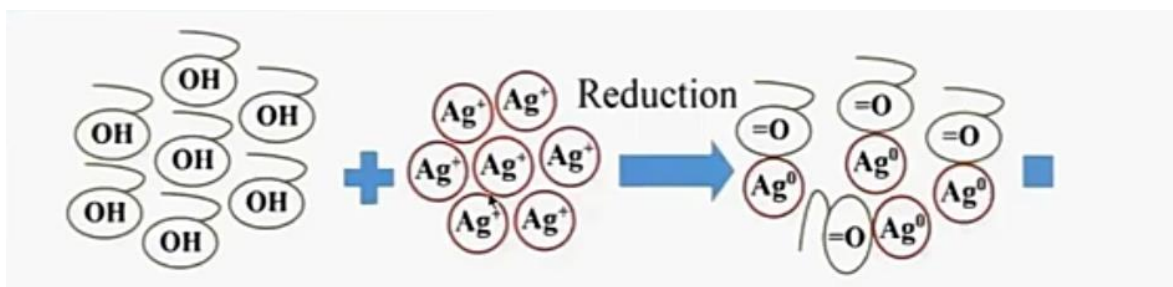


Figure 8: la réduction des $AgNO_3$ en nanoparticules d'argent

3.1.1.1. La nucléation

Les précurseurs métalliques sont dissous puis réduits pour donner des atomes métalliques de valence zéro. La sursaturation élevée en atomes insolubles conduit à la formation de petits agrégats par collision. Cette seconde étape est appelée la nucléation : elle correspond à la formation localisée d'une nouvelle phase solide thermodynamiquement stable au sein d'une phase liquide. La formation de nucléi entraîne après un certain temps, une

diminution de la sursaturation. Par conséquent le taux de nucléation diminue et le nombre de particules dans le système devient constant.

3.1.1.2. La croissance

Les nuclei ayant atteint un rayon critique vont pouvoir croître par consommation des monomères se trouvant en solution. Cette étape de croissance est thermodynamiquement favorisée. Plus la concentration en atomes est importante plus les particules vont croître rapidement.

3.1.1.3. Le murissement

Au fur et à mesure que la réaction se poursuit, le taux de sursaturation continue à diminuer. La croissance ne peut plus se poursuivre, et une dernière étape peut intervenir : c'est le phénomène de murissement d'Oswald. Il s'agit de l'interdiffusion des atomes des plus petites particules vers les plus grosses.

3.2. Caractérisation des nanoparticules d'argent [62]

La partie la plus importante de la recherche sur les nanoparticules est la caractérisation qui est généralement basée sur la taille, la morphologie, la cristallinité, la charge et la composition des NPs. Les techniques les plus utilisées pour la caractérisation des NPs comprennent généralement la spectroscopie ultraviolette visible (UV-Vis), Potentiel zêta, la diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

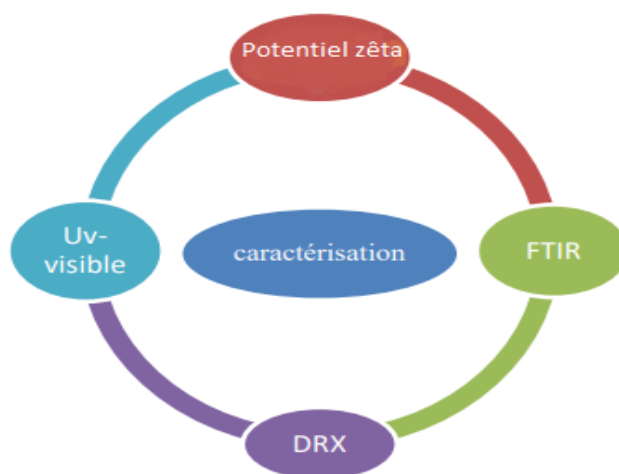


Figure 9 : les caractérisations des nanoparticules

3.3. Applications médicales des nanoparticules d'argent

L'argent est largement utilisé depuis l'antiquité comme agent thérapeutique pour de nombreuses maladies [62] :

3.3.1. Implants cardiovasculaires

Le premier appareil cardiovasculaire recouvert d'un élément Ag était une valve de foyer en silicone prosthétique pour diminuer la survenue d'une endocardite. Cette utilisation de l'Ag a été proposée pour éviter la contamination bactérienne sur la valve en silicone et réduire la réaction inflammatoire du cœur [63].

3.3.2. Cathéters

Les cathéters recouverts d'argent ont montré une activité antimicrobienne importante in vitro et empêcher la formation de biofilm contre les agents pathogènes (*E. coli*, *Enterococcus*, *S. aureus*, coagulase négative *staphylococci*, *P. aeruginosa* et *C. albicans*) [64]. Et peuvent réduire de manière productive les bactéries jusqu'à 72h dans les modèles animaux, et ceux-ci ne sont pas toxique [63].

3.3.3 Pansements

Les pansements contre les blessures à base d'Ag ont été utilisés pour traiter cliniquement différentes blessures, telles que les brûlures, le pemphigus et la nécrose épidermique toxique, accélérer la ré-épithélialisation bien que, maintenant la formation de nouveaux tissus c.à.d. l'angiogenèse et l'expansion [63]. Ils sont aussi utilisés pour les ulcères chroniques de la jambe, les plaies diabétiques et les blessures traumatiques [65].

3.3.4. Dentisterie

Les AgNPs ont été utilisés dans les instruments, les composites dentaires et les bandages, dans les adhésifs orthodontiques pour maintenir la force de liaison au cisaillement de l'adhésif orthodontique tout en augmentant sa résistance aux bactéries. En diminuant la colonisation microbienne des matériaux de revêtement, et en améliorant la compétence antifongique. Les AgNPs joint dans les obturations endodontiques a montré un impact antibactérien prolongé contre *Streptococcus milleri*, *Staphylococcus aureus* et *Enterococcus faecalis* [63].

3.3.5. Tissus imprégnés de nanoparticules pour vêtements cliniques

Un groupe de chercheurs a exploré la combinaison de l'utilisation des propriétés bactériolytiques du lysozyme et des propriétés biocides des AgNPs pour la synthèse de revêtements antimicrobiens sur des instruments médicaux. Les AgNPs ont été utilisés pour produire, des autonettoyants, des gants chirurgicaux réutilisables, des robes de patient et des pansements antibactériens, des couvertures défensives, des combinaisons contre les risques biologiques [63].

3.3.6. Utilisation de nanomatériaux pour l'administration de médicaments

L'administration de médicaments à l'aide de NPs est une stratégie prometteuse pour l'amélioration de la biodisponibilité de chimiothérapies, de radiothérapies, de radionucléides et d'anticorps aux cellules tumorales. Après une administration systémique et locale, elles peuvent affecter l'absorption cellulaire, la distribution biologique, la pénétration dans les barrières biologiques et les effets thérapeutiques résultants [66].

3.4. Activités biologiques des nanoparticules d'argent

Les AgNPs ont reçu une énorme attention des scientifiques en raison de leur remarquable défense contre divers micro-organismes pathogènes [67].

3.4.1. Activité antibactérienne

- ❖ Les AgNPs se sont avérés des fongicides efficaces contre un large spectre de bactéries, y compris les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* et *Bacillus subtilis Bacillus*. Le rapport surface/volume élevé des AgNPs augmente leur contact avec les micro-organismes et favorise la dissolution des ions argent, renforçant ainsi l'effet bactéricide [68]
- ❖ L'activité bactéricide des AgNPs dépend de plusieurs propriétés morphologiques et physicochimiques (telles que la taille, la forme et la surface). Les AgNPs de plus petite taille sont plus susceptibles de traverser la membrane cellulaire et d'entrer dans la cellule, empêchant la croissance bactérienne. La concentration d'AgNPs varie avec chaque type de bactérie [69].

3.4.2. Activité antifongique

Les AgNPs ont une forte activité antifongique sur *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Trichophyton mentagrophytes* [70] *Bipolaris sorokiniana* par l'inhibition de la germination des conidies [66]. Par exemple l'activité antifongique des AgNPs contre *C.albicans* pourrait être exercée en perturbant la structure de la membrane cellulaire et en inhibant le processus de bourgeonnement normal en raison de la destruction de l'intégrité de la membrane [64].

3.4.3. Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que l'exposition aux NPs conduit à la sécrétion de plusieurs cytokines et chimiokines par les cellules épithéliales, conduisant à l'infiltration de macrophages dans les zones exposées. Ensuite les macrophages déclenchent la libération de cytokines inflammatoires qui induisent à la régulation positive des médiateurs inflammatoires induisent une production accrue de cytokines inflammatoires du système circulatoire vers le site de l'inflammation [68]

3.4.4. Activité antivirale

Les nanoparticules ont un fort potentiel antiviral en raison de leurs interactions multiples avec la glycoprotéine récepteur et / ou enveloppe virale, ils peuvent inhiber la multiplication virale à l'intérieur de la cellule hôte en empêchant la réplication ou en bloquant l'entrée de particules virales à l'intérieur de la cellule hôte [69]. Comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), virus de l'hépatite B et virus syncytial respiratoire [70].

3.4.5. Activité Anticancéreuse

- ❖ Les AgNPs peuvent être considérés comme un outil prometteur dans la prévention contre divers types de cellules cancéreuses, comme le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon et du sein, et le carcinome cervical en raison de leur meilleure pénétration, leur propriétés anti-angiogéniques et anti-prolifératives et la facilité de leur suivi dans le corps [71].

- ❖ La propriété antiproliférative dans les cellules cancéreuses est due à leur capacité à endommager l'ADN, à briser les chromosomes, à produire une instabilité génomique et à

perturber l'homéostasie du calcium (Ca^{2+}) qui induit l'apoptose et provoque une instabilité du cytosquelette. La lésion cyto-squelettique bloque le cycle et la division cellulaire, favorisant l'activité anti proliférative des cellules. [71] ont démontré que les AgNPs (15 nm) peuvent induire l'apoptose et améliorer la radiosensibilité sur les cellules cancéreuses) [62].

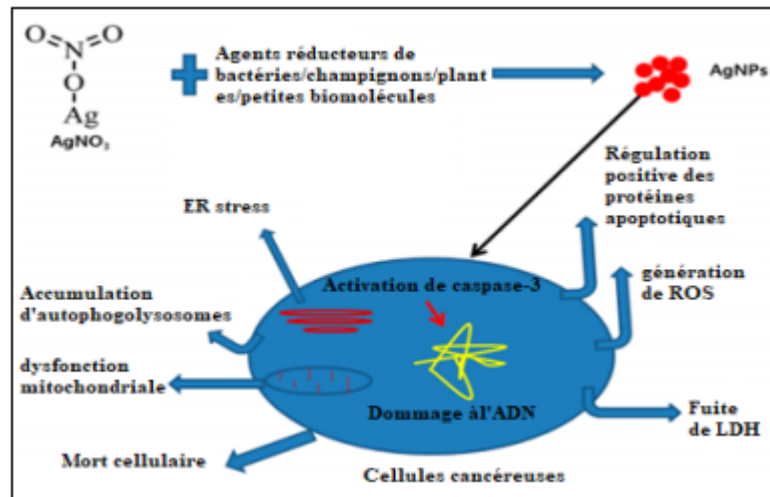


Figure 10: Les mécanismes possibles des AgNPs à induire une cytotoxicité dans les lignées cellulaires cancéreuses [66]

3.4.6. Activité antidiabétique

Les AgNPs piègent les radicaux libres et réduisent les niveaux d'enzymes qui provoquent l'hydrolyse des glucides complexes (α -glucosidase et α -amylase), ce qui entraîne une augmentation du taux de consommation de glucose [72].

