

Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :
N° de série :

Faculté des Sciences et Technologies
Département de Génie des procédés

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de

MASTER

Domaine : *Sciences et Technologies*

Filière : *Génie des procédés*

Spécialité : *Génie chimique*

Par : **Metiaz Hadj Mohammed**
Boudiba Ahlem

Thème

SYNTHESE, CARACTERISATION DES NANOPARTICULES
D'ARGENT A BASE D'EXTRAIT DES FEUILLES DE PLANTES
ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE ANTIOXYDANTE ET
ANTIMICROBIENNE

Soutenu publiquement le : 24 /09/2020

Devant le jury :

Dr Bokhari Hamed	MCB	Univ. Ghardaïa	Président
Dr. Touaiti Farid	MCB	Univ. Ghardaïa	Examineur
Dr. Baba arbi Iias	MAA	Univ. Ghardaïa	Examineur
Dr. Khane Yasmina	MCB	Univ. Ghardaïa	Encadreur

Année universitaire 2019/2020

Remerciements

Nous tenons à présenter nos remerciements au plan, à notre Dieu qui nous accompagner et nous a donné la force afin d'effectuer ce modeste travail.

Nous souhaiterions tout d'abord remercier Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique ainsi que **l'Université de Ghardaïa** qui nous ont offert l'opportunité d'effectuer ce travail de thème dans les meilleures conditions.

Nous voudrions témoigner toute notre reconnaissance d'avoir bien voulu faire partie de ce jury.

Nous aimerions exprimer notre admiration sans limite pour Madame le Docteur **Khane Yasmina**, directeur de ce thème. Grâce à sa bonté et sa gentillesse. Sans lui, ce thème n'aurait jamais été. Il nous a fait une grande confiance en nous proposant cette étude et en acceptant d'encadrer notre travail. Nous lui sommes extrêmement reconnaissants pour nous avoir consacré ce temps, surtout dans la correction de ce manuscrit.

Nous tenons à remercier également les enseignants ayant contribué à notre formation rendant ainsi ce cursus très bénéfique à plus d'un titre.

Nous voudrions remercier également l'ensemble des membres du laboratoire pour leur gentillesse et leur soutien, sans oublier ma collègue.

Merci également à tous ceux qui, un jour ou l'autre, nous ont offert leur amitié et des moments inoubliables tout au long de notre cursus universitaire.

Enfin, Nous ne pourrions oublier de remercier du fond du cœur nos parents, mes frères, mes sœurs, ma femme, mes petites filles, toute ma famille et mes amis pour nous avoir toujours permis de suivre le chemin des études. Merci pour leurs soutiens, leurs encouragements et surtout leur amour qui a toujours été une source motivante.

Après les nuages il y a de la pluie et qu'après la pluie il y a toujours un beau temps ...

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

Pour ma Mère qui représente la lumière de notre existence L'étoile brillante de notre réjouissance et ma vie, Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

Pour mon père qui il y a Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous, Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon collègue Ahlem, qui a partagé le travail avec moi.

A Mes chers frères et sœurs : Smail, Taha, Sihem, Djaber, Aicha, Ayoub.

A Mon épouse pour son soutien inconditionnel tout au long de mes études et la confiance qu'elle m'a toujours témoigné.

Aux deux chères filles : Ferdous, Ikhlas.

A mes très chers amis : Banouh, Ahmed, Kacem, hamada, Ilyes, Toufik qui m'ont toujours soutenu.

A tous mes amis qui me connaisse de près ou de loin.

Hadj Mohammed

Dédicaces

Je dédie ce travail

A mon très cher père, qui grâce à lui je suis arrivé à ce stade.

A ma très chère mère lumière de ma vie, source d'amour de tendresse et de soutien éternel.

A mon mari et mes enfants : Aya, Maya, Nadji et IAD.

A mes frères Abbas, Mohamed, Ahmed et Adam.

A mes sœurs : Kawtar, Hayet, Nafissa et Romaisa.

A mes petits : Jad, Taki, Baïlessèn, Amjad, Roia, Alla et Soujoud

Ahlem

Résumé :

L'utilisation de l'extrait des plantes comme un bioréacteur pour la production des nanoparticules d'argent a attiré l'attention en raison de son protocole rapide, écologique, non pathogène et économique.

ce travail est d'étudier la possibilité de synthèse des nanoparticules d'argent à l'aide d'extrait des feuilles de citron (*Citrus limon*), et caractérisation de ces nanoparticules par, UV visible, FTIR, MEB et EDX pour déterminer leur taille et leur composition, ainsi démontrer que les nanoparticules d'argent synthétisés présentent certaines activités antioxydants suivi la méthode de Piégeage du radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH) et évalué in vitro leur effet antimicrobien par la méthode de diffusion de puits en milieu solide.

Nos résultats de caractérisation montrent que les nanoparticules d'argent ont été synthétisés avec succès et présentent un spectre de résonance plasmon de surface avec un maximum d'absorption à 782,12 nm, ainsi que la stabilisation des ions Ag à nanométrique particules de forme sphérique avec différent diamètre inférieure à 10 confirmées par spectroscopie FTIR, MEB et EDX.

D'autre coté, les nanoparticules d'argent synthétisées ont été montrés un effet bactéricide très efficace contre les trois types des bactéries (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) et une activité antifongique vis-à-vis le *Candida albicans* et ainsi des propriétés antioxydant raisonnables.

La somme des résultats obtenus au cours de cette étude montre clairement que Les nanoparticules d'argent possèdent un potentiel important pour les activités biologiques investiguées. De ce fait, le bio-ingrédients présents dans l'extrait de plante était efficaces pour la synthèse des nanoparticules d'Ag avec une efficacité biologique qui offre la possibilité de l'incorporer dans la composition des produits alimentaires et pharmaceutiques.

Mots clé : Argent, feuille, citrus limon, nanoparticule, biosynthèse.

Abstract:

The use of plants extract as the production assembly of silver nanoparticles has drawn attention, because of its rapid, eco-friendly, non-pathogenic, economical protocol.

this work is to study the possibility of synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of Citrus limon and characterized using UV visible, FTIR, MEB and EDX to determine their size and their composition. This study has also revealed the antioxidant activity of Ag NPs followed the 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl radical scavenging assay (DPPH·) and evaluated in vitro their antimicrobial effect using Agar well diffusion method.

Our results of characterization showed that the silver nanoparticles were synthesized successfully and present surface plasmon resonance with an absorption maximum at 782,12 Nm, as well as the stabilization of the ions Ag to nanometric particles of spherical form with different diameter lower than 10 confirmed by spectroscopy FTIR, MEB and EDX.

Another side, the silver nanoparticles synthesized were shown a very effective bactericidal effect against the three types of the bacteria (Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus) and a antifongic activity opposite Candida albicans and a reasonable antioxydant properties.

The sum of the results obtained during this study shows clearly that the silver nanoparticles has a significant biological. So the bio-ingredients present in the plant extract was effective for the synthesis of silver nanoparticles with a biological effectiveness which makes it possible to incorporate it in the composition of the foodstuffs and medicinal.

Key words: silver, leaves, citrus silt, nanoparticle, biosynthesis.

Liste des abréviations :

Ag : Argent

Au : Or

Cu : Cuivre

NPs : Nanoparticules

Ag NPs : Nanoparticules d'argent

DRX : Diffraction des rayons X

UV - vis : Ultraviolet visible spectromètre

FTIR : Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

MEB : Microscopie électronique à balayage

EDX : Spectroscopie dispersive en énergie des rayons X

LSPR : le phénomène de résonance de plasmons de surface localisées

SERS : diffusion Raman exaltée de surface

ClAuPPh₃ : Le sel d'or

TBAB : le tert-butylamine borane

ClAg(PPh₃)₃ / NO₃Ag(PPh₃)₃ : les sels d'argent

HAuCl₄ : tétrachloroauric acide

IR : Le spectromètre infrarouge

mM : mili Mole

pH : Potentiel d'Hydrogène

tr / min : Tour /minute

nm : Nanomètre

µl : Microlitre

DPPH : radical 1, 1-Diphényl-2 picrylhydrazyl

UFC/ml : Unité Formant une Colonie/millilitre

Listes des figures :

Figure 1 : Le nano-monde.	5
Figure 2 : Nanomatériaux manufacturés, selon la norme ISO TS 80004 1&2.	6
Figure 3 : Schéma récapitulatif des différents types de nanomatériaux.	8
Figure 4 : Exemples des nanomatériaux.	8
Figure 5 : Représentation schématique des deux grandes approches de synthèse de Nanomatériaux.	12
Figure 6 : Les principaux types de bio-réducteurs végétaux impliqués dans la synthèse des nanoparticules métalliques : A - terpénoïdes (eugénol) ; B, C – flavonoïdes (lutéoline, quercétine) ; D - un hexose réducteur à chaîne ouverte ; E, F – acides aminés (tryptophane (E) et tyrosine (F)).	16
Figure 7 : Illustration de l'étape de nucléation.	17
Figure 8 : Une représentation schématique du mécanisme de synthèse des nanoparticules métalliques dans un extrait végétal.	18
Figure 9 : Utilisation de nanoparticules dans les objets du quotidien.	23
Figure 10 : Organigramme descriptif de la méthodologie de l'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle du citron.	26
Figure 11 : la morphologie de Citrus et La plante de Citrus limon.	27
Figure 12 : Géographie de la zone de prélèvement des feuilles du citron	28
Figure 13 : photographies des feuilles du citron.	29
Figure 14 : Extraction aqueuse avec montage à reflux.	29
Figure 15 : Schéma illustrant le protocole de préparation de nanoparticules d'argent par extrait de feuilles du citron.	31
Figure 16 : Mécanisme de réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.	33
Figure 17 : Le spectre d'absorption UV-Vis de nanoparticules d'argent produites.	41
Figure 18 : Spectre FTIR d'extrait des feuilles du citron et NPs d'Ag.	42
Figure 19 : image MEB des nanoparticules synthétisées.	43
Figure 20 : Spectre EDS des Ag NPs synthétisées.	43
Figure 21 : Mécanisme de la réaction d'Ag NPs.	44
Figure 22 : Mécanisme de réduction de radical DPPH (Décoloration de la solution du DPPH du violet en jaune).	45
Figure 23 : l'évaluation de la réduction du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique, L'extrait des feuilles du citron et NPs d'Ag.	45

Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique, les extraits des feuilles de citrus limon et NPs d'Ag.

Liste des tableaux :

Tableau 01 : Les domaines des applications des nanotechnologies.	9
Tableau 02 : Propriétés physiques de l'argent.	11
Tableau 03 : Principaux réducteur et stabilisant biologique des nanoparticules.	15
Tableau 04 : Classification de citrus limon.	28
Tableau 05 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées.	36
Tableau 06 : Les composés phénoliques d'extrait de citron limon.	39
Tableau 07 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH et les valeurs de CE ₅₀ des échantillons testés.	46
Tableau 08 : résultats de l'activité antibactérienne de nos produits par la méthode de diffusion en milieu solide.	48

SOMMAIRE

Résumé	I
Abstract	II
Liste des abréviations	III
Listes des figures	IV
Liste des tableaux	V
Introduction générale	1
 <i>CHAPITRE I : RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE</i>	
I.Introduction	4
II.Le nanomonde	4
II.1. Nanotechnologies	5
II.2. Nanomatériaux	5
II.2.1. Les nano-objets	6
II.2.1.1. Les nanoparticules	7
II.2.1.2. Les Nano-fibres	7
II.2.1.3. Les Nano-feuillets	7
II.2.2. Les matériaux nano structurés	7
II.2.2.1. Les agrégats et agglomérats de nano-objet	7
II.2.2.2. Les nano-composites	7
II.2.2.3. Les matériaux nano-poreux	8
III.Applications des nanotechnologies et des nanomatériaux en fonction des secteurs d'activité	9
IV.Les nanoparticules d'argent	10
IV.1. L'argent	10
IV.1.1. Introduction	10
IV.1.2. Propriétés physiques et chimiques de l'Argent	11
IV.2. Les méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent	12
IV.3. Synthèse verte des Nanoparticules d'argent	14
IV.3.1. Réductions biologiques	14

IV.3.2. Le rôle des métabolites des plantes dans liaison et la bioréduction des ions métalliques	15
IV.4. Mécanisme de formation de nanoparticules d'argent	17
IV.5. Facteurs influent sur la formation de NPs métalliques dans les plantes	18
IV.5.1. Effet de la température	19
IV.5.2. Effet du pH	19
IV.5.3. Effet du temps de contact	19
IV.5.4. Effet de la concentration de l'extrait végétal	19
IV.6. Méthodes analytiques de suivi de la réduction des ions Ag ⁺	19
IV.7. Les méthodes de caractérisation des nanoparticules formées	20
IV.7.1. Diffraction des rayons X (DRX)	20
IV.7.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'analyse chimique (EDX)	20
IV.7.3. Spectroscopie UV-visible	21
IV.7.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	21
IV.8. Applications des nanoparticules de métaux nobles	22
IV.8.1. Activité antibactérienne	23
V.Conclusion	24

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I. Objectif	25
II. Matériels et méthodologie	27
II. 1. Présentation du matériel végétal	27
II. 2. Description de la plante (les feuilles du citron - <i>Citrus limon</i> -)	27
II. 3. Échantillonnage et collecte	28
III. Montage et protocole général de synthèse	29
III. 1. Préparation de l'extrait aqueuse des feuilles du citron (<i>Citrus limon</i>)	29
III. 2. Préparation de l'extrait de la plante poudre	30
III. 3. Biosynthèse des nanoparticules d'argent	30
IV. Analyse et Caractérisation	32
IV. 1. Analyse des caractéristiques physico-chimiques d'extrait des feuilles du citron	32
IV.1.1. Extraction des composés phénoliques	32
IV.1.2. Dosage des composés phénoliques	32
IV.1.2.1. Dosage des poly phénols totaux	32

IV.1.2.2. Dosage de la concentration en flavonoïde	33
IV.2. Caractérisation des nanoparticules préparées	34
IV.3. Evaluation des activités biologiques	34
IV.3.1. Evaluation de l'activité antioxydant avec la méthode antiradicalaire contre le radical DPPH	34
V. Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique	35
V.1. Les souches bactériennes pathogènes	35
V.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne	36

CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I. L'analyse des composés phénoliques de l'extrait des feuilles du citron	39
II. La Biosynthèse des nanoparticules d'argent à base de l'extrait des feuilles du citron	40
II.1. Spectrophotomètre UV-visible	40
II.2. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	41
II.3. Caractérisation par spectroscopie électronique à balayage MEB et EDX	43
II.4. Mécanisme de formation des nanoparticules d'argent	44
II.5. Les résultats des activités biologiques	44
II.5.1. L'activité antioxydante avec Piégeage des radicaux DPPH°	44
II.5.2. L'activité antibactérienne et antifongique	47
Conclusion générale	50

Références bibliographiques

Références numériques

Annexes

Introduction générale

De nos jours, l'apparition de la nanoscience et la nanotechnologie représente l'un des développements les plus prometteurs des sciences de la matière, elles s'intéressent à la conception, la caractérisation, la production et l'application de matériaux et de produits obtenus par un contrôle de la structure, de la forme et de la taille à l'échelle nanométrique (1 à 100 nm). Ces métaux présentent des nouvelles propriétés physico-chimique plus avantageuses et uniques qui très différentes de celles du même matériau à l'état massif ou à l'état atomique. [1]

Depuis une vingtaine d'années, la communauté scientifique et le secteur industriel s'intéressent au développement des nanomatériaux dans différents domaines contenant une synthèse de trois grandes familles : les nano-objets (nanoparticules, nanotubes, nanofibres), les matériaux structurés en surface et les matériaux structurés en volume et différentes méthodes (physique, chimique, biologique) permettent leur fabrication. [2]

Les agrégats métalliques de taille nanométrique sont connus et exploités depuis des siècles. Généralement, Les métaux nobles ou précieux y compris l'argent (Ag), l'or (Au) et le cuivre (Cu) (moins noble) sont des éléments chimiques métalliques rares possédant une grande résistance face à la corrosion et l'oxydation, d'où l'origine du nom « noble ». A l'échelle nanométrique, ces métaux présentent des propriétés optiques spectaculaires liées au phénomène de résonance de plasmon, dont découlent de nombreuses applications.

Donc, les nanoparticules métalliques sont connus une large considération en raison de sa demande dans la variété des domaines, y compris les sciences biomédicales, l'industrie chimique, l'électronique, la livraison de médicaments-gène et biocapteur, etc... [3]. L'intérêt d'étudier ce type de métaux réside principalement dans leurs propriétés physicochimiques exceptionnelles (électriques, optiques, thermiques, électroniques...etc). Ces propriétés dépendent fortement de la taille et la forme des nanoparticules préparées. Donc, il serait très utile de contrôler ces deux paramètres dans le procédé de synthèse selon les applications envisagées, tel que la photocatalyse (effets plasmoniques dans des réactions photocatalytiques) et en biologie pour des activités antibactériennes. [4]

L'argent (Ag) est le métal de choix parmi les métaux nobles pour des applications potentielles dans le domaine des systèmes biologiques, de la matière organique et de la médecine. [5]

Les méthodes biosynthétiques ont été étudiées pour la production des NPs d'Ag apparue comme une approche prompte et simple de synthèse, peu couteuse, respectueuse de l'environnement et rentables. [5]

Les produits végétaux trouvent une utilisation impérative dans la synthèse des nanoparticules d'argent (Ag NPs) sans l'utilisation de produits chimiques difficiles [6], toxiques et dangereux. Ceci est principalement obtenu par l'utilisation d'extraits de plantes ou de fruits [7] et de bioorganismes [8] Ceci conduit généralement à la formation de nanoparticules cristallines avec une variété de formes (sphères, tiges, prismes, plaques, aiguilles, feuilles ou dendrites), avec des tailles comprises entre 1 et 100 nm. Ces caractéristiques dépendent principalement des paramètres du processus, tels que la nature de l'extrait végétal et les concentrations relatives de l'extrait et du (s) sel (s) métallique (s), le pH, la température et le temps de réaction, ainsi que le taux de mélange de l'extrait végétal Et sel (s) métallique (s). [9]

Dans ce contexte, ce travail de mémoire a donc pour objectif de proposer des procédés d'élaboration de nanoparticules d'argent à travers la voie verte, simple, rapide et propre vis-à-vis de l'environnement et du manipulateur. Pour répondre à ces critères, nous avons choisi de synthétiser les NPs d'Ag à l'aide d'extrait des feuilles du citron, et caractérisation de ces nanoparticules par XRD, UV visible, FTIR, MEB et EDS ainsi démontrer que les nanoparticules d'argent synthétisés présentent certaines activités antioxydants et antimicrobienne.

Le mémoire décrivant ce travail est entamé par cette introduction générale qui pose la problématique et donne une idée sur l'importance du thème abordé tout en exposant clairement l'objectif visé et se décompose en trois chapitres.

Le premier chapitre a tout d'abord pour but de présenter d'une étude bibliographique sur l'histoire des nanotechnologies, nanosciences, nanomatériaux et nanoparticule, les principales méthodes de synthèse de nanoparticules métalliques, les propriétés, les caractérisation et applications plus particulièrement la biosynthèse de nanoparticules d'argent. Nous abordons ensuite les différentes techniques utilisées pour leur caractérisation puis leurs principales propriétés spécifiques liées à leur taille et à leurs organisations, en particulier, Les propriétés biologiques.

Le deuxième chapitre présentera l'approche que nous avons développée pour synthétiser des nanoparticules d'argent de tailles et de cristallinité contrôlées. Elle repose la synthèse verte des nanoparticules avec la réduction de sels "métallo-organiques" avec l'extrait des feuilles du citron ainsi que les diverses techniques instrumentales utilisées pour la caractérisation de suspensions de nanoparticules métalliques.

Le troisième chapitre présente les résultats obtenus au cours de ce travail avec une discussion en fonction de différents paramètres expérimentaux intervenants dans la synthèse et les conclusions marquantes.

Enfin, nous concluons sur les principaux résultats significatifs marquants au cours de ce travail de mémoire et nous proposons des perspectives mises en relief afin de résumer l'originalité et l'intérêt du travail effectué.

Chapitre I :
Rappel bibliographique

I.Introduction

La nanotechnologie se développe à plusieurs niveaux : matériaux, dispositifs et systèmes. Les nanomatériaux sont inférieurs à quelques centaines de 100 nm. Cette réduction de taille entraîne des modifications importantes de leurs propriétés physiques par rapport à celles observées dans les matériaux en vrac [10]. La plupart de ces changements sont liés au confinement quantique et la grande énergie de surface en raison de la diminution de la taille et à l'origine de phénomènes tels que le super paramagnétisme, le blocage de Coulomb, la résonance plasmonique de surface, etc... [11]

Depuis les années 80, de nombreuses méthodes de synthèses aussi bien physiques que chimiques sont développées pour l'obtention de divers matériaux (métaux, semi-conducteurs, alliages) à l'échelle nanométrique.