3.5. Toxicité des AgNPs

Cette toxicité est déterminée par de nombreux facteurs, notamment la taille des particules, le type de matériau de revêtement et la structure morphologique. De nombreux rapports ont démontré que la cytotoxicité des AgNPs dépend de la taille [73].

Chapitre 4 :

Matériel et méthodes



4. Matériel et méthodes

4.1 Matériel utilisé

4.1.1. Balance électrique

Nous avons utilisé une balance électrique de précision de la marque KERN ET SOWN GmbH plateau 118 mm, balance multi-talent, pour le laboratoire ou les usages industriels difficiles.

4.1.2. Agitateur magnétique chauffant

L'agitateur magnétique chauffant est un appareil permettant de mélanger deux composants de façon homogène. de la marque Ika® RH basic 2 IKAMAG®, plaque inox.

4.1.3. Homogénéisateur

L'homogénéisateur à haute pression ou homogénéisateur à filière est un appareil qui consiste à rendre homogène deux matières, c'est-à-dire à les mélanger efficacement. Il produit des particules microscopiques ayant une granulométrie identique. Il est alors possible de mélanger deux substances qui ne se mélangent pas habituellement.

4.1.4. Microscope optique

La microscopie optique permet de visualiser des objets ou des détails invisibles pour nos yeux, dont la résolution est trop faible.

4.1.5. PH-mètre

UN pH-mètre est un appareil, souvent électronique, permettant la mesure du pH (l'acidité ou l'alcalinité) d'une solution à l'aide d'une échelle numérique de 1 à 14. Il est le plus souvent constitué d'un boîtier électronique donnant la possibilité de l'affichage de la valeur numérique du pH et d'une sonde de pH.

4.1.6. Centrifugeuse

La centrifugation est un procédé de séparation des composés d'un mélange en fonction de leur différence de densité en les soumettant à une force centrifuge. Le mélange à séparer

peut être constitué soit de deux phases liquides, soit de particules solides en suspension dans un fluide. L'appareil utilisé est une machine tournante à grande vitesse appelée centrifugeuse.

4.1.7. Chauffe ballon

La chauffe ballon utilisé est de la marque Wisd Therm (heating mantle). Volume de 1L

4.1.8. Spectroscopie UV-Visible

Est une technique quantitative utilisée pour mesurer la quantité de lumière absorbée par une substance chimique. Cela se fait en mesurant l'intensité de la lumière qui traverse un échantillon par rapport à l'intensité de la lumière à travers un échantillon de référence ou un blanc.

4.1.9. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Est une technique analytique efficace pour identifier rapidement la «famille chimique» d'une substance.

4.1.10. Diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X (DRX) est une technique analytique qui permet l'étude des différentes phases des matériaux cristallins.

4.1.11. Potentiel zêta

Le potentiel zêta d'une particule ou d'une nanoparticule en suspension ou en solution représente la charge électrique due aux ions qui l'entourent. Le potentiel zêta est la mesure de l'intensité de la répulsion / attraction électrostatique ou électrique entre particules.

4.2. Produits utilisés

4.2.1. Matière végétale utilisée

- La menthe pouliot utilisée provient de la région de ouled yeich wilaya de blida, récoltée au mois d'avril et identifiée comme *Mentha pulegium* L..

Les feuilles fraîches de la menthe pouliot ont été séparées des tiges et laissées sécher à température ambiante à l'air libre et à l'abri de la lumière et cela pendant 48h.

- Nous avons recueilli des feuilles de plantes des arbres de l'Université de Saad dahleb Blida 1 et assisté à l'extrait en prenant une quantité de feuilles et lavé avec de l'eau distillée, puis séché

24 heures dans le laboratoire à température ambiante

4.2.2. Réactifs

Les réactifs utilisés pour la synthèse des AgNPs ainsi que pour la caractérisation sont : AgNO₃; éthanol; xanthane.

4.2.3. Présentation des excipients de la formulation

La crème formulée à base de 1% de la solution des AgNPs, contient 8 excipients qui sont illustrés dans le tableau suivant ainsi que leurs rôles :

Tableau 2: les excipients utilisés dans la crème formulée

Excipients	Rôles
Myristate isopropylique	Emulsifiant
Acide stéarique	Acidifiant
Alcool cétylique	Stabilisant
Polyoxyl 40 stéarate	Emulsifiant
Lauryl sulfate de sodium	Emulsifiant
Propylène glycol	Solvant

4.2.3.1. Émulsifiants

Les émulsifiants sont des additifs alimentaires utilisés pour aider à mélanger deux substances qui normalement se séparent lorsqu'elles sont combinées (par exemple : l'huile et l'eau). Les émulsifiants ont une partie qui aime l'eau (hydrophile) et une partie qui aime l'huile (hydrophobe). Lorsqu'ils sont ajoutés à un liquide non miscible, leurs molécules se placent le long de la couche dite interracial où l'huile se sépare de l'eau. Ici, l'émulsifiant est placé de telle sorte que sa partie hydrophile est tournée vers la phase aqueuse et sa partie hydrophobe est tournée vers la phase huileuse, ce qui permet à l'eau et à l'huile de se disperser finement l'une dans l'autre. En fin de compte, l'émulsifiant crée une émulsion stable, homogène et lisse.

[74]

4.2.3.2. Acidifiants

Ils augmentent l'acidité d'une denrée ou servent à améliorer la qualité organoleptique d'un produit en lui donnant une saveur acide. Ce sont souvent des acides organiques comme les acides lactique, citrique, ou acétique [74].

4.2.3.3. Agents stabilisants

Les agents stabilisants font partie des additifs technologiques qui modifient la structure physico-chimique et améliorent la durée de vie des produits, au même titre que les conservateurs, les antioxydants, etc. Ils ont pour fonction d'assurer la gélification d'un produit, sa viscosité et sa fluidité [74].

4.3. Caractérisations des solutions d'argent colloïdal

4.3.1. UV-Visible

La spectrophotométrie UV-vis est l'une des techniques les plus couramment utilisées pour la caractérisation des nanoparticules synthétisées qui est également utilisée pour vérifier les AgNPs synthétisées. Le spectre d'absorption des AgNPs dépend de la morphologie, forme, taille et environnement chimique des nanoparticules synthétisées. De nombreuses études ont montré que les AgNPs produisent les bandes d'absorption à environ 200-800 nm dans la longueur d'onde du spectre UV-visible et il est utilisé pour la caractérisation de nanoparticules avec une gamme de 2-100nm [74].

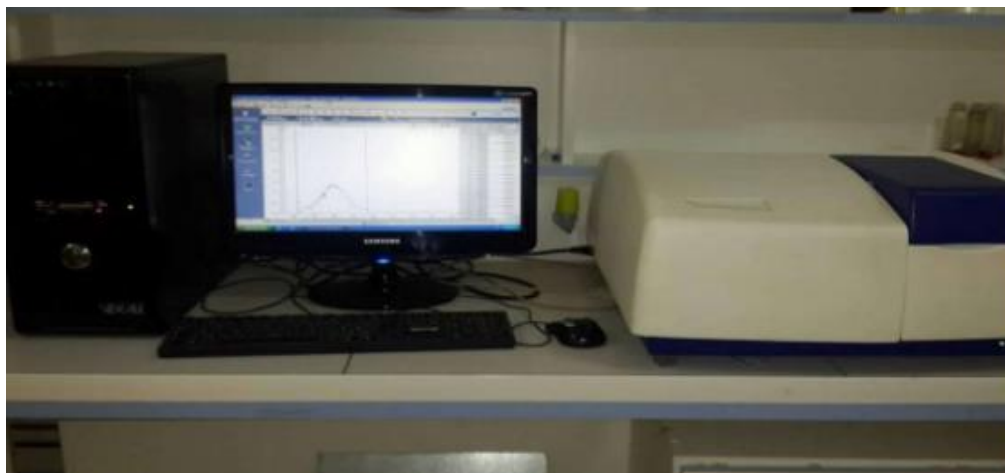


Figure11: Appareil d'UV-visible équipé d'un microordinateur.

4.3.2. Spectroscopie Infrarouge à transformée de fourrier (FTIR)

La spectroscopie FTIR est utilisée pour étudier la chimie de surface des nanoparticules métalliques et pour trouver savoir si les biomolécules sont impliquées dans la synthèse des nanoparticules. Le FTIR est un non-invasif, approprié, précieux, rentable, et une technique simple pour étudier le rôle des biomolécules dans la réduction de l'AgNO₃ émergent [74].



Figure 12 : Spectromètre infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

4.3.3. Diffraction des rayons X (DRX)

L'identification de la phase et la détermination de la structure cristalline des NPs peuvent être déterminées par la diffraction des rayons X (DRX). Avec l'aide de DRX, la présence d'AgNPs dans le produit de synthèse peut être confirmée. La confirmation a lieu par identification des pics du spectre DRX caractéristique de la structure cristalline cubique à faces centrées d'argent métallique [74].

4.3.4. Potentiel Zêta

La mesure du potentiel Zeta est une technique utilisée pour déterminer la stabilité des Nanoparticules [74].



Figure 13 : Potentiel zêta.

4.4. Méthode de biosynthèse des nanoparticules d'argent

4.4.1. Préparation de la solution AgNO₃

La masse d'AgNO₃ prise pour la préparation de la solution est calculée selon la formule suivante :

$$C = \frac{n}{V} = \frac{m}{MV} \quad (4.1)$$

Donc :

$$m = C \times V \times M \quad (4.2)$$

Selon des travaux effectués précédemment, la concentration a été fixée à $C = 10^{-3}$ M.

D'autre part la masse moléculaire d'AgNO₃ est : $M = 169.87$ g/mol.

Pour un volume $V = 1000$ ml ;

$$m = 10^{-3} \times 1 \times 169.87 \quad \text{d'où : } m = 0,16987 \text{ g}$$

Ensuite nous avons suivi les étapes suivantes :

- prendre une masse de 0.16987 g d'AgNO₃ ;
- dissoudre la quantité dans un volume d'un 1 litre d'eau déminéralisée ;
- mélanger la solution jusqu'à la dissolution complète d'AgNO₃.



Figure 14:préparation de la Solution d'AgNO₃.

4.4.2. Préparation des extraits des plantes

Les extraits des deux matières végétales utilisées à savoir *Mentha Pulegium* et *Melia Azedarach* sont des extraits à eau c'est à dire que le solvant utilisé pour l'extraction est l'eau déminéralisée.

La méthode consiste à :

- Peser 50 g des feuilles de la matière végétale ;
- Les rincer très bien avec de l'eau déminéralisée ;
- Introduire les feuilles dans un ballon de 1L;
- Verser 500 g de l'eau déminéralisée sur les feuilles ;
- Mettre le ballon dans le chauffe ballon pendant 1 h sous une température moyenne de T=70°C ;
- Filtrer le mélange à l'aide d'un papier filtre whatman et récupérer l'extrait aqueux pour chaque plante.