Dans les deux dernières décennies, les nanoparticules de métaux nobles ont suscité un grand intérêt en raison de leurs applications technologiques potentielles notamment dans le domaine des nanosciences. En effet, elles peuvent être utilisées en tant que matériaux pour la catalyse [12], filtres optiques [13], dispositifs plasmoniques [14], capteurs [15], imagerie biologique [16], coloration des verres induit par le phénomène de résonance de plasmons de surface localisées (LSPR) [17,18], revêtement antibactérien [19], photocatalyse [20], diffusion Raman exaltée de surface (SERS) [21]...etc. à cause de ces nouvelles propriétés physicochimiques uniques et exceptionnelles (électroniques, optiques, thermiques, électriques, catalytiques...etc) et ces propriétés dépendent fortement de la taille et de la forme des nanoparticules. Donc, il s'avère crucial de contrôler ces deux paramètres dans le procédé de synthèse.

II.Le nanomonde

L'unité de référence du monde des nanotechnologies est donc le nanomètre (nm). Le préfixe nano vient du grec *nannos* qui signifie nain. Un nanomètre est une unité de mesure qui équivaut à un milliardième de mètre ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m} = 0,000\ 000\ 001 \text{ m}$).

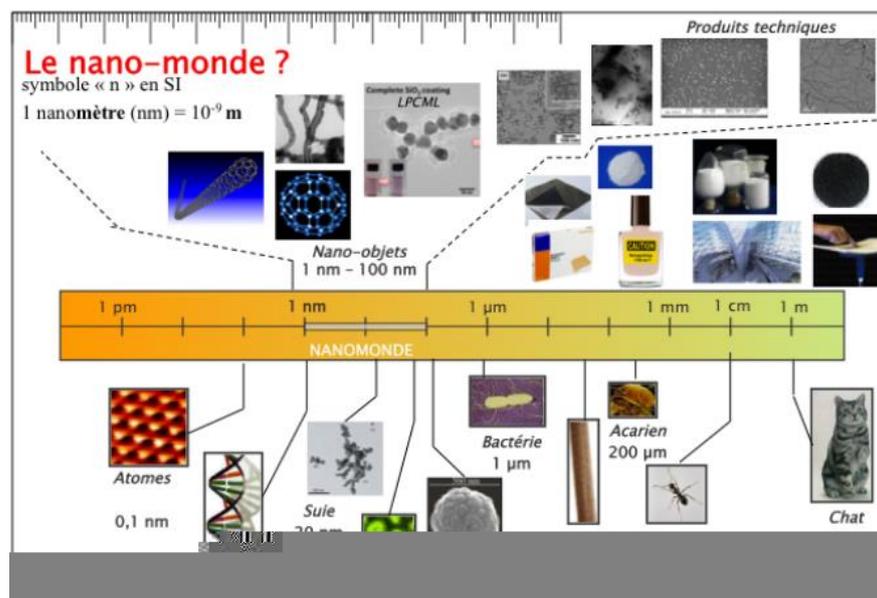


Figure 1 : Le nano-monde. [A]

II.1. Nanotechnologies

« Nanotechnologie » est un terme générique qui décrit des applications dans de nombreux domaines scientifiques mais recouvre d'une manière générale la recherche sur les principes et propriétés existant à l'échelle nanométrique. L'objectif des nanotechnologies consiste à produire des objets ou matériaux inférieurs à 100 nanomètres. C'est-à-dire regroupent tout ce qui touche à la conception, la caractérisation, la production et l'application de structures, dispositifs et systèmes par contrôle de la forme et de la taille à l'échelle nanométrique. Les nanotechnologies relèvent de la recherche appliquée. Les applications concernées présentent un potentiel économique important dans de nombreux domaines tels que la médecine, la chimie, l'énergie, l'économie des ressources ou encore l'environnement. [22]

II.2. Nanomatériaux

Le 18 octobre 2011, la Commission européenne publie ses recommandations relatives à la définition des nanomatériaux (recommandation 2011/696/UE) : « on entend par "nanomatériau" un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm ». [23] Il existe deux grandes familles de nanomatériaux [24] :

- **Les nano-objets**
- **Les matériaux nano-structurés**

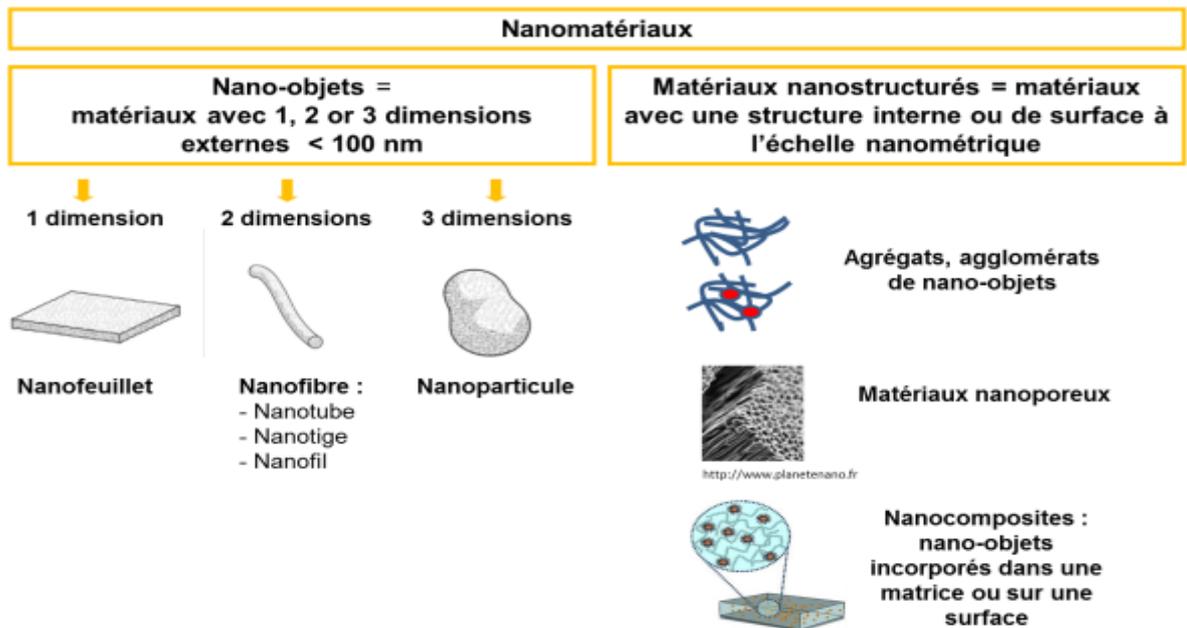


Figure 2 : Nanomatériaux manufacturés, selon la norme ISO TS 80004 1&2. [B]

II.2.1. Les nano-objets

Pour certains, un nano-objet est un objet dont toutes les dimensions dans l'espace sont de l'ordre du nanomètre (on entend par là comprises entre 1 et 100 nanomètres). Pour d'autres, Les nano-objets sont des objets dont au moins une des dimensions (longueur, diamètre, épaisseur) est comprise entre approximativement entre 1 et 100 nm. [25, 26]

Autour de nous, nous trouvons :

- Des nano-objets **naturels**,
- Des nano-objets **anthropiques**, c'est-à-dire non intentionnellement produits mais qui sont le résultat d'une activité humaine,
- Et des nano-objets **volontairement produits** à ces échelles pour les propriétés spécifiques que cette taille leur confèrent.

Les objets manufacturés à l'échelle nanométrique peuvent aussi être assemblés pour produire des objets dits « nano-structurés » qui peuvent atteindre une taille macroscopique.

Les nano-objets sont actuellement classés en fonction de leur taille et de leur forme. Ils peuvent se présenter sous la forme de particules fibres ou tubes, de couches minces ou de constituants structurels. Les nano-objets sont généralement décrits ou regroupés en termes des dimensions limitées à l'échelle nanométrique (ISO/TS 80004-1 :2015, 2.5) :

- Dans une dimension (nanoplaques) ;
- Dans deux dimensions (nanofibres, y compris les nanotubes) ; où
- Dans les trois dimensions (nanoparticules et points quantiques). [27, 28]

II.2.1.1. Les nanoparticules

Les nanoparticules sont des nano-objets dont les trois dimensions sont comprises entre un et cent nanomètres. La forme n'a aucune importance dans cette définition. Seul le paramètre de taille doit être respecté. Ainsi, on rencontre des nanoparticules de formes sphériques, oblongues ou encore anguleuses aussi bien sous forme amorphe que cristalline. [22] (ISO/TS 27687 : 2008).

II.2.1.2. Les Nano-fibres

Les nano-fibres sont des nano-objets dont seulement deux des trois dimensions sont comprises entre un et cent nanomètres. On peut rencontrer plusieurs formes de nano-fibres.

II.2.1.3. Les Nano-feuillets

Les nano-feuillets sont des objets dont une seule dimension est comprise entre un et cent nanomètres. Bien des formes sont possibles. Il résulte toutefois de la définition que la plupart des nano-feuillets ressemblent à de petites plaques qui peuvent s'empiler ou se recouvrir les unes les autres. [22]

II.2.2. Les matériaux nano structurés

Un matériau nanostructure comporte des nanoparticules dans sa structure, superficiellement (traitement de surface) ou dans tout son volume c.-à-d. qui a une **structure interne** ou de **surface** à l'échelle nanométrique. En 2010, les matériaux nanostructures représentaient environ un tiers du secteur des nanotechnologies. Il est possible de distinguer plusieurs familles, parmi lesquelles :

II.2.2.1. Les agrégats et agglomérats de nano-objet

Les nano-objets peuvent se présenter soit sous forme individuelle (c.-à-d. sous forme de particules primaires), soit sous forme d'agrégats ou agglomérats dont la taille est sensiblement supérieure à 100 nm. [29]

II.2.2.2. Les nano-composites

Le terme nano-composite définit un matériau constitué d'une matrice solide (métal, céramique, polymère...) dans laquelle des nano-objets sont incorporés. La définition ne précise pas si la dispersion doit être homogène ou non. Il importe toutefois de signaler que les propriétés macroscopiques d'un nano-composite dépendent fortement du caractère homogène ou non de la dispersion. Les buts recherchés par l'incorporation de nano-objets sont multiples et variés. Il peut s'agir d'un renforcement du matériau par rapport à certaines dégradations dont notamment la corrosion ou l'abrasion, l'amélioration de propriétés mécaniques telles que la résistance à la traction ou bien la dureté, ou encore l'amélioration de propriétés comme la

conductivité électrique ou thermique. Ces améliorations rendent les nano-composites intéressants et prometteurs pour les applications présentes et futures. [22]

II.2.2.3. Les matériaux nano-poreux

Un matériau nano-poreux est un matériau solide contenant des nano-pores. Un nano-pore est une cavité dont au moins une dimension est à l'échelle nanométrique et qui peut contenir un gaz ou un liquide. Le principal intérêt de ces composés poreux est d'être exploitables en séparation de gaz, en catalyse, en tamisage moléculaire, mais aussi d'offrir des potentialités remarquables comme structure hôte pour des molécules à propriétés optiques non linéaire ou magnétiques.

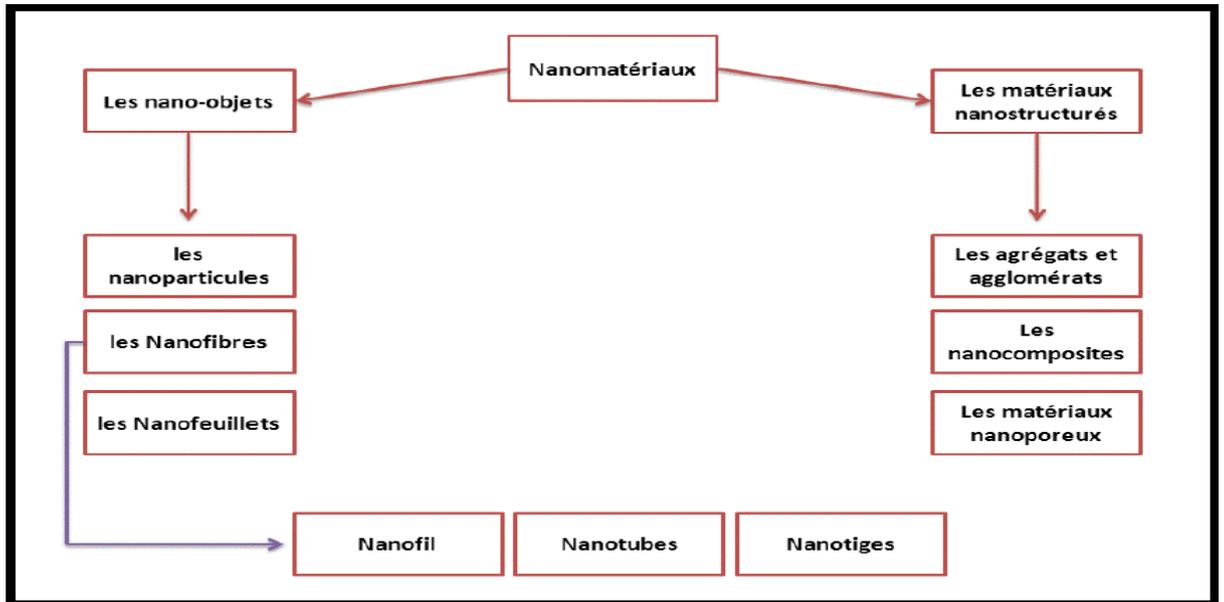


Figure 3 : Schéma récapitulatif des différents types de nanomatériaux. [30]

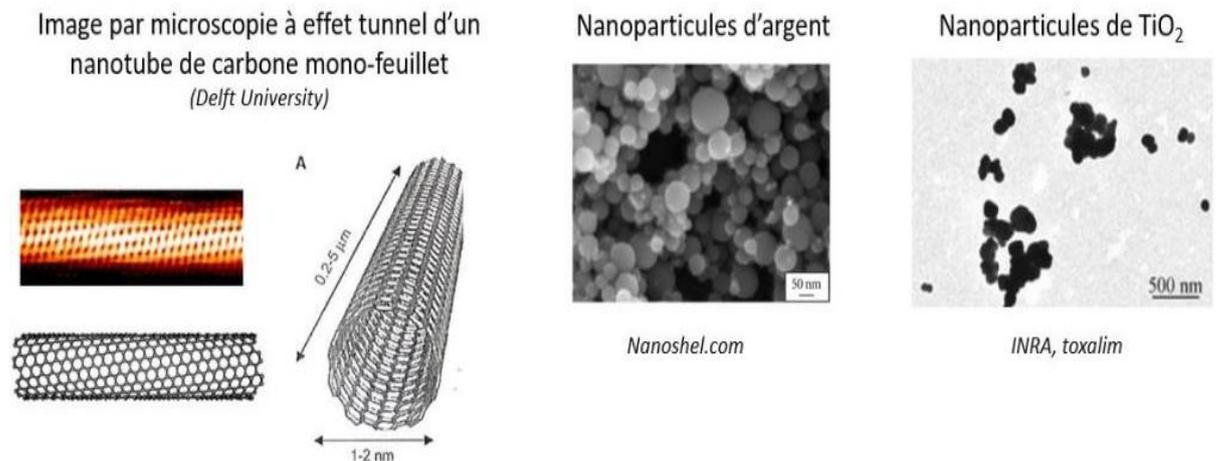


Figure 4 : Exemples des nanomatériaux. [C]

III.Applications des nanotechnologies et des nanomatériaux en fonction des secteurs d'activité

Tableau 01 : Les domaines des applications des nanotechnologies. [D]

SECTEURS D'ACTIVITÉ	EXEMPLES D'APPLICATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES
Automobile, aéronautique et aérospatial	Matériaux renforcés et plus légers ; peintures extérieures avec effets de couleur, plus brillantes, anti-rayures, anti-corrosion et anti-salissures ; capteurs optimisant les performances des moteurs ; détecteurs de glace sur les ailes d'avion ; additifs pour diesel permettant une meilleure combustion ; pneumatiques plus durables et recyclables...
Electronique et communications	Mémoires à haute densité et processeurs miniaturisés ; cellules solaires ; bibliothèques électroniques de poche ; ordinateurs et jeux électroniques ultra-rapides ; technologies sans fil ; écrans plats...
Agroalimentaire	Emballages actifs ; additifs : colorants, anti-agglomérants, émulsifiants...
Chimie et matériaux	Pigments ; charges ; poudres céramiques ; inhibiteurs de corrosion ; catalyseurs multi-fonctionnels ; textiles et revêtements anti-bactériens et ultra-résistants...
Construction	Ciments autonettoyants et anti-pollutions, vitrages autonettoyants et anti-salissures ; peintures ; vernis ; colles ; mastics...
Pharmacie et santé	Médicaments et agents actifs ; surfaces adhésives médicales anti-allergènes ; médicaments sur mesure délivrés uniquement à des organes précis ; surfaces biocompatibles pour implants ; vaccins oraux ; imagerie médicale...
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes ; pâtes à dentifrice abrasives ; maquillage avec une meilleure tenue...
Énergie	Cellules photovoltaïques nouvelle génération ; nouveaux types de batteries ; fenêtres intelligentes ; matériaux isolants plus efficaces ; entreposage d'hydrogène combustible...
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone ; production d'eau ultrapure à partir d'eau de mer ; pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables ; analyseurs chimiques spécifiques...
Défense	Détecteurs d'agents chimiques et biologiques ; systèmes de surveillance miniaturisés ; systèmes de guidage plus précis ; textiles légers et qui se réparent d'eux-mêmes...

IV. Les nanoparticules d'argent

Depuis 1994, les nanomatériaux à base de nanoparticules d'argent se sont développés de façon exponentielle en couvrant un grand nombre de secteurs industriels : matériaux antibactériens [31], matériaux antistatiques, matériaux supraconducteurs cryogéniques [32], matériaux biocapteurs [33], textiles synthétiques [34], circuits imprimés [35], matériaux catalytiques [36,37] ... Ces nanomatériaux présentent en effet de nouvelles propriétés qui diffèrent largement des autres matériaux en raison de la faible taille des charges.

Historiquement, la synthèse de nanoparticules d'argent est réalisée au laboratoire par voie micellaire inverse. [38]

La méthode de réduction de sels métallo-organique a été utilisée par Zheng et Stucky, pour synthétiser des nanoparticules d'or [39]. Le sel d'or précurseur ClAuPPh_3 est réduit par le tert-butylamine borane (TBAB), en présence de dodécane-thiol, à une température de réaction de 100 °C. Tang et al. ont réalisé, selon un mode opératoire équivalent, la synthèse de nanoparticules d'argent [40]. Pour cela, ils utilisent comme précurseurs les sels d'argent $\text{ClAg(PPh}_3)_3$ et $\text{NO}_3\text{Ag(PPh}_3)_3$, l'oleylamine joue à la fois le rôle de réducteur et d'agent stabilisant.

IV.1. L'argent

IV.1.1. Introduction

L'argent est l'un des métaux les plus anciennement connus, son histoire a débuté il y a des milliers d'années. C'est un métal précieux, datant de l'antiquité, de couleur blanc et brillant. L'argent limite la propagation des infections et améliore l'hygiène quotidienne : ceci est connu et utilisé depuis plus de 7000 ans [41]. Les Romains l'ont employé pour soigner les blessures, les brûlures et les ulcères [42]. Par la suite, il a été employé pour prévenir la contamination de l'eau ou pour éviter les infections oculaires chez les nourrissons par application de nitrate d'argent [43]. Ses qualités antimicrobiennes, ont été admises dès l'identification des bactéries comme agents responsables d'infections [44]. De nombreux produits à base d'argent, comme des crèmes composées de sulfadiazine d'argent ou des pansements constitués de feuilles d'argent, ont été utilisés jusqu'à la découverte des antibiotiques. [45]

L'introduction des antibiotiques a réduit l'utilisation de l'argent comme agent antibactérien, mais avec l'avancement de la nanoscience et les nanotechnologies, l'argent métallique est de retour sous forme des nanoparticules d'argent [46].

En raison de leur très petite taille, les nanoparticules d'argent montrent des propriétés physicochimiques, et des activités biologiques très intéressantes. [47]

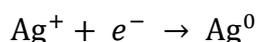
IV.1.2. Propriétés physiques et chimiques de l'Argent

L'argent (Ag) est le deuxième élément du premier groupe secondaire (IB) du tableau périodique, c'est un métal noble plus réactif que l'or. Sa résistance mécanique peut être améliorée par addition de cuivre. Il a une excellente conductivité, propriété utilisée en électronique. L'argent métallique se déforme facilement à froid, par martelage ou par étirement et il se cisèle facilement. Les sels d'argent sont photosensibles et sont utilisés en photographie [48]. **Le Tableau 02** montre les propriétés caractéristiques de l'argent.