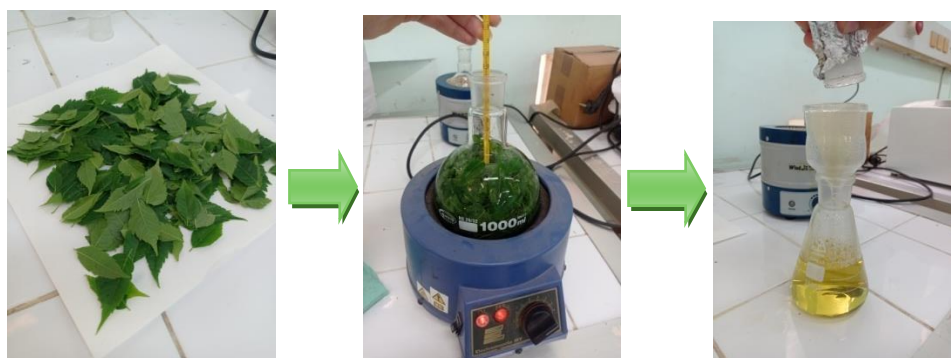


Figure 15:la macération de la plante de melia Azadirachta

4.4.3. Préparations des échantillons étudiés

Le tableau ci-dessous rassemble la préparation des 5 échantillons à base des plantes *Mentha Pulegium* et *Melia Azedarach* dont le but de biosynthétiser des nanoparticules d'argent :

Tableau 3 : Méthode de synthèse de cinq solutions des AgNPs à base des extraits aqueux différents.

Solutions des AgNPs	Méthode
Solution 1	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prendre 40 ml de la solution d'AgNO₃ dans un erlenmeyer ; ➤ Sur une plaque d'agitation chauffante introduire 10 ml de la solution d'extrait de <i>Mentha Pulegium</i> ; ➤ Fixer la température à 80°C ; ➤ Assurer l'agitation jusqu'au changement de couleur de la solution.
Solution 2	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prendre 40 ml de la solution d'AgNO₃ dans un erlenmeyer ; ➤ Sur une plaque d'agitation chauffante introduire 10 ml de la solution d'extrait de <i>Melia Azedarach</i> ; ➤ Fixer la température à 80°C ; ➤ Assurer l'agitation jusqu'au changement de couleur de la solution.
Solution 3	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prendre 40 ml de la solution d'AgNO₃ dans un erlenmeyer ; ➤ Sur une plaque d'agitation chauffante introduire 5ml de la solution d'extrait de <i>Melia Azedarach</i> et 5ml de la solution d'extrait de <i>Mentha Pulegium</i> ; ➤ Fixer la température à 80°C ; ➤ Assurer l'agitation jusqu'au changement de couleur de la solution.
Solution 4	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prendre 40 ml de la solution d'AgNO₃ dans un erlenmeyer ; ➤ Sur une plaque d'agitation chauffante introduire 7.5 ml de la solution d'extrait de <i>Melia Azedarach</i> et 2.5 de la solution d'extrait de <i>Mentha Pulegium</i> ; ➤ Fixer la température à 80°C ; ➤ Assurer l'agitation jusqu'au changement de couleur de la solution.
Solution 5	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Prendre 40 ml de la solution d'AgNO₃ dans un erlenmeyer ; ➤ Sur une plaque d'agitation chauffant introduire 2.5 ml de la solution d'extrait de <i>Melia Azedarach</i> et 7.5 de la solution d'extrait de <i>Mentha Pulegium</i>. ➤ Fixer la température à 80°C ; ➤ Assurer l'agitation jusqu'au changement de couleur de la solution.

4.5 Méthode de formulation de la crème

Avant d'entamer la fabrication d'un médicament, il faut d'une part, s'assurer de la qualité des matières premières et de tous les ingrédients de la formulation (principe actif, excipients, eau et conditionnement) qui doivent être conformes aux exigences de la réglementation. Et d'autre part, il faut vérifier que le procédé de fabrication et la méthode de dosage du PA sont validés et que tout le matériel utilisé est qualifiés.

Dans cette formulation, nous avons choisi la cinquième solution des AgNPs comme principe actif (PA) qui est à base de 2.5 ml de la solution d'extrait de *Melia Azedarach* et 7.5 de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*. Ce choix a été gouverné par l'obtention d'une meilleure absorbance dans le domaine UV-visible par rapport aux autres solutions des AgNPs biosynthétiser.

Incorporation des matières premières: solution A

Dans un bécher de 250 ml incorporer successivement:

- Myristate isopropylique.....1.5g
- Polyoxyl 40 stéarate.....1g
- Alcool cétylique.....2.5g
- Acide stéarique.....2.5g

A l'aide d'un agitateur à hélice mélanger les excipients sous une température fixée à 70°C jusqu'à ce que nous ayons un mélange homogène.

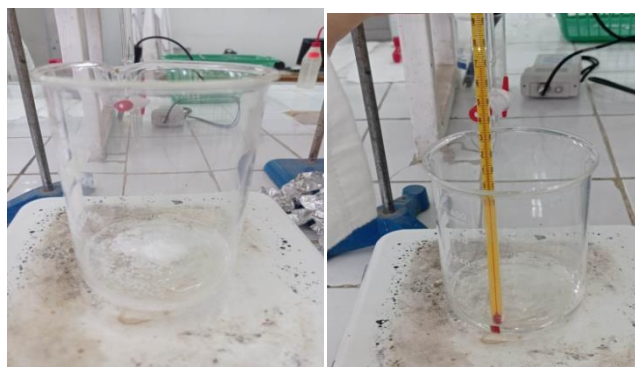


Figure16:Incorporation des matières premières

Dissolution de lauryl sulfate de sodium : solution B

- Dans un bécher on met une quantité de l'eau purifiée.....41.92g
- Chauffer l'eau purifiée jusqu'à $T=70^{\circ}\text{C}$
- Sous agitation, incorporer lauryl sulfate de sodium.....0.08g
- Laisser pendant 15 min jusqu'à la dissolution complète de lauryl sulfate de sodium.

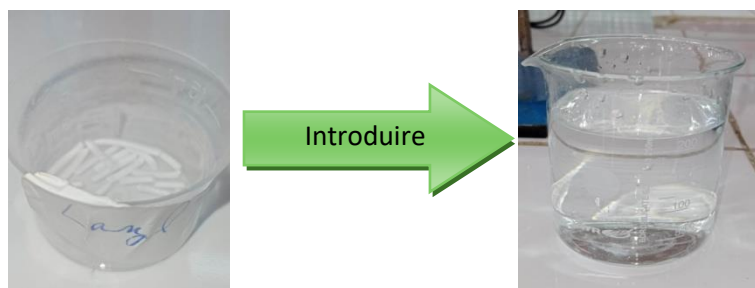


Figure 17: la dissolution de lauryl sulfate de sodium dans l'eau purifiée.

Préparation de la crème

- Dans un bain remplie de l'eau glacée refroidir la solution B jusqu'à une température $T=40^{\circ}\text{C}$.
- Sous agitation introduire la solution B dans la solution A.
- Après 10 min d'agitation on met notre crème sous homogénéisation.
- Enfin, verser 1 g de PA (solution 5) et continuer l'homogénéisation à faible vitesse jusqu'à l'obtention d'une crème homogène.

4.5.1. Caractérisation de la crème

La caractérisation de la crème formulée est basée sur la détermination des propriétés organoleptiques, la mesure du pH, le test de centrifugation, l'observation au microscope électronique et l'étude du comportement rhéologique.

4.5. Activité antibactérienne

4.6.1. Souches de référence utilisées

Trois souches de référence, du laboratoire de microbiologie de l'entreprise pharmaceutique groupe Sidal (Dar El Beida), ont été utilisées pour bien tester nos produits:

- *Escherichia coli*
- *Staphylocoques aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa*

4.6.2. Application des disques d'antibiotique

Les disques d'antibiotiques, choisis explicitement en fonction de la nature du germe, ont été déposés sur la gélose MHensemencée, à l'aide d'une pince stérile. Ensuite 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'inhibitions caractérisé par une zone dépourvue de croissance bactérienne autour du disque.

4.6.3. Méthode de diffusion sur gélose

Ils existent trois méthodes pour l'évaluation de L'effet antibactérien des AgNPs,

- La méthode de diffusion sur gélose,
- L'association Antibiotique-Nanoparticules d'argent,
- La détermination de l'activité antibactérienne des AgNPs en milieu liquide.

Dans ce travail nous avons testé le pouvoir antimicrobien de la cinquième solution d'AgNPs basée sur des teneurs en volume de 7.5 ml de *Mentha pulegium* et de 2.5 ml de *Melia Azedarach* ; ainsi que la crème formulée, par la méthode de diffusion sur gélose.

4.6.3.1. Principe

Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des biocides par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier Whatman imprégné par les différentes dilutions de la solution à tester

4.6.3.2. Préparation des disques

Les disques sont préparés à partir de papier Whatman .A l'aide d'un emporte-pièce, le papier Whatman a été découpé en des disques de 6 mm de diamètre. Par la suite, ces disques sont mis dans un tube à essai, et stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.



Figure 18: Disque à papiers Whatman de 6 mm de diamètre.

4.6.3.3. Diffusion de la solution

Les disques de papier Whatman stériles imbibés dans la solution d'AgNPs ont été déposés à l'aide d'une pince stérile, sur la surface de la gélose MH préalablementensemencée des suspensions bactériennes. Par la suite. Les boîtes sont fermées puis laissés pendant un certain temps à la température ambiante pour permettre la diffusion des solutions. Ensuite, elles sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Cette étape a été réalisée en deux essais pour chacune des trois souches.

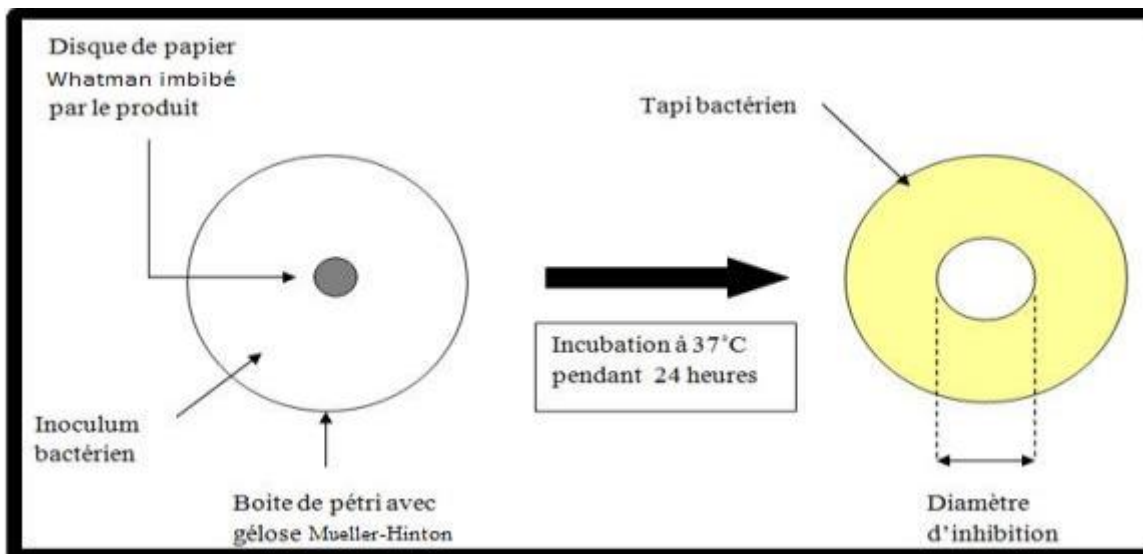


Figure 19: Principe de la méthode de diffusion par disque.

Chapitre 5: Résultats et discussion



5. Résultats de la biosynthèse des AgNPs

La synthèse des nanoparticules d'argent est distinguée par un changement de couleur très rapide qui diffère d'une solution à une autre:

5.1. Virage de couleur des solutions

▪ Solution 1 (Extrait de *La Mentha Pulegium* + solution d'AgNO₃)

La couleur de la solution a changé distinctement du jaune clair au brun après 7,4 secondes d'ajout d'extrait de feuilles de *Mentha pulegium* suggérant la formation d'AgNPs.