Tableau 02 : Propriétés physiques de l'argent. [49]

propriété	Ag
Configuration électronique	[Kr] 4d ¹⁰ 5s ¹
Numéro atomique - poids	47 – 107.87
Structure cristalline	CFC
Densité (g/cm ³)	10.5
Rayon atomique (nm)	0.153
Première énergie d'ionisation (KJ mol ⁻¹)	758
Vitesse de fermi (m/s)	1.39 10 ⁶
Energie de fermi (eV)	5.49
Résistivité électrique (μΩcm)	1.59 (20 °C)
Température de fusion (K)	1235.43
Température d'ébullition (K)	2485
Conductivité thermique (W m ⁻¹ K ⁻¹)	429
Conductivité électrique (S m ⁻¹)	63 10 ⁶
Potentiel standard (V)	0.779 (Ag ⁺ /Ag)
Electronégativité	1.93

L'argent métallique s'obtient par réaction d'oxydo réduction de l'ion argent selon la réaction suivante



Cette réaction de base peut s'effectuer à partir de différents sels, dans différents milieux et selon différentes méthodologies. Le choix de l'agent réducteur est également important. Il peut aussi bien être toxique et présenter des dangers pour l'environnement et la santé.

De nombreuses méthodes ont été utilisées pour synthétiser des nanoparticules d'argent, parmi lesquelles on peut citer la réduction chimique des ions argent en solution aqueuse [50-52] ou organique [53], la réduction électrochimique [54], la réduction sous ultrasons [55], la réduction photoinduite ou photocatalytique [56-58], la réduction sous micro-ondes [59-61], la réduction par irradiation γ [62], la méthode de microémulsion [63] et la réduction biochimique. [64]

IV.2. Les méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent

Classiquement, les méthodes de synthèse sont divisées en deux grandes approches (Figure 5).

- ***L'approche descendante, ou top down :***

Regroupant essentiellement physiques (Le broyage à haute énergie, évaporation-condensation, procédé d'ablation laser...), consiste en la diminution graduelle de la taille des systèmes actuels jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques. [65]

- ***L'approche ascendante, ou bottom up*** (méthodes chimiques)

Les nanoparticules sont préparées en utilisant des atomes, des molécules ou des agrégats comme entités de départ. Cette voie nécessite l'utilisation de trois composants indispensables Un précurseur, un agent réducteur et un agent stabilisant. Le contrôle précis de la taille, de la distribution de taille, de la forme et de la composition des nanoparticules passe par le contrôle et l'ajustement des divers paramètres de réaction. La température, la nature et la concentration des réactifs et des agents stabilisants sont autant de paramètres modulables.

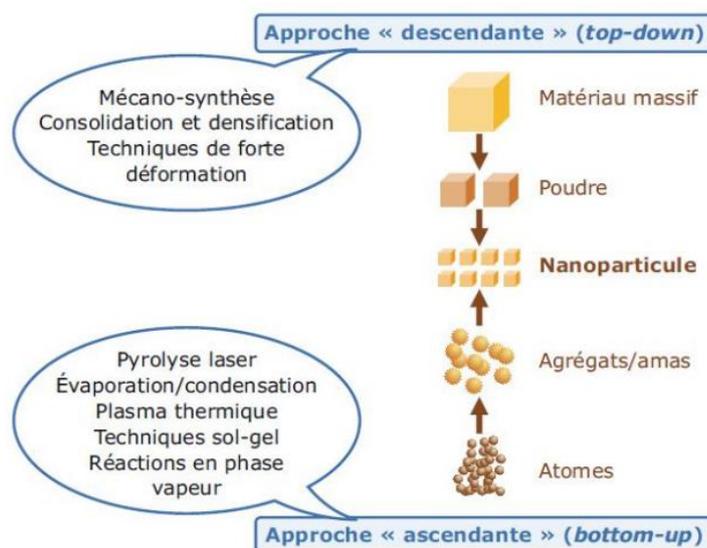


Figure 5 : Représentation schématique des deux grandes approches de synthèse de Nanomatériaux. [66]

L'approche « ascendante » fait appel à des procédés d'élaboration chimiques et physiques alors que l'approche « descendante » induit, principalement, l'utilisation de méthodes mécaniques.

Les procédés actuels permettant la fabrication de nanomatériaux sont classés en trois grandes catégories :

a) procédés par voie physique et mécanique :

Les méthodes mécaniques, telles que : l'homogénéisation et le broyage, la consolidation et la densification, les techniques de forte déformation : torsion, friction, laminage, etc. et physique, telles que : l'évaporation/condensation, l'ablation laser, la décharge électrique, les flammes de combustion, la pyrolyse laser, les micro-ondes, l'irradiation ionique ou électronique, la décomposition catalytique, les dépôts physiques en phase vapeur regroupés sous le terme de PVD (Physical Vapor Deposition), etc.

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. [67]

b) procédés par voie chimique :

Telles que : les réactions en phase vapeur regroupées sous le terme de CVD (Chemical Vapor Deposition), les réactions en milieu liquide : Co-précipitation chimique, hydrolyse, etc., les réactions en milieu solide, les fluides supercritiques avec réaction chimique, les techniques sol-gel : sol-gel à base de silice, alkoxyde de métal, etc.

Les méthodes chimiques de préparation de nanoparticules d'argent incluent la réduction chimique en solution aqueuse [68,69] ou organique [70], la réduction électrochimique [71], la voie micellaire inverse [72], la réduction biochimique [73] ...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 [74] [75]. De plus, parmi toutes les techniques de synthèse, elle offre probablement le meilleur contrôle de taille et de forme [76,77]. Elle repose principalement sur l'utilisation de trois composants, soit : un précurseur métallique, un agent réducteur et un agent stabilisant. [67]

c) procédés par voie biologique :

Les méthodes chimiques permettent la préparation des nanoparticules de taille uniformes et contrôlables ; cependant elles emploient des solvants organiques présentant des risques potentiels pour l'environnement [78]. En outre, la réduction biologique est développée comme une méthode prometteuse en raison de ses avantages particuliers tels que des sources

suffisantes de matériaux, des conditions de réaction modérées, et une bonne dispersion des nanoparticules ainsi que l'absence d'additifs chimiques et des sous-produits chimiques. [79]

Il a donc été nécessaire de recourir aux méthodes biologiques pour développer une approche respectueuse de l'environnement pour la synthèse des nanoparticules d'argent en utilisant des microorganismes [78], des enzymes [80] et des plantes ou des extraits de plantes. [79]

Hamid, Zargar [81] and others 2011 ont démontré la perspective d'employer l'extrait méthanolique des feuilles de plantes pour la synthèse des nanoparticules d'argent par une méthode biologique. Jang, Yang et al. [82] Ont effectué une étude sur l'activité anticancéreuse *in vitro* des nanoparticules argentées synthétisés à partir d'extraits de plantes. Taşkıran, UZUNOĞLU and others [83] Ont réalisé une recherche sur la caractérisation et la détermination des propriétés adsorbantes des nanoparticules d'argent synthétisées avec l'extrait de feuilles d'*Acacia cyanophylla*). Kumar, Kumar et al. [84] Ont opté pour la synthèse verte des nanoparticules d'argent en utilisant l'extrait d'*Antidysenterica holarrhena* et la détermination de leur activité larvicide contre des vecteurs de dengue et de filariose.

IV.3. Synthèse verte des Nanoparticules d'argent

Les nanoparticules métalliques ont été synthétisées par des techniques diverses, principalement basées sur la réduction chimique des ions métalliques dans des solvants aqueux ou organiques.

Pour un meilleur développement de l'environnement, il est primordial d'exploiter les ressources naturelles pour la production de nanoparticules afin de minimiser l'utilisation des réactifs toxiques.

IV.3.1. Réductions biologiques

Les produits chimiques utilisés lors de ces synthèses sont souvent toxiques, couteux et non respectueux de l'environnement.

Depuis quelques années la communauté scientifique étudie plutôt les organismes vivants (bactéries, champignons, plantes, levures...) comme bi-réacteurs pour fabriquer les nanoparticules. En outre, la réduction biologique est développée comme une méthode prometteuse en raison de ses avantages particuliers tels que des sources suffisantes de matériaux, des conditions de réaction modérées, et une bonne dispersion de nanoparticules ainsi que l'absence d'additifs chimiques et de sous-produits chimiques [85].

Tableau 03 : Principaux réducteur et stabilisant biologique des nanoparticules. [86]

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

Ces méthodes biologiques font l'objet de nombreuses publications ne permettant pas une étude exhaustive [87]. Elles concernent aussi bien les métaux (Au, Ag, Cu, Pt, Co ...) que les alliages et les semi-conducteurs. Nous nous cantonnerons dans la suite de ce chapitre à une présentation succincte de l'utilisation des extraits de plantes pour préparer les nanoparticules métalliques ou bimétalliques en solution et notamment l'argent, matériau faisant l'objet de ce travail.

IV.3.2. Le rôle des métabolites des plantes dans liaison et la bioréduction des ions métalliques

Les agents de réduction sont largement distribués dans les systèmes biologiques.

Les nanoparticules d'argent peuvent être préparées par les bactéries, les champignons, les extraits de plantes et les biopolymers. L'eau est le plus souvent le solvant de choix pour extraire les agents réducteurs.

Pour le cas des plantes, il a été démontré utilisant la spectroscopie FTIR que les métabolites tels que les sucres, les terpénoïdes, les polyphénols, les alcaloïdes, acides phénoliques, et les protéines jouent un rôle important dans la réduction des ions métalliques en nanoparticules et en soutenir leur stabilité ultérieure [88- 90].

Des exemples des principaux types de composés présents dans les plantes capables de réduire les ions métalliques sont représentés sur la Figure 06 [91].

Il a été suggéré que le contrôle de la taille et la morphologie des nanostructures peut être connectée à l'interaction de ces biomolécules avec des ions métalliques [91].

Diverses plantes diffèrent par la concentration et composition de ces composants biologiquement actifs. Cela peut expliquer en partie la diversité morphologique des nanoparticules décrites : triangles, hexagones, pentagones, cubes, sphères, ellipsoïdes, nanofils, et nano-rods. La diversité dans la morphologie et la taille de nanoparticules synthétisées à

partir d'une variété de métal des ions dans des extraits de diverses plantes a été décrit en détail dans les revues [92, 93].

Par exemple, des extraits de *PELARGONIUM GRAVEOLENS* (rose géranium) ont été utilisés pour réduire les ions d'or en nanoparticules de forme icosaédrique 20-20 nm et les stabiliser [94], alors que les nano-sphères d'or et nano-triangles 0,05-18 μm de taille ont été synthétisés dans des extraits de *CYMBOPOGON FLEXUOSUS* (citronnelle) [95]. *L'AZADIRACHTA INDICA* (neem, Extrait de LILAS INDIEN) a été utilisé pour réduire tétrachloroauric acide (HAuCl_4) aux triangles et aux hexagones plats d'or avec une taille de 50-100 nm. Dans cette étude, il était également démontré que le jus de *A. INDICA* peut réduire l'argent nitrate à des nanoparticules sphériques poly-dispersées avec une taille de 5-25 nm [96]. L'extrait de feuille d'*ALOE BARBADENSIS* (*ALOEVERA*) a été utilisé pour produire cubique In_2O_3 particules 5-50 nm en taille [97].

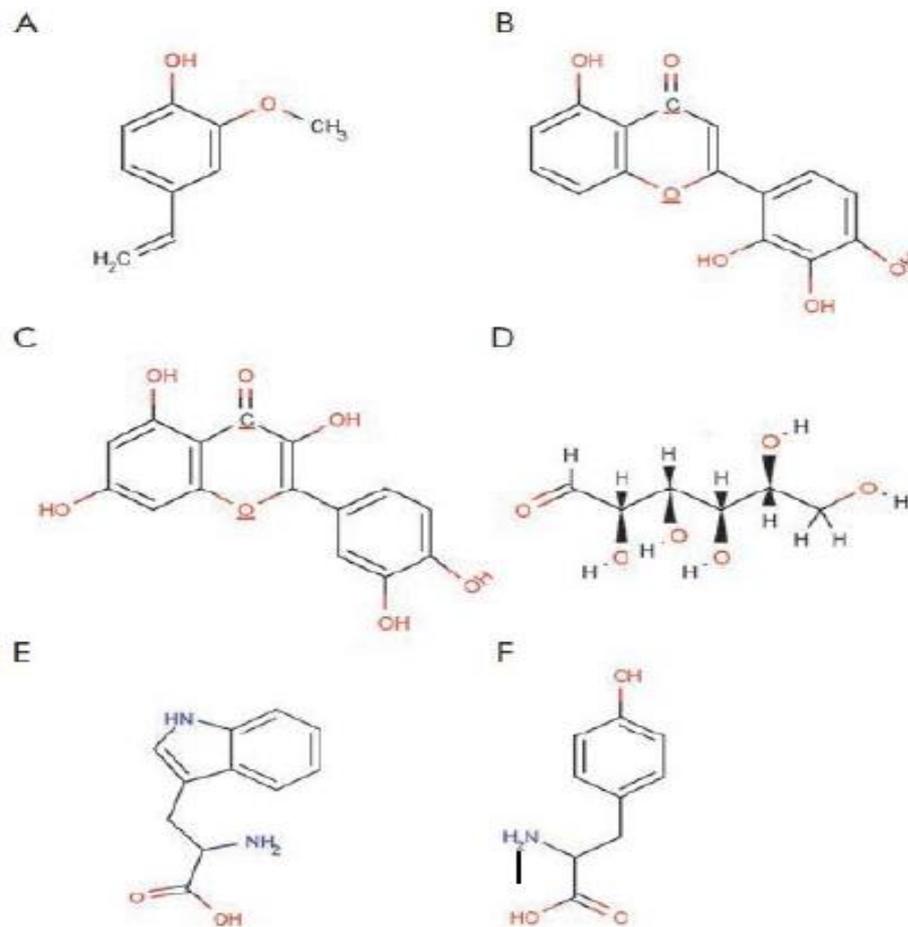


Figure 6 : Les principaux types de bio-réducteurs végétaux impliqués dans la synthèse des nanoparticules métalliques : A - terpénoïdes (eugénol) ; B, C - flavonoïdes (lutéoline, quercétine) ; D - un hexose réducteur à chaîne ouverte ; E, F - acides aminés (tryptophane (E) et tyrosine (F)). [98]

IV.4. Mécanisme de formation de nanoparticules d'argent [99].

Dans l'ensemble, le processus de formation des nanoparticules métalliques dans les plantes et les extraits de plantes comprend trois phases principales et de nombreux paramètres peuvent intervenir dans la formation des nanoparticules : température, concentration et nature des réactifs et du réducteur.

➤ **La nucléation** : est une phase d'activation pendant laquelle se produisent la réduction des ions métalliques et la nucléation des atomes métalliques réduits ;

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.

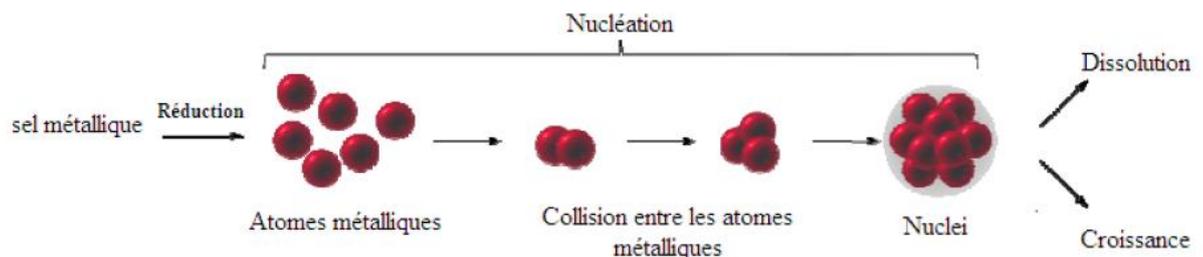


Figure 7 : Illustration de l'étape de nucléation. [100]

➤ **La phase de croissance** :

Durant laquelle les petites nanoparticules adjacentes se fusionnent spontanément en particules de plus grande taille (Les nuclei ayant atteint un rayon critique vont pouvoir croître par consommation des monomères se trouvant en solution.), qui s'accompagne d'une augmentation de la stabilité thermodynamique des nanoparticules. Plus la concentration en atomes est importante plus les particules vont croître rapidement.

➤ **Le murissement** ou bien la phase de terminaison du processus pour obtenir la forme finale des nanoparticules [101, 102].

Au fur et à mesure que la réaction se poursuit, le taux de sursaturation continu 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.

Le procédé de formation des nanoparticules d'argent avec l'extrait de plant peut être expliqué par le schéma suivant [103].

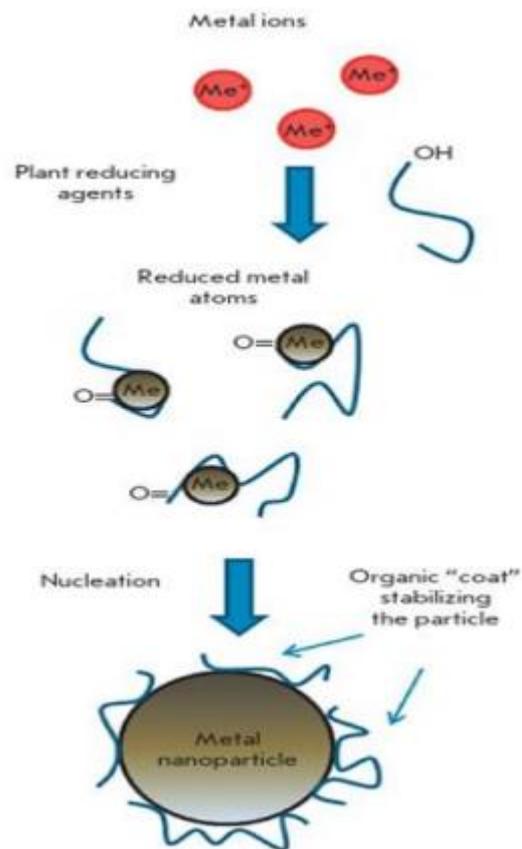


Figure 8 : Une représentation schématique du mécanisme de synthèse des nanoparticules métalliques dans un extrait végétal.

Les ions métalliques se lient aux métabolites réducteurs et aux agents stabilisants et sont réduits en atomes métalliques. Le complexe résultant de l'ion métallique et du métabolite interagit avec des complexes similaires formant une petite nanoparticule métallique. Ensuite, la croissance et la coalescence de petites particules séparées en particules plus grandes se produisent au cours du processus de grossissement. Ce processus se poursuit jusqu'à ce que les particules prennent une forme et une taille stables.

IV.5. Facteurs influent sur la formation de NPS métalliques dans les plantes

Par conséquent, le processus de réduction des ions métalliques avec la formation de nanoparticules est affecté par un grand nombre de facteurs ; En plus de la nature d'un extrait végétal contenant des biomolécules actives dans différentes combinaisons et concentrations (dont les effets sont décrits ci-dessus), ceux-ci comprennent le pH du mélange réactionnel, la température d'incubation, le temps de réaction, la concentration et le potentiel électrochimique d'un ion métallique [104- 107].

IV.5.1. Effet de la température

Le taux de formation de nanoparticules d'argent a également augmenté avec l'augmentation de la température.

IV.5.2. Effet du pH

A été étudié à trois conditions différentes, y compris les formes acides, neutres et basiques. Le résultat montre que la synthèse des nanoparticules complétée à un état neutre et avec une augmentation du pH ne peut pas montrer de bouleversement dans les spectres UV-vis pour les nanoparticules. D'autre part, dans l'état acide, nous ne pouvons observer aucune bande d'absorbance pour les nanoparticules. L'agrégation des nanoparticules pour former de plus grandes nanoparticules a été considérée comme favorisée par la nucléation.

IV.5.3. Effet du temps de contact

Comme nous le savons, le temps est l'un des facteurs les plus importants dans la formation de nanoparticules au cours des techniques de biosynthèse. À mesure que la durée de la réaction augmente, plus de nanoparticules sont formées.

IV.5.4. Effet de la concentration de l'extrait végétal

La concentration de matière végétale et les ions métalliques a joué un rôle critique dans la taille et la dispersion des NPs. [108]

IV.6. Méthodes analytiques de suivi de la réduction des ions Ag^+

La formation des nanoparticules d'argent au cours des réactions de synthèse a été suivie par analyse spectrophotométrique UV-visible après dilution des dispersions quatre fois dans l'acétonitrile. La présence de nanoparticules d'argent métallique se manifeste par un maximum d'absorption dans le domaine de l'UV-visible. Plus précisément, d'après la littérature [109], un maximum d'absorption observé entre 300 et 330 nm caractérise la présence de nanoprisms. Lorsque ce maximum se situe entre 400 et 450 nm, les nanoparticules sont de géométrie sphérique ou proche d'une sphère. Enfin, la présence d'un maximum d'absorption au-delà de 450 nm indique la formation de particules de taille supérieure à 100 nm.