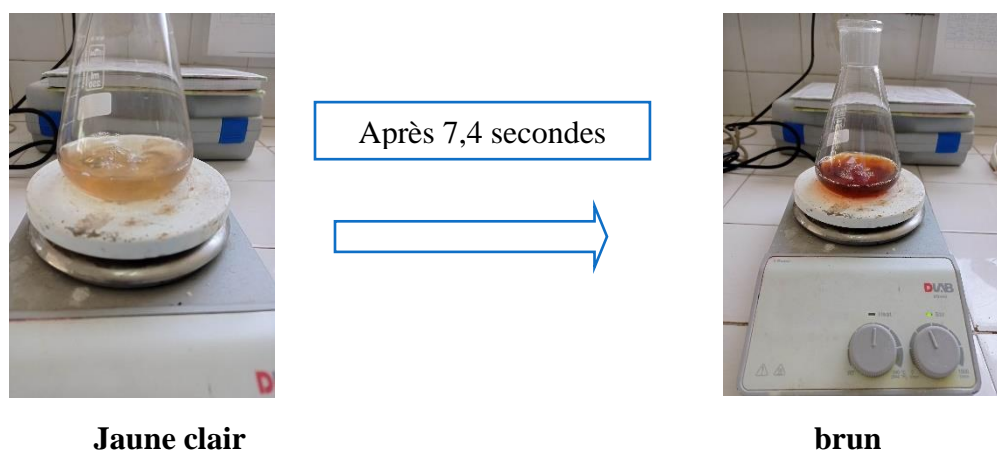


Figure 20: Image représente le virage de couleur de la solution 1.

▪ Solution 2 (Extrait de *Melia azedarach* + solution d'AgNO₃)

La deuxième solution a montré un changement de couleur du jaune clair au brun après 6,1 secondes d'ajout d'extrait de feuilles de *Melia azedarach* suggérant la formation d'AgNPs.

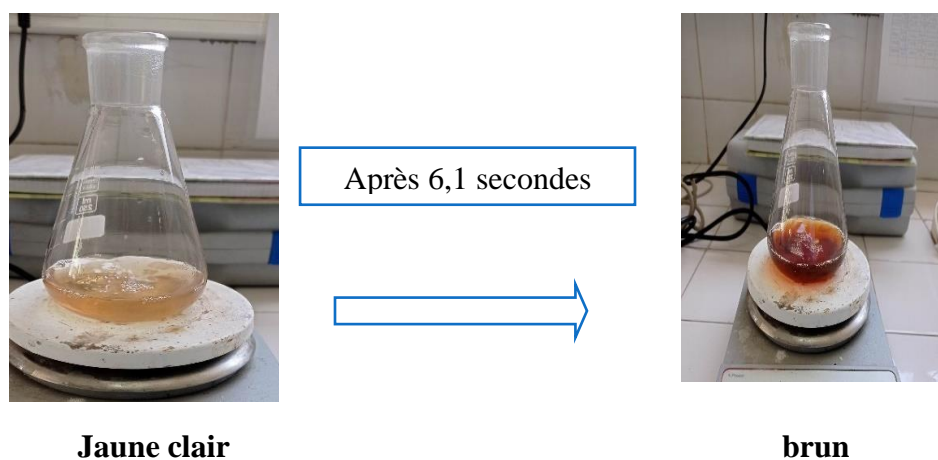


Figure 21: Image représente le virage de couleur de la solution 2.

- **Solution 3 (5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium* + solution d'AgNO₃)**

La solution à base des deux extraits à volume égale a donné un changement distinct du jaune pâle au brun colloïdale après 8,3 secondes suggérant la formation d'AgNPs

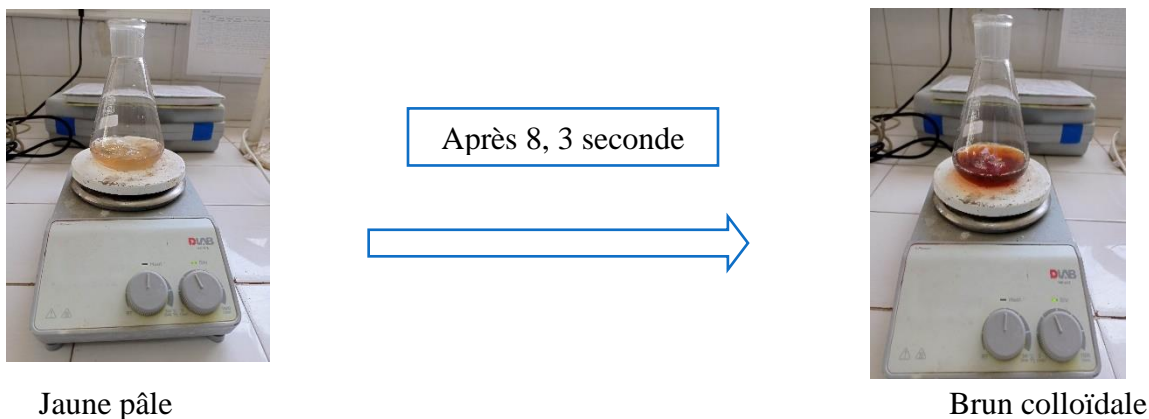


Figure 22: Image représente le virage de couleur de la solution 3.

- **Solution 4 (7,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +2,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium* + solution d'AgNO₃)**

Nous remarquons un virement de couleur passant du jaune pâle au brun clair après 6,9 secondes indiquant la formation d'AgNPs.

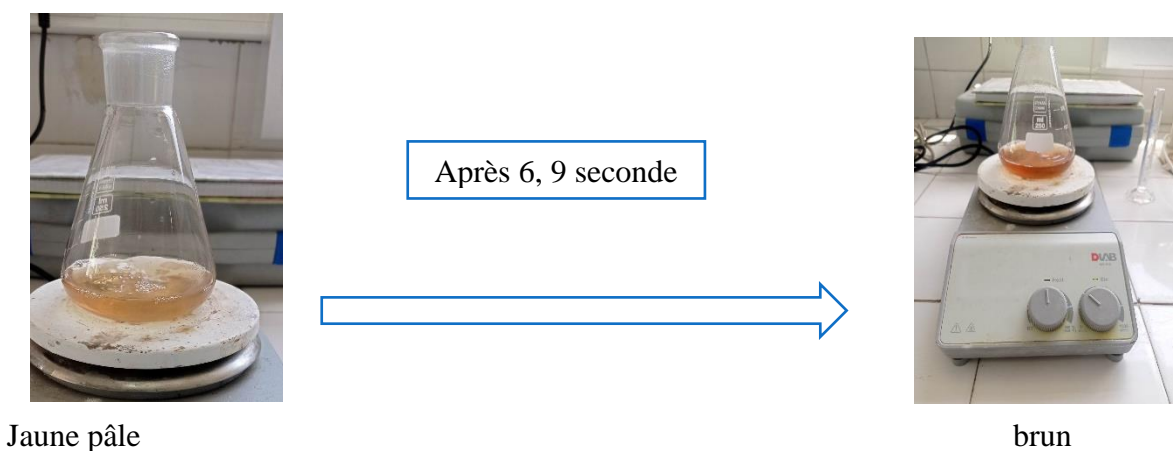


Figure23: Image représente le virage de couleur de la solution 4.

- **Solution 5 (2,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +7,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ solution d'AgNO₃)**

Un changement rapide de couleur de la cinquième solution vers un brun colloïdale a été observé après 5.1 secondes suggérant la formation d'AgNPs.

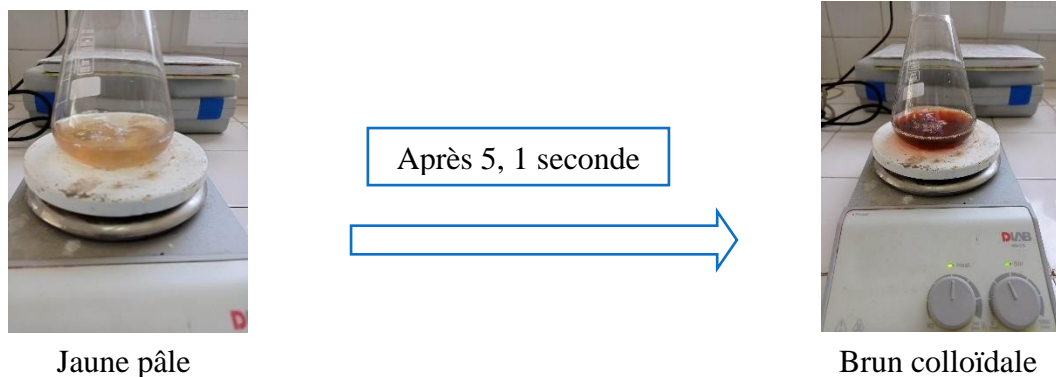


Figure 24: Image représente le virage de couleur de la solution 5.

Un temps de changement de couleur très rapide laisse penser que cette solution est plus stable. Toutefois, Le choix d'une bonne solution à utiliser repose sur la caractérisation par UV-visible.

5.2. Caractérisation des solutions colloïdales

5.2.1. PH-mètre

Nous avons mesuré le pH des 5 solutions qui sont données sur la figure ci-dessous:

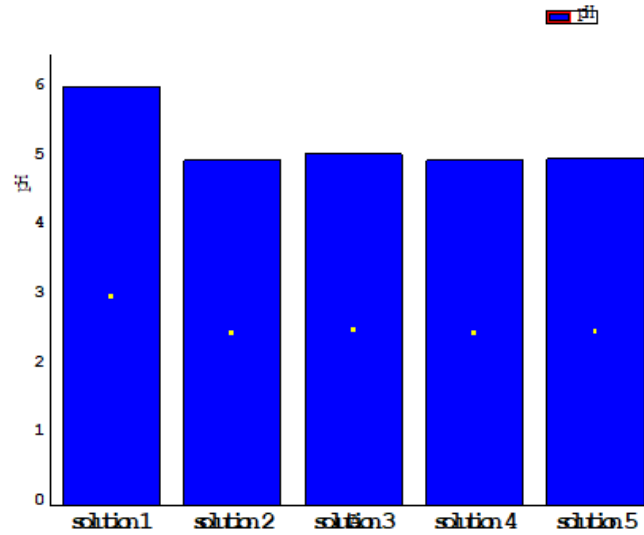


Figure 25: Valeurs des pH des cinq solutions.

Les solutions : 2, 3, 4 et 5 ont montré une acidité stable (environ $\text{pH} \approx 5$) plus en moins importante par rapport à la première solution.

Dans l'ensemble ces valeurs de pH sont proches de pH de la peau, permettant d'appliquer ces solutions en toute sécurité.

5.2.2. UV-visible

La caractérisation des cinq solutions par UV-visible est montrée sur la figure ci-dessous:

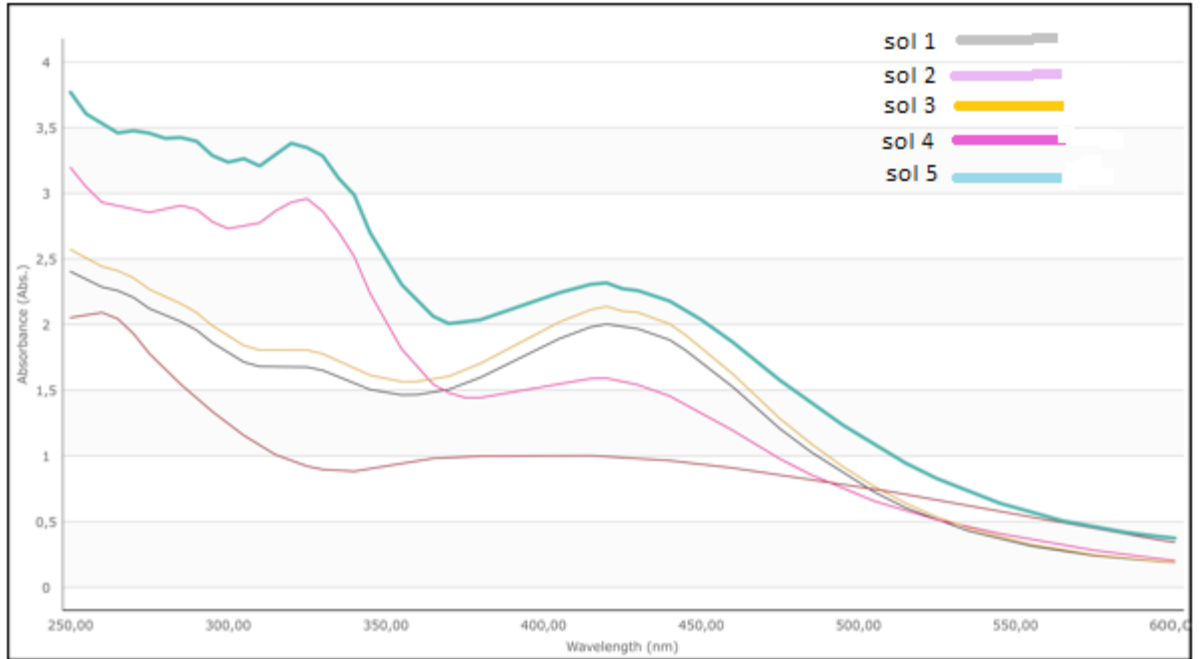


Figure 26 : Balayage des spectres des solutions d'AgNPs.

Les spectres d'extinction pour les solutions S1, S2, S3, S4 et S5 sont donnés en figure 27. La synthèse et la stabilité des AgNPs réduits dans la solution colloïdale ont été examinées en utilisant un spectrophotomètre visible UV. L'absorbance maximale à 450 et 320 nm a été observé dans les spectres UV visibles, comme le montre la figure 27, qui correspond à la surface résonance plasmonique (SPR) des AgNPs. Les modèles de résonance plasmonique de surface (SPR) sont couramment utilisés comme outils indicatifs pour la formation de nanoparticules métalliques, car SPR dépend divers paramètres tels que la taille et la constante diélectrique moyenne des ions Ag^+ ont été réduits .qui Indiquant la formation de nanoparticules d'argent.

Nous notons également que la courbe en bleu qui correspond à la cinquième solution a montré une absorbance importante dans l'UV-visible, indiquant que cette solution est plus stable par rapport aux autres solutions, ce résultat a été déjà observé précédemment par un changement de couleur très rapide en comparant aux autres solutions. Pour cela la solution 5 a été utilisée pour les applications venantes.

5.2.3. Analyse des spectres FTIR

Une analyse des spectres infrarouges des différentes solutions a été entamée dans le but de connaître la composition chimique :

- **Solution 1 : (Extrait de *Mentha pulegium* + solution d'AgNO₃)**

Le spectre FTIR de la solution des AgNPs à base d'extrait de *Mentha pulegium* est comme suit :

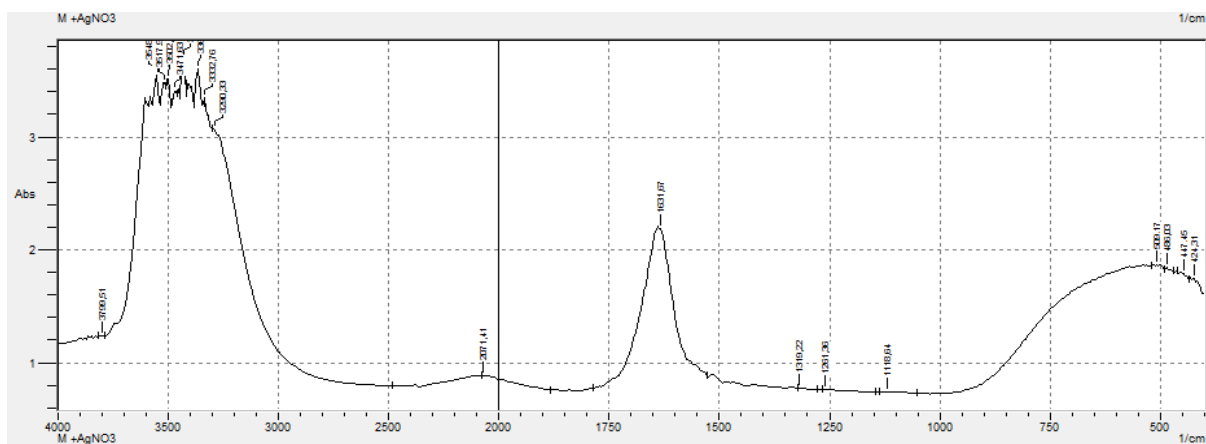


Figure 27:Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées : solution 1

Les principaux groupements de cette solution sont donnés dans le tableau suivant :

Tableau 4: Résultat des spectres infrarouge de la solution 1

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements
3602.49	_OH_ groupement phénolique
3471.63	_N_H amine primaire
3290.33	_OH acide carboxylique
1631.67	_N_H_ amine primaire et secondaire
1261.36	_C_O éthers, alcools
1118.64	_C_C groupement alcène

- **Solution 2 (Extrait de *Melia azedarach* + solution d'AgNO₃)**

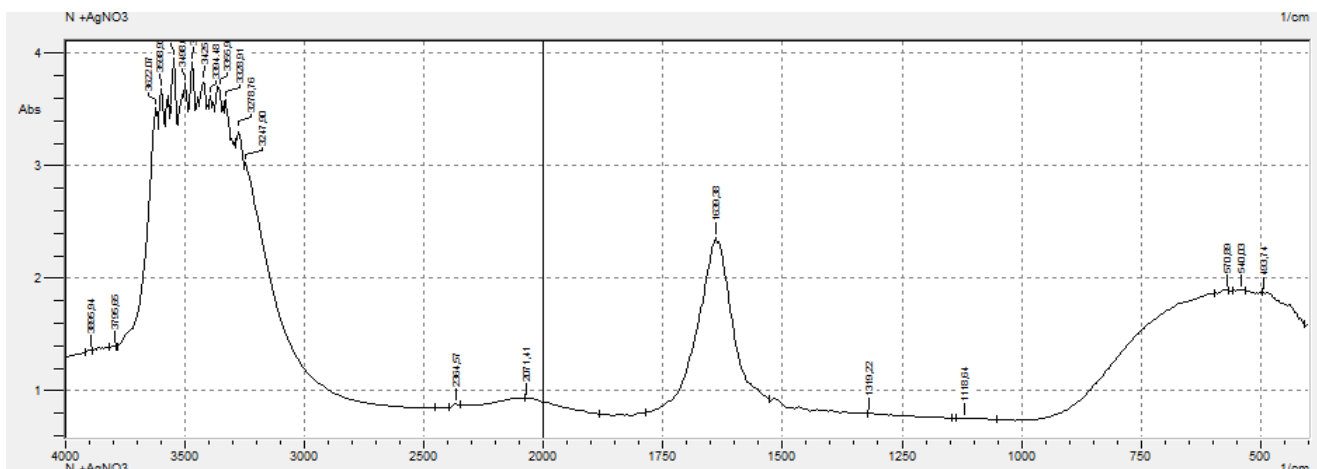


Figure 28: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des AgNPs synthétisées : solution 2

Tableau 5: Résultat des spectres infrarouge de la solution 2

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements
3622,07	_OH_ groupement phénolique
3496,63	_NH amine primaire
2364,57	_CH3 éthers méthylique
1639,39	_NH2 amine primaire
1319,22	_C_N amine
1118,64	_C_C groupement alcène

- **Solution 3 (5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium* + solution d'AgNO₃)**

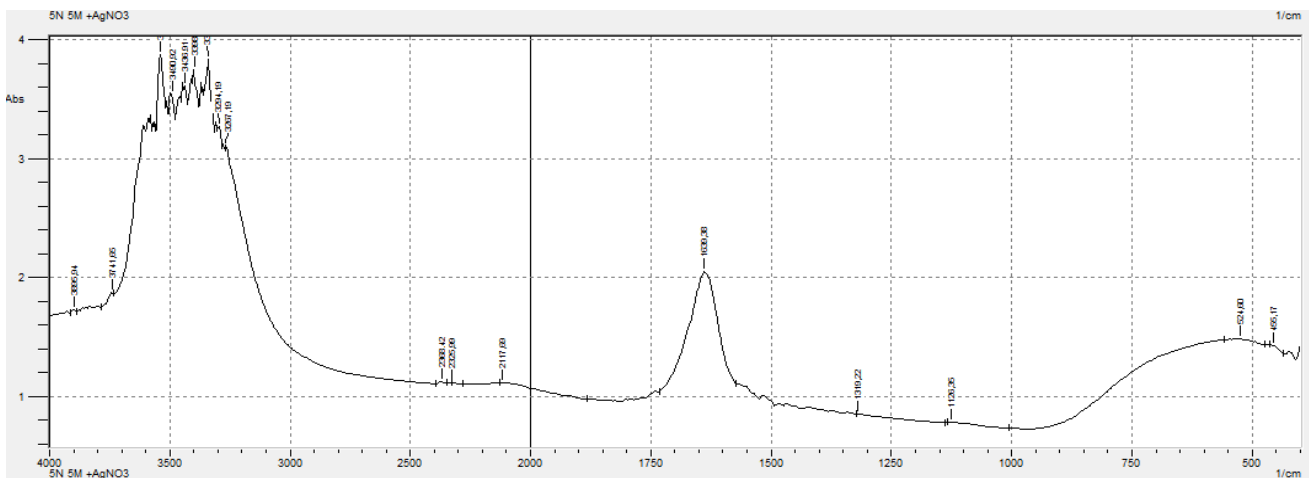


Figure 29: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées: solution 3

Tableau 6: Résultat des spectres infrarouge de la solution 3

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements
3606.64	_OH_ groupement phénolique
2364.57	_CH3 éthers méthylique
2333.71	_CH3 éthers méthylique
2079.12	_C=O substance carbonyli
1639.39	_N_H amine primaire et secondaire
1319.22	_NO2 nitroaliphatiques et aromatique

- **Solution 4** (7,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +2,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium* + solution d'AgNO₃)