La distribution en taille des nanoparticules sphériques a été déterminée par analyse au Nanosizer (Zetasizer nano ZS, Malvern Instruments, LTD United Kingdom). Pour cette technique, les dispersions aqueuses de nanoparticules d'argent ont été diluées trois fois dans l'eau. Enfin, un dosage potentiométrique par étalonnage des ions Ag^+ restants dans le milieu a permis de déterminer le rendement de la réaction.

IV.7. Les méthodes de caractérisation des nanoparticules formées

Les méthodes suivantes sont utilisées pour caractériser les nanoparticules :

IV.7.1. Diffraction des rayons X (DRX)

Principe

La technique de diffraction des rayons X permet de connaître l'état de cristallisation du dépôt et d'identifier les phases cristallisées présentes dans un échantillon. Elle consiste à observer l'interaction des rayons X avec la matière. Lors du bombardement de la matière par les rayons X, un rayonnement est émis dans toutes les directions avec des ondes de même phase et de même longueur d'onde. Cette diffusion entraîne des interférences entre les ondes cohérentes diffusées par chaque plan atomique formant ainsi une onde diffractée dont les caractéristiques dépendent de la structure cristalline de la matière. L'orientation du faisceau diffracté est donnée par la loi de Bragg : $n\lambda = 2 d_{hkl} \sin \theta_{hkl}$.

Les diffractogrammes enregistrés pour les échantillons sont comparés à ceux des données de référence rassemblées dans les fiches ASTM.

Appareillage

Les diffractogrammes ont été enregistrés sur un diffractomètre Siemens D8 Advance. L'échantillon plan est immobilisé en position horizontale sur un porte échantillon. Les bras de la source et du détecteur se déplacent l'un vers l'autre, en tournant du même angle par rapport à la surface de l'échantillon. Cette configuration est utilisée pour des dépôts épais pour que la pénétration dans le substrat ne soit pas gênante. Elle permet de repérer l'éventuelle orientation préférentielle d'une famille de plans réticulaires parallèlement à la surface du dépôt et d'analyser quantitativement un mélange de phases s'il n'est pas texturé. La source de rayons X est une anticathode de cuivre ($\lambda_{CuK\alpha} = 1,5418 \text{ \AA}$), les diffractogrammes ont été enregistrés entre 10° et 90° en θ . Les diagrammes expérimentaux ont été traités par le logiciel Eva.

IV.7.2. Microscopie électronique à balayage (MEB) couplée à l'analyse chimique (EDX)

Principe de base

La microscopie électronique à balayage permet de balayer une partie de la surface de l'échantillon à l'aide d'un faisceau électronique d'un diamètre de quelques nanomètres. Contrairement à la microscopie optique, cette méthode permet de visualiser des caractéristiques morphologiques avec un agrandissement élevé et une profondeur de champ accrue. En outre, il se crée une interaction entre le faisceau électronique et les enveloppes atomiques des éléments du matériau à analyser. Pendant le balayage, il se crée un

rayonnement par fluorescence X qui peut être enregistré par un système d'analyse dispersive en énergie (EDX) et utilisé à des fins d'analyse.

Appareillage

L'appareil utilisé est une microscopie électronique à balayage de type « COXEM-30 » couplé d'un spectromètre à dispersion d'énergie de rayons X (EDX), les observations sont portées sur la surface des dépôts.

IV.7.3. Spectroscopie UV-visible

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200-400 nm), du visible (400-750 nm) ou du proche infrarouge (750-1400 nm).

Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition(s) électronique(s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide.

Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde. Le spectre est le plus souvent présenté comme une fonction de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Il peut aussi être présenté comme le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde, le spectre est alors indépendant de la longueur concentration du soluté qui absorbe.

Cette technique est complémentaire de la spectroscopie de fluorescence qui mesure l'intensité lumineuse émise par un échantillon quand il est éclairé à une longueur d'onde où il absorbe.

La fluorescence met en jeu des transitions depuis l'état excité jusqu'à l'état fondamental alors que la spectroscopie d'absorption traite des transitions entre état fondamental et état excité.

Appareillage

Le spectrophotomètre utilisé dans cette étude est du type Jasco V-670 en mode transmission et absorption.

IV.7.4. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Les spectroscopies Infrarouge et Raman sont des spectroscopies de vibrations basées sur l'analyse des modes de vibration des molécules : les modes d'élongation et de déformation. Les modes d'élongation symétrique ou antisymétrique font intervenir des variations de longueur de liaison alors que les modes de déformation modifient, à longueurs égales, l'angle entre ces liaisons. Les fréquences de vibration dépendent des atomes mis en jeu et du type de

liaison considérée. Les modes de vibration et leur fréquence associée permettent ainsi l'identification des différentes liaisons chimiques.

Principe

Le rayonnement Infrarouge se situe dans la gamme 4000-400 cm^{-1} ce qui correspond à la même gamme de fréquence que les vibrations des molécules. Ainsi, l'absorption IR a lieu lorsque l'énergie du photon incident correspond à la différence d'énergie entre les deux états de la molécule : c'est l'effet de résonance. La molécule absorbe ainsi le rayonnement de même fréquence que ses fréquences de vibration harmoniques et la lumière non absorbée est transmise au détecteur. D'autre part, seuls les modes de vibration induisant une variation du moment dipolaire de la molécule sont visibles en Infrarouge.

Chaque liaison d'une molécule vibre en permanence a une fréquence ν qui dépend du type de liaison (plus la liaison est forte, plus la fréquence est élevée) et du type d'atome implique dans la liaison (plus les atomes sont lourds, plus la fréquence de vibration est faible).

D'autre part, l'intensité des bandes de vibration augmente avec le nombre de groupes du même type présents dans l'échantillon, la valeur du moment dipolaire du groupement fonctionnel et la variation du moment dipolaire lors de la vibration. Les bandes correspondant aux modes d'élongation se situent dans la région 4000-2000 cm^{-1} alors que les modes de déformation se retrouvent principalement dans la région 2000-1500 cm^{-1} .

Appareillage

Le spectromètre IR utilisé dans cette étude est de type Jasco FT/IR-6300.

IV.8. Applications des nanoparticules de métaux nobles

Les nanoparticules de métaux nobles (l'argent à titre d'exemple) ont des applications potentielles dans divers domaines technologiques, tels que la photonique [110], la microélectronique [111], la photocatalyse [112-114], la lithographie [115], en tant que matériau biocapteur [116] et l'optoélectronique [117].

En raison de leurs propriétés spécifiques, les nanoparticules d'argent (NPs Ag) ont été employées intensivement dans des outils de ménage, l'industrie de soins de santé, et dans le stockage et l'emballage de nourriture, et elles ont aussi des applications biomédicales.

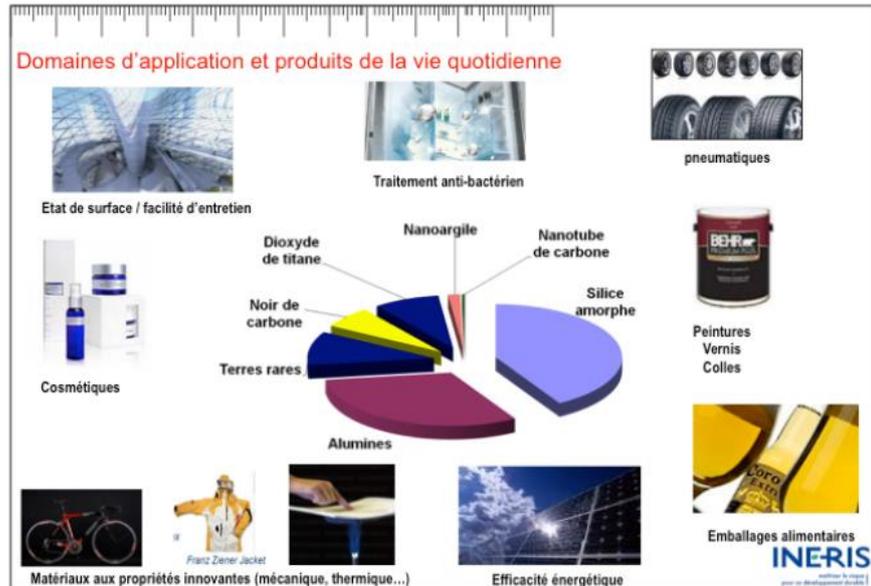


Figure 9 : Utilisation de nanoparticules dans les objets du quotidien. [E]

IV.8.1. Activité antibactérienne

Les nanoparticules de métaux nobles, en particulier celles de l'argent sont largement utilisées en tant qu'agents antibactériens [118]. Le et al. [119,120], Shrivastava et al. [121] ont étudié l'activité antibactérienne de nanoparticules d'argent contre les bactéries d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus*.

Des chercheurs ont essayé d'incorporer des nanoparticules d'argent dans les matériaux d'emballage tels que du papier filtre, du polyéthylène basse densité (LDPE), et le poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA) [122], est employé dans l'industrie alimentaire pour éviter les contaminations microbiennes et prévenir l'apparition d'un gout métallique. (Smith and Zysk 1987). [123]

Les nanoparticules d'argent ont été utilisées dans les stations d'épuration pour le traitement des eaux usées et ont montré une activité antibactérienne intéressante. La dispersion d'argent sur les surfaces de la membrane a amélioré l'activité antimicrobienne contre *E. coli* et *S. aureus*. Les résultats de cette recherche ont confirmé que la membrane Ag-PES peut inhiber presque la croissance bactérienne à 100%. [124]

Elles sont utilisées en tant qu'agents antimicrobiens dans les pansements pour empêcher les infections de blessure, et en tant qu'agents anticancéreux. [125]

Les nanoparticules d'argent sont aussi utilisées comme additif antimicrobien dans les ciments osseux poly (méthacrylate diméthyle) (PMMA). [126]

L'argent imprégnés dans Les dispositifs implantables, et les masques chirurgicaux indiquent une efficacité antimicrobienne importante. [127]

L'argent est doté également d'une activité cytoprotectrice des cellules de l'infection par le VIH-1. [128]

V.Conclusion

Les nanotechnologies sont un domaine très prometteur. De nombreuses applications sont possibles dans de vastes domaines. Celui de la médecine profite largement des bénéfices apportés par les nanoparticules. En effet, qu'il s'agisse du nanotube de carbone ou encore d'une nanoparticule à coeur magnétique les nano-objets ouvrent une nouvelle branche de la recherche : il devient possible de traiter le cancer, d'injecter des particules de taille nanométriques et d'en contrôler la quantité, de localiser certains types de cellules, etc.