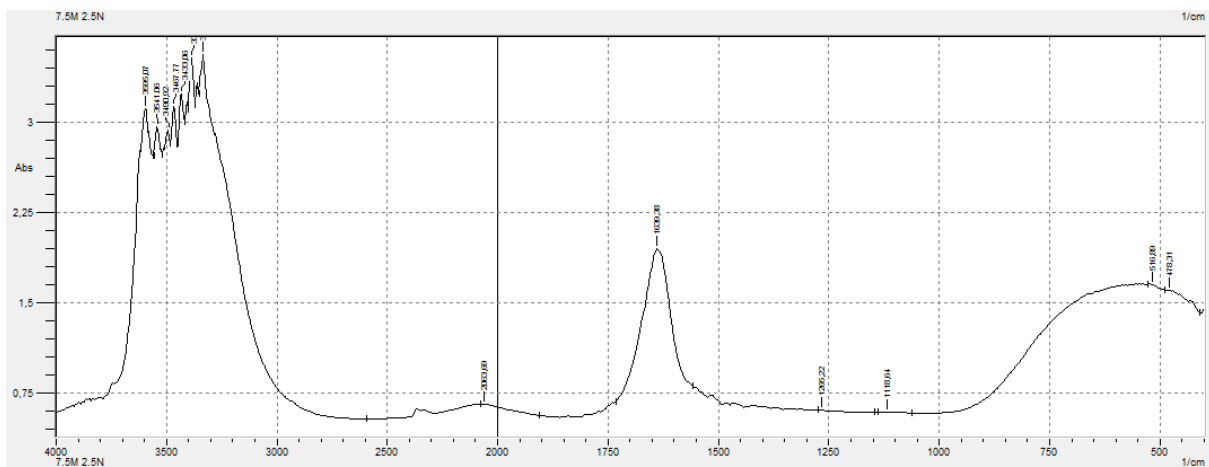


Figure 30: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées: solution 4

Tableau 7: Résultat des spectres infrarouge de la solution 4

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements
3666.07	_OH_ groupement phénolique
3433.05	_N_H amine primaire
2063.69	_C=O substance carbonyli
1639.38	_C=O amide primaire
1265.22	_C_O éthers, alcools
1118.64	_C_C groupement alcène

- **Solution 5 (2,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +7,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ solution d'AgNO₃)**

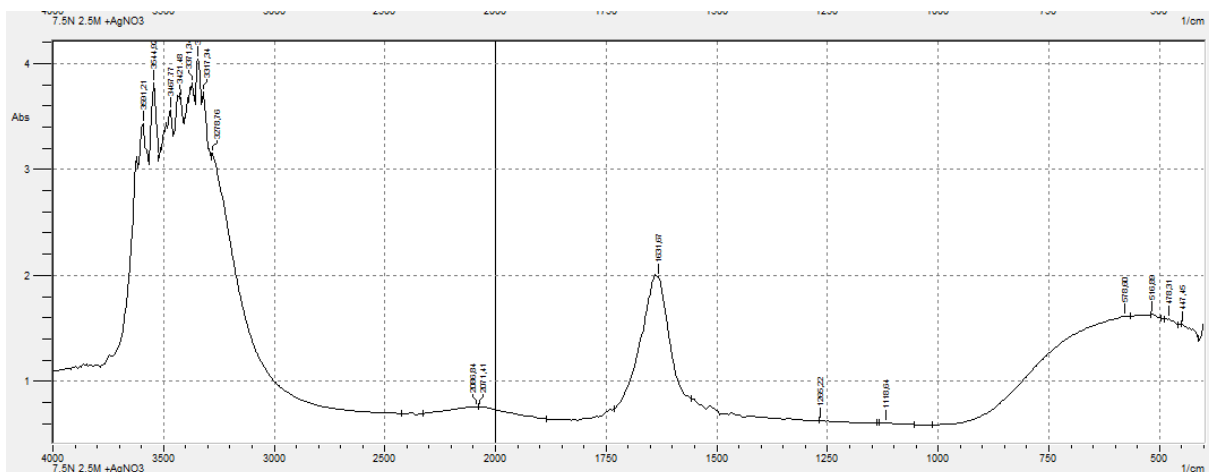


Figure 31: Le spectre infrarouge à transformée de fourrier des NPs Ag synthétisées : solution

Tableau 8: Résultat des spectres infrarouge de la solution 5

Nombre d'onde (cm ⁻¹)	Groupements
3544.90	_OH_ groupement phénolique
3371.34	_N_H amine primaire
2071.41	_C=O substance carbonyli
1631.67	_C=O amide primaire
1266.22	_C=O_C_O éthers,alcools
1118.64	_C_C groupement alcène

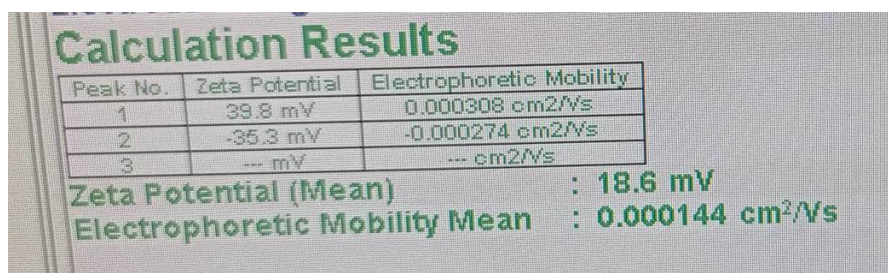
Les cinq solutions ont montré une composition chimique importante, toutefois nous remarquons la formation du groupement carbonyl lors de l'utilisation de mélange des deux extraits. Nous remarquons aussi que la cinquième solution est plus riche en ce groupement, à savoir selon plusieurs recherches que ce groupement est responsable de la biosynthèse des nanoparticules d'où la confirmation du choix de la cinquième solution.

5.2.4. Potentiel zêta

La caractérisation par le potentiel zeta nous a permis de tirer la solution la plus stable :

- **Solution 2 (Extrait de La menthe pouliot + AgNO₃):**

Tableau 9: plage distribution de tailed'essais de la solution 2



Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	39.8 mV	0.000308 cm ² /Vs
2	-35.3 mV	-0.000274 cm ² /Vs
3	--- mV	--- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : 18.6 mV
Electrophoretic Mobility Mean : 0.000144 cm²/Vs

- **Solution 3 (5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ AgNO₃)**

Tableau 10: plage distribution de taille d'essais de la solution 3

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	21.4 mV	0.000166 cm ² /Vs
2	-57.5 mV	-0.000445 cm ² /Vs
3	-179.0 mV	-0.001385 cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -9.1 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000070 cm²/Vs

- **Solution 4** (7,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +2,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ AgNO₃)

Tableau 11: plage distribution de taille d'essais de la solution 4

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	2.0 mV	0.000016 cm ² /Vs
2	109.4 mV	0.000848 cm ² /Vs
3	-121.5 mV	-0.000942 cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -9.9 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000077 cm²/Vs

- **Solution 5** (2,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +7,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ AgNO₃)

Tableau 12: plage distribution de taille d'essais de la solution 5

Peak No.	Zeta Potential	Electrophoretic Mobility
1	40.0 mV	0.000310 cm ² /Vs
2	-126.8 mV	-0.000983 cm ² /Vs
3	-- mV	-- cm ² /Vs

Zeta Potential (Mean) : -85.9 mV
Electrophoretic Mobility Mean : -0.000666 cm²/Vs

- ❖ D'après les résultats obtenus on constate que la solution 5 est la plus stable, dont la valeur moyenne de potentielle zêta est de -85,9 mv, indiquant que les forces de répulsion électrostatique de cette solution sont importantes. Donc les AgNPs dans cette solution sont en suspension, et ne peuvent pas être décantés naturellement. En effet, ceci est dû aux forces de répulsion électrostatique exercées entre les AgNPs. Les autres solutions n'ont montré aucune stabilité où les valeurs de potentielle zêta sont inférieures à 30 mv en valeur absolue selon les normes recommandées.

Tableau13: Résultats de potentielle zêta des 5 solutions

Les solutions	Valeur moyennes de potentielle zêta	Stabilité
2	18 ,6mv	Instable
3	-9,1mv	Instable
4	-9,9mv	Instable
5	-85,9mv	Stable

5.2.5. Diffraction des rayons X(DRX)

La figure ci-dessous donne le résultat de la caractérisation par le DRX :

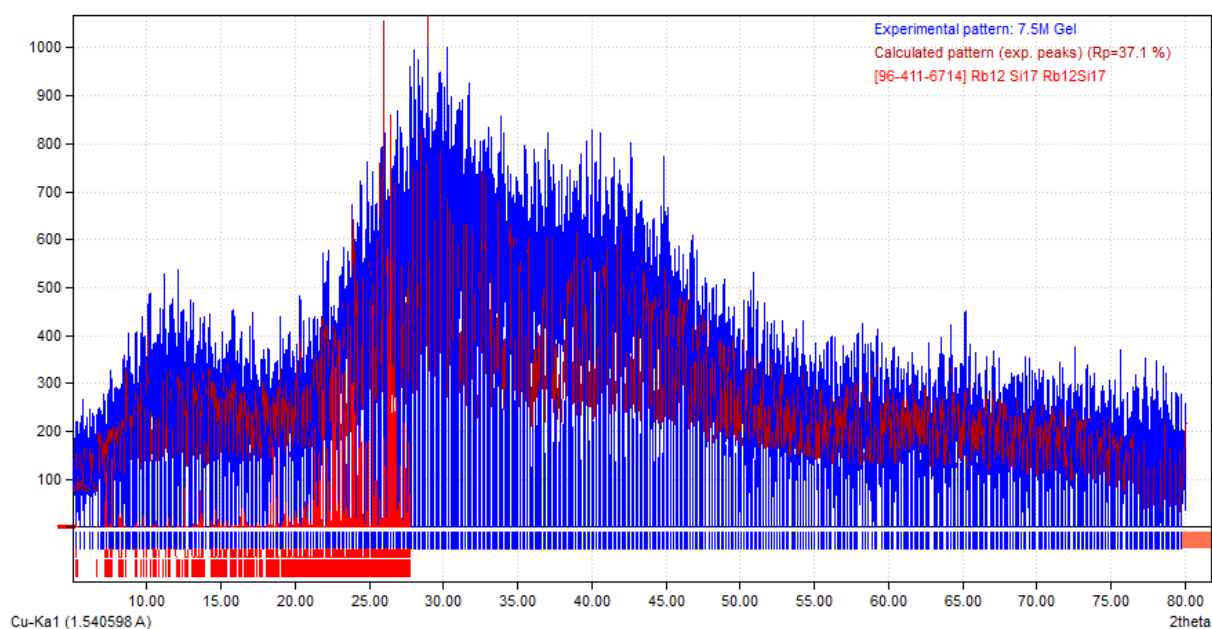


Figure 32 : Résultats de DRX des AgNPs.

L'analyse des spectres de diffraction des rayons X obtenus montre que notre solution est amorphe.

5.3. Formulation de la crème à base d'AgNPs

5.3.1. Caractérisation de la crème

La crème préparée obtenue est présentée sur la figure 36, cette formulation a été par la suite caractérisée.



Figure 33: l'aspect, couleur de la crème formulée à base d'AgNPs.

5.3.1.1. Propriétés organoleptiques

Les caractéristiques organoleptiques d'un produit, perçues par les cinq sens : vue, ouïe, odorat, goût, touché. Dans le tableau suivant on a présenté les paramètres organoleptiques de notre crème :

Tableau 14 : Caractéristiques organoleptiques de la crème à base d'AgNPs.

Aspect	Opaque Homogène
Couleur	Blanche
Odeur	Aucun

5.3.1.2. Mesure de pH

La crème préparée à base des AgNPs à partir des extraits des feuilles de *Mentha pulegium* et *Melia Azedarach*, possède un pH de 3.8 conforme aux normes établie par les recommandations relatifs au pH de référence (pH=2.3-5.0).



Figure 34: appareille qui mesure le pH de la crème à base des AgNPs.

5.3.1.3. Test de centrifugation

Lors de l'application d'une vitesse de centrifugation de 45000 tr/min pendant 45 min, la préparation reste stable.

L'observation visuelle indique que la préparation est stable (pas de séparation des phases) avec une couleur homogène comme c'est montré dans la figure ci-dessous:



Figure 35: Résultat de test de centrifugeuse

5.3.1.4. Observation au microscope optique

L'examen microscopique de la préparation a été effectué directement après les procédés d'émulsification. L'échantillon est placé entre une lame et une lamelle puis analysé sous microscope optique de marque Micros Austria. À un grossissement (X60).

L'image microscopique (Figure39), montre une bonne dispersion des globules huileux dans la phase continue (phase aqueuse). Les particules présentent une taille homogène, ce qui indique que le système est mono dispersé.

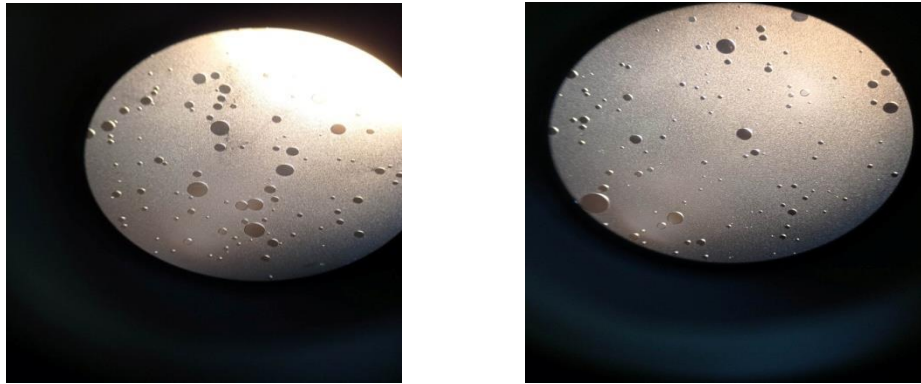


Figure36 : Résultats de la crème au Microscope optique grossissement x60

5.3.1.5. Test du comportement rhéologique

La viscosité est l'un des paramètres importants pour évaluer la qualité d'un composé utilisé, comme stabilisant et épaississant dans les formulations alimentaires et pharmaceutiques.

- **Test d'écoulement**

La figure ci-dessous représente la courbe d'écoulement des 3 crèmes en fonction de la vitesse de cisaillement.

- 1- **La crème 1:** la préparation de la crème sous homogénéisation par procédé mécanique
- 2- **La crème 2:** la préparation de la crème sous homogénéisation par ultra turrax
- 3- **La crème 3:** la référence (Phanazole)

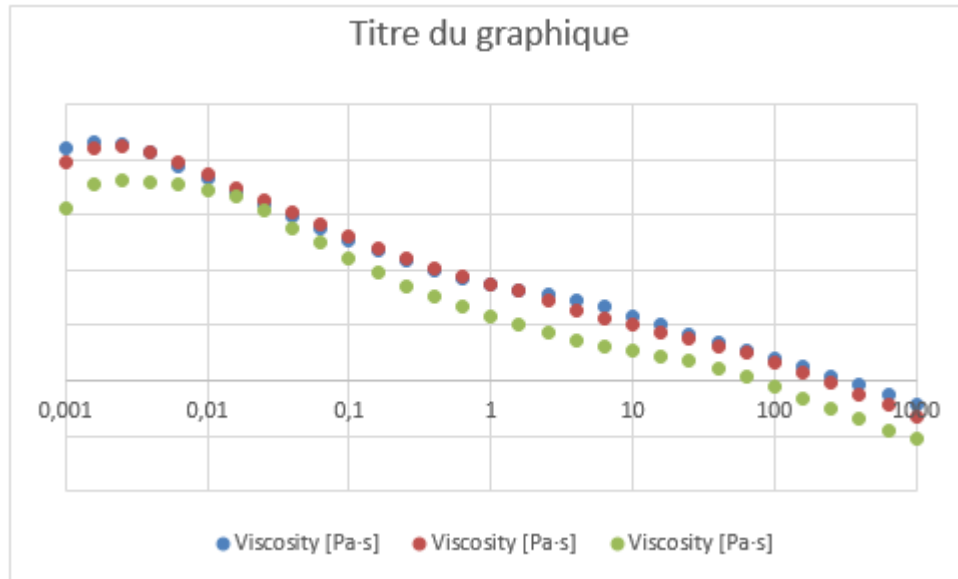


Figure37 : résultat d'évolution de la viscosité en fonction de la vitesse de cisaillement pour les 3 crèmes

Les courbes obtenues montrent deux régions de l'évolution de la viscosité. Pour la première région il s'agit d'un comportement Newtonien au repos ou la viscosité est constante (pseudo-plateau).

Pour la 2ème région caractéristique d'un système rhéofluidifiant (non Newtonien) ou nous avons observé une diminution de la viscosité avec l'augmentation de la vitesse de cisaillement.

Les 3 crèmes au repos sont constantes mais le plus visqueux entre eux c'est la crème qui préparée sous homogénéisation par procédé mécanique (en bleu), mais ne présente pas une grande différence avec la crème qui est préparée sous homogénéisation par ultra turrax (en rouge), et le moins visqueux c'est la référence Phanazole (en vert). D'autre part, nous avons observé une diminution de la viscosité des courbes et l'intersection entre les trois crèmes avec une augmentation de la vitesse de cisaillement.

5.4. Activité antibactérienne

Le tableau suivant nous montre également les résultats de l'activité antibactérienne de la crème et de la solution des AgNPs. Nous constatons qu'il n'y a pas d'activité obtenue par la

méthode de diffusion par disque contre les 3 souches bactériennes testés (*Escherichia coli*, *Staphylocoques aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Tableau 15 : Activité antibactérienne de la crème formulée et de la cinquième solution des AgNPs

Souche testées	Zone d'inhibition	
	Crème à 1%	Solution 5 des AgNPs
<i>Escherichia coli</i>	Absente	Absente
<i>Staphylocoques aureus</i>	Absente	Absente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Absente	Absente

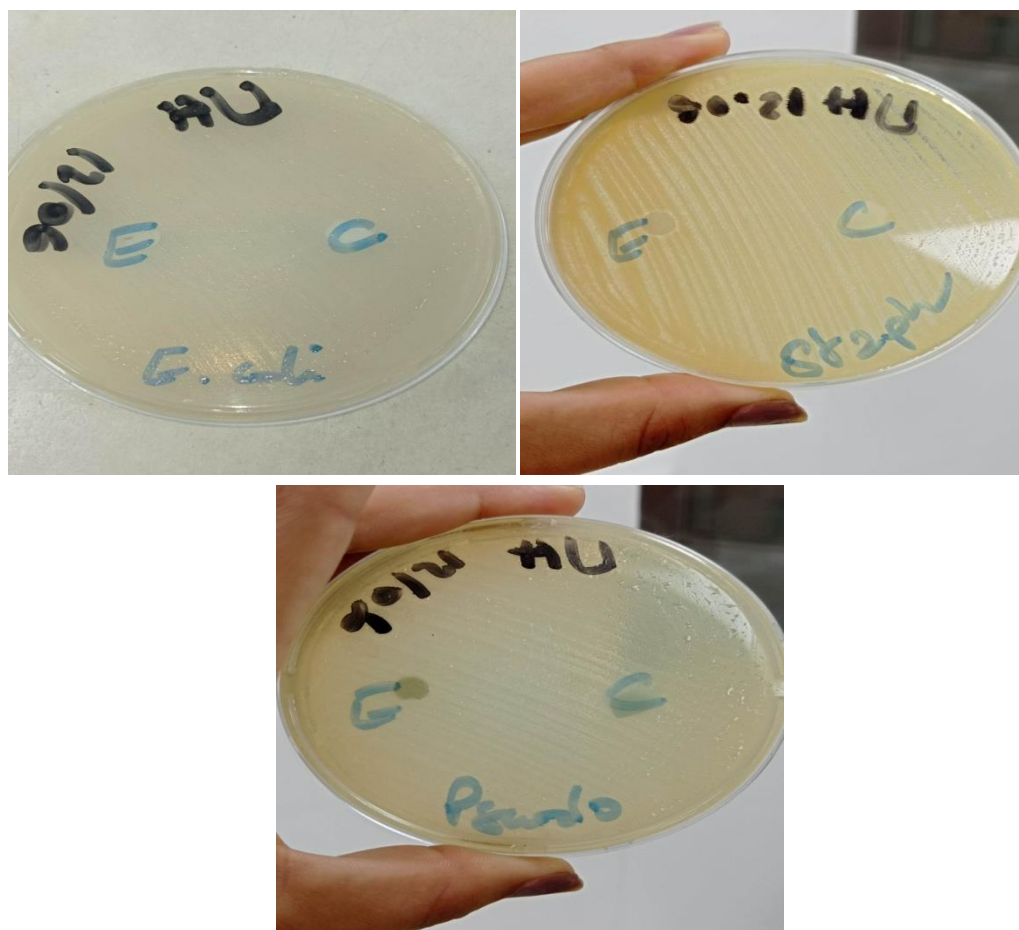


Figure 38: activité d'inhibition des AgNPs de la solution 5 et la crème contre 3 souches (*Escherichia coli*, *Staphylocoques aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).

L'absence de cette activité bactérienne est probablement due à une erreur de manipulation (repiquage des souches, ensemencement, manque de nutriment des souches, température d'incubation,.....). Car il s'est avéré que toutes les solutions des AgNPs ont un pouvoir antimicrobien important.

CONCLUSION GENERALE

Conclusion générale

L'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie présente un grand intérêt dans la recherche biomédicale. Ce regain d'intérêt vient d'une part du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de substance et de composé naturels bioactif et d'autre part du besoin de la recherche d'une meilleurs médication par une thérapie plus douce sans effets secondaire. Ces plantes possèdent des composés qui ont des propriétés antibactériennes et antifongiques

Dans ce travail, nous avons synthétisé des nanoparticules d'argent en utilisant des extraits des plantes comme agent réducteur. Nous avons choisi les plantes *Melia Azedarach* et *Mentha pulegium*. Les précurseurs utilisés sont le Nitrate d'argent (AgNO_3), Cette méthode de synthèse nous a permis de préparer des nanoparticules d'argent stable.

L'observation des résultats donnant par l'UV-VISIBLE montre que la solution 5 de (2,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +7,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+40 ml AgNO_3) présent la meilleur absorbance 3.7 (Abs) qui assure une solution des AgNPs plus stable

Dans ce contexte, l'activité antimicrobienne de la solution 5 des AgNPs (2,5ml de solution d'extrait de *Melia Azedarach* +7,5ml de la solution d'extrait de *Mentha Pulegium*+ AgNO_3) et les teste physico chimique, organoleptique, les comportements rhéologiques ont été évalués.

Les spectres d'IRTF des différents extraits enregistrés mettant en évidence la présence des groupements O-H, N-C, $\text{C}=\text{O}$

Enfin, une crème a été formulée avec succès à base de solution d'argent colloïdal qui été synthétisé. La crème est une émulsion H/E, dont les tests physicochimiques, rhéologique et de stabilité sont conformes aux normes pharmaceutiques. La crème répond négativement au test de l'activité antimicrobienne qui est du probablement à des erreurs de manipulations, donc il souhaitable de reterser cette activité.

Références

- [1] Coimbatore, Tamilnadu, 29 July 2009. Symposium on ayurveda and modern biology at Arya Vaidya Chikitsalayam & Research Institute (AVC).
- [2] J. Green Pharm. 2020, 14, 1–7. Palei, N.N. Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Lantana camara* and its antimicrobial activity. Int.
- [3]. Gogoi, B.; Kumar, R.; Upadhyay, J.; Borah, D2020, 2, 1–7. Facile biogenic synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) by *Citrus grandis* (L.) Osbeck fruit extract with excellent antimicrobial potential against plant pathogens. SN Appl. Sci.
- [4] Otunola GA, Afolayan AJ 2018. In vitro antibacterial, antioxidant and toxicity profile of silver nanoparticles green-synthesized and characterized from aqueous extract of a spice blend formulation. *Biotechnol Equip.*;32(3):724–733.
- [5] J Radiat Res Appl Sci. 2016; 9. Ahmed S, Ahmad SM, Swami BL. Green synthesis of silver nanoparticles using *Azadirachta indica* aqueous leaf extract.
- [6] Majeed A, Ullah W, Anwar AW *Mater Technol* 2018; 33. Costeffective biosynthesis of silver nanoparticles using different organs of plants and their antimicrobial applications: a review.
- [7] .Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM 2018. Anticancer potential of green synthesized silver nanoparticles using extract of *nepeta deflersiana* against human cervical cancer cells (HeLA). *Bioinorg Chem Appl*.
- [8] Boustal.D, Ennabili.A, 2011- L’Institut national des plantes médicinales et aromatiques au service du développement de la phytothérapie au Maroc, 297-303p.
- [9].Chabrier, J.Y., 2010. Plantes médicinales et formes d’utilisation en phytothérapie. Diplôme d’état de docteur en pharmacie. Université Henri Poincaré - Nancy 1.165p.
- [10] Benkhniq, O., Zidane, L., Fadli, M., Elyakoubi, H., Rochdi, A. et Douira, A., 2011. Etude ethnobotanique des plantes médicinales dans la région de Mechraa Bel Ksiri (Région du Gharb du Maroc).

- [11] Sebai M. et Boudali, M., 2012. La Phytothérapie entre la confiance et méfiance. Mémoire professionnel d'infirmier de la sante publique. Institut de formation paramédical, Alger.65p.
- [12] Chemar K., 2016.Etude ethnobotanique de quelques plantes médicinales spontanées de la région EL Outaya. Mémoire de master, Univ. Mohamed Khider, Biskra, 8-11p
- [13] Hammiche, V., Maiza, K. (2006). Traditional medicine in Central Sahara: pharmacopoeia of Tassili N'ajjer. Journal of ethnopharmacology, 105(3), 358-367).
- [14] Hamel, T., Boulemtafes, A. (2017). Plantes butinées par les abeilles à la péninsule de l'Edough (Nord-Est algérien). Livestock Research for Rural Development, 29(9), 1-13.
- [15] Amadou D., 2005 Amadou Diallo. , 2005. Etude de la phytochimie et des activités biologiques de *Syzygium guineense* willd.(myrtaceae). Thèse de pharmacie. République de mali. 100p.
- [16] Selles C, 2012. Valorisation d'une plante médicinale à activité antidiabétique de la région de Tlemcen : *Anacyclus pyrethrum* L, Application de l'extrait
- [17] Benhammou N., (2012). Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Thèse de doctorat en Biologie.Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.2p
- [18].Marino Grazia., Gaggia Francesca., Filippo Saiano., Bruno Biavati et Bruno
- [19]Juan Andreu., Albert Sans et Magi Riba (2000). Antifeedant activity of fruit and seed extracts of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica*. 28 (4), 311-319.
- [20] Jazzar Chantal et Efat Abou-Fakhr Hammad (2003). The efficacy of enhanced aqueous extracts o *Melia azedarach* leaves and fruits integrated with the *Camptotylus reuteri* releases against the sweetpotato whitefly nymphs. *Bulletin of Insectology*. 56 (2), 269-275
- [21]<https://fr.wikipedia.org/wiki/Azadirachtine>
- [22] .(Schmutterer, 2002 ; Morgan, 2009 ; Paes et al., 2011 ; Koriem, 2013 ; Chattopadhyay 2014)

- [23]Mordue L.A.J., Morgan E.D., Nisbet A.J., 2005. Azadirachtin, a natural product in insect control. In : Gilbert LI, Iatrou K, Gill SS eds. *Comprehensive Molecular Insect Science*. Oxford, UK: Elsevier: 117-35. 7
- [24].Benelli, G., Canale, A., Toniolo, C., Higuchi, A., Murugan, K., Pavela, R., Nicoletti, M., 2017. Neem (*Azadirachta indica*): towards the ideal insecticide? *Natural product research* 31, 369–386.
- [25]Ghedira, K., Goetz, P., 2014. *Azadirachta indica* A. Juss- Neem, Meliaceae. *Phytothérapie* 12:252-257.
- [26],Puri, H.S., 1999. *Neem: the divine tree Azadirachta indica*. CRC Press, Amsterdam
- [27] Ketkar, C.M., 1976. Utilization of neem (*Azadirachta indica* Juss.) and its by-products [sic]. Khanna, J., Medvigy, D., Fueglistaler, S. and Walko, R., 2017. Regional dry-season climate changes due to three decades of Amazonian deforestation. *Nature Climate Change*, 7(3), pp.200-204..
- [28]Benayad, N. (2008). *les huiles essentielles extraites des plantes medicinales marocaines : moyen efficace de lutte contre les ravageurs des denrees alimentaires stockees* . 63 p.
- [29]Larry G., 2002. French, « Isolation of (R)-(+)-Pulegone from the European Pennyroyal Mint, *Mentha Pulegium*», [HYPERLINK The Chemical Educator](#), vol. 7, p. 270–277.
- [30] (Balland, 1882).Balland. (1882). *Travaux scientifiques des pharmaciens militaires français*. (Asselin, Éd.) Paris, France.
- [31] R.Teuscher Anton, A. Lobstein, (2005). « *Plantes aromatiques : épices, aromates, condiments et huiles essentielles*»,
- [32] B. Abde Kader, (2003). « *Plantes médicinales d’Algérie*. Office des Publications Universitaires OPU».
- [33] Paul-Victor Fournier Omnibus, 2015 (compilateur : Clotilde Boisvert), *30 plantes utiles Herbes, arbres, plantes alimentaires : leur histoire, leurs vertus*,
- [34] <https://phytotherapie.pagesjaunes.fr/astuce/voir/421113/menthe-pouliot>

- [35] D.E. Belfennache, (2012), Elaboration et étude de nanoparticules Au/TiO₂ et Ag/TiO₂, Thèse de Doctorat, Département De Physique, Université MENTOURI, Constantine, pp.5-6.
- [36] Chauvel R., (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1, 105p.
- [37] Reyes M., Benjamín O., Manuel C., (2018). Antimicrobial Engineered Nanoparticles in the Built Cultural Heritage Context and Their Ecotoxicological Impact on Animals and Plants : A Brief Review. *J. Heritage Science.* ; 6 (1) : 52. doi.org/10.1186/s40494-018-0219-9.
- [38] Ophélie Z., (2008). Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat en Physicochimie. L'université Paris VI - Pierre et Marie Curie, 330p.
- [39] Nasrollahzadeh. M, S. Mahmoudi-Gom Yek, (2019) «Recent developments in the plant-mediated green synthesis of Ag-based nanoparticles for environmental and catalytic applications, 19 2436-2479.
- [40] A. Kumar, P.K. Vemula, P.M. Ajayan and G. John, (2008) *Nature materials*, 7, 236.
- [41] G. Franci, A. Falanga, S. Galdiero, L. Palomba, M. Rai, G. (2015) Morelli and M. Galdiero, *Molecules*, 20, 8856.
- [42] S.-j. Yu, Y.-g. Yin and J.-f (2013). Liu, *Environmental Science : Processes & Impacts*, 15, 78
- [43] Wijnhoven SW, Peijnenburg WJ, Herberts CA, Hagens WI, Oomen AG, Heugens EH, Roszek B, Bisschops J, Gosens I, Van De Meent D. (2009). Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology* 3(2):109-138.
- [44] Birla S, Tiwari V, Gade A, Ingle A, Yadav A, Rai M. (2009). Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology* 48(2):173-179.

[45] Simchi A, Ahmadi R, Reihani SS, Mahdavi A. (2007) Kinetics and mechanisms of nanoparticle formation and growth in vapor phase condensation process. *Materials & design* 28(3):850-856.

[46] Bulgakova, N. and A. Bulgakov (2001). "Pulsed laser ablation of solids: transition from normal vaporization to phase explosion." *Applied Physics A* 73(2): 199-208.

[47] Shannon MA, Mao XL, Fernandez A, Chan W-T, Russo RE. (1995). Laser ablation mass removal versus incident power density during solid sampling for inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Analytical Chemistry* 67(24):4522-4529.

[48] (Prateek 2017)

[49] (Tran 2013)

[50]-Chauvel R., (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1,105p

[51] Muhammad R., Rafique M., (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.

[52].-Chauvel R., (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1,105p

[53] Sadaf I., Rafique M., (2014). 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.

[54].Prateek M., Ramateke S., Jain N.K., (2017). Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial cells nanomedicine and biotechnology journal*. ; doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825properties of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.)Fruits. *Journal Food science and technology*, 5(1) : 29-33.prophylactiques et emplois en thérapeutique. *Phytothérapie*, 04, 162-169.

[55].Tran Q., Nguyen V., (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.[doi.org/doi:10.1088/2043-6262/4/3/033001](https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001). Adv. Nat. Sci. : Nanosci. Nanotechnol journal. ; 033001 :20.

[56].Soualeh N., Soulimani R. (2016). Huiles essentielles et composés organiques volatils,
[57].Zhang X., Liu Z., Shen W. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci.; 17: 1534; doi: 10.3390/ijms17091534

[58].Keerawelle B., Chamara A., (2019). Green Sunthesis of Silver Nanoparticlcs via Medicinal Plant Extracts and Their Antibacterial Activities. World Journal of Pharmaceutical Research. ; 8 (7) : 100-111 ; 2277– 7105.

[59].Chauvel R., (2018). Application des nanoparticules d’argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1,105p

[60].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.06.019

[61] Sista Kameswara Srikar 2016 Green and Sustainable Chemistry, 6, 34-56

[62] Carolina D.S., Marcelo S., Avinach P. (2014).Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. Journal of pharmaceutical sciences. doi.org/10.1002/jps.24001.

[63] Muhammad R., Sadaf I., Rafique M. (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.

[64]. Tran Q., Nguyen V., (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.[doi.org/doi:10.1088/2043-6262/4/3/033001](https://doi.org/10.1088/2043-6262/4/3/033001). Adv. Nat. Sci. : Nanosci. Nanotechnol journal. ;033001 :20.

- [65] Chauvel R., (2018). Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1,105p.
- [66] -Zhang X., Liu Z., Shen W., 2016. Silver Nanoparticles : Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.*; 17: 1534; doi: 10.3390/ijms17091534.
- [67]. 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
- [68]. Keywan M., Najaf M., Samadian H., (2019). Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Journal of Chemico-Biological Interactions*. ; 312. doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108814
- [69]. Carolina D.S., Marcelo S., Avinach P., (2014). Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *Journal of pharmaceutical sciences*. doi.org/10.1002/jps.24001.
- [70] Li W., Xiao-Bao X., Qing-Shan S., (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *J Biometals*. ; 24:135–141 DOI 10.1007/s10534-010-9381-6.
- [71] Sang H., Jun B., (2019). Silver Nanoparticles: Synthesis and Application for Nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci*; 20: 865. doi :10.3390/ijms20040865.
- [72] Prateek M., Ramateke S., Jain N.K., (2017). Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial cells nanomedicine and biotechnology journal*. ; doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825.
- [73] Zhang L., Wu L., Youbin S., (2018). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PLOS ONE journal*. ; doi.org/10.1371/journal.pone.0209020.