Ce chapitre est consacré à une description des différents procédés de synthèse de nanoparticules d'argent rencontrés dans la littérature. Nous nous intéresserons en particulier à la présentation de la méthode de synthèse des NPs d'argent par chimie verte utilisée dans notre travail avec des tailles et des formes bien contrôlées qui restent toujours un défi majeur. Dans ce contexte, nous cherchons à développer de nouvelles stratégies de synthèse simples, reproductibles en utilisant le minimum possible de réactifs chimiques non toxiques, afin de limiter les sous-produits de réactions et/ou ions résiduels qui risqueraient d'inhiber les propriétés intrinsèques du matériau final.

Nous nous intéresserons aussi à l'influence des conditions de réaction sur la nucléation et la morphologie des nanoparticules d'argent.

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

Ce chapitre est consacré à la description des différents matériaux et produits chimiques expérimentaux utilisés, détaillent les méthodes et techniques expérimentales employées tout au long de ce travail.

I. Objectif :

Il y a un besoin essentiel pour développer des procédures respectueuses de l'environnement pour la synthèse de nanoparticules métalliques. L'objectif est d'exploiter les ressources biologiques dans la nature pour la production de nanoparticules à faible coût et non toxique. Une diversité de procédés chimiques et physiques pourrait être utilisée pour la synthèse de nanoparticules, cependant, ces méthodes sont à risque lorsque les produits chimiques toxiques sont utilisés en raison de leurs effets indésirables dans les applications médicales. En conséquence, les extraits de plantes ont été utilisés pour la synthèse de nanoparticules métalliques ; (synthèse de nanoparticules d'argent à l'aide de feuilles de *Cynodon dactylon* [129], la synthèse de nanoparticules d'or en utilisant *Magnolia Kobus* et des extraits de feuilles de *Diopyros kaki* [130], la synthèse de nanoparticules d'argent en utilisant le capitulum algue *Codium* [131]).

L'objectif recherché à travers ce travail est la synthèse des nanoparticules d'argent (Ag NPs) à l'aide de l'extrait des feuilles du citron (*Citrus limon*). Cette méthode de synthèse permet d'obtenir directement des nanoparticules d'argent, bien cristallisées, de taille relativement calibrée. Nous détaillerons le procédé de biosynthèse en milieu aqueux, appelé aussi « réaction verte » par la suite :

- La collecte des feuilles du citron (*Citrus limon*).
- Extraction des extraits des feuilles du citron et suivie par une évaluation de leurs caractéristiques physico-chimiques (les paramètres : les acides gras, les pigments, les composés phénoliques et l'activité biologique).
- La biosynthèse des NPs d'Ag en utilisant l'extrait des feuilles du citron comme agent réducteur.
- Caractérisation des NPs d'Ag synthétisés avec différentes techniques d'analyse (UV, IR et MEB-EDS).
- Et en fin, étudier les propriétés biologiques des NPs d'Ag obtenus.

La partie expérimentale a été réalisée au niveau du laboratoire pédagogique de chimie 2 et au niveau du laboratoire pédagogique microbiologie de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de Ghardaïa (Algérie).

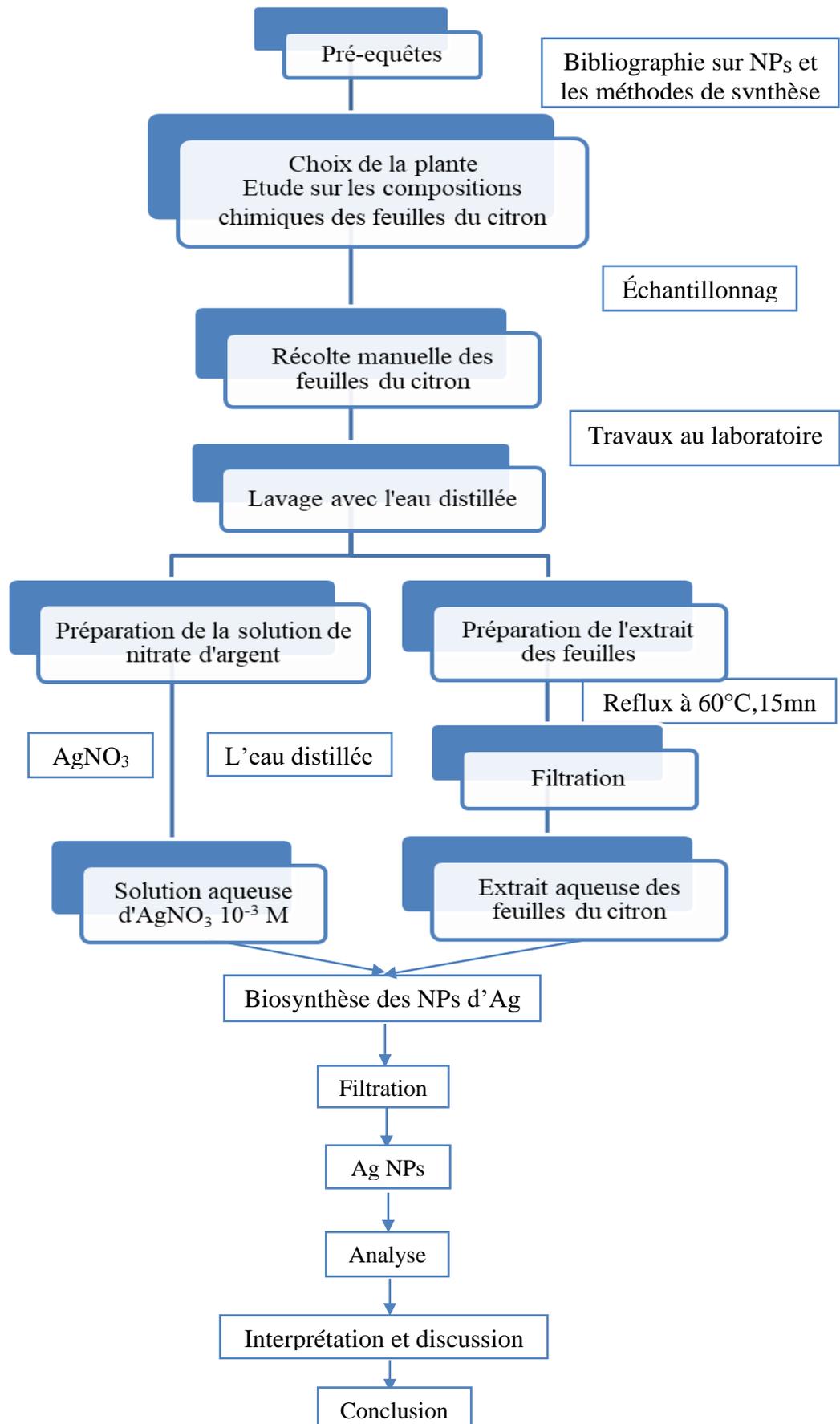


Figure 10 : Organigramme descriptif de la méthodologie de l'extraction et la caractérisation de l'huile essentielle du citron.

II. Matériels et méthodologie

II. 1. Présentation du matériel végétal

Le matériel végétal utilisé dans cette étude c'est les feuilles du citron (*Citrus limon*).

II. 2. Description de la plante (les feuilles du citron - *Citrus limon*-)

Le citron est le fruit du citronnier (*Citrus limon*), c'est un agrume appartenant à la famille des Rutaceae. Ce dernier est un arbuste originaire du sud-est asiatique, cultivé sur le littoral de la Méditerranée et dans toutes les régions du globe à climat semi-tropical [132]. Le citron est un agrume plus vigoureux, son arbre vert et aromatique est caractérisé par une croissance rapide et d'une durée de vie d'environ 40 ans, supporte une température minimale de -2°C, de taille moyenne qui atteindra, en pleine terre entre 3 et 6 m de haut, porte 5-6 branches charpentières très fournies en rameaux, les racines superficielles forment un réseau dans les 80 premiers centimètres de sol, supportent mal la concurrence de plantes voisines et Il peut vivre environ 80 ans. En culture, il est souvent taillé, d'une part pour limiter son encombrement, d'autre part optimiser son branchage. [133]

Les feuilles des citronniers sont des feuilles vertes persistantes et alternatives, vert profond et luisantes, plus pâles sur leur revers. Elles ont une forme en fuseau, de 6 à 11 cm de long et leur pétiole est parfois ailé. Les feuilles sont très odorantes en raison des multiples poches à essence qu'elles contiennent, qui sont visibles à l'œil nu. [133]

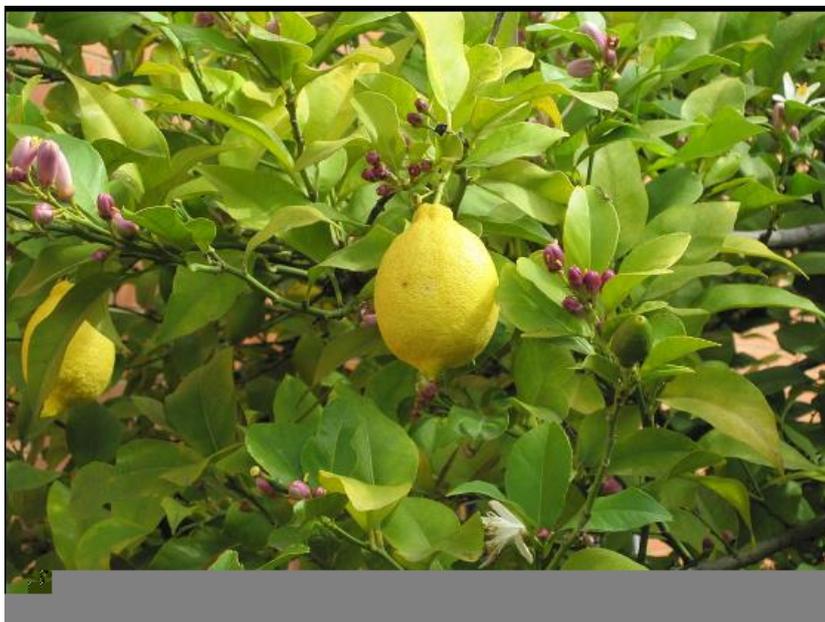


Figure 11 : la morphologie de Citrus et La plante de *Citrus limon*. [F]

Le tableau ci-dessous illustre la classification botanique du citron (*Citrus limon* méthodologie du présent travail est décrite dans l'organigramme suivant (Figure 10) :

Tableau 04 : Classification de *citrus limon*. [134]

Domaine	Règne	Sous règne	Classe	Ordre	Famille	Genre
Biota	Plantae	Viridiaeplantae	Equisetopsida	Sapindales	Rutaceae	Citrus

✓ **Pourquoi les feuilles du citron ?**

Parallèlement à l'huile, les feuilles du citron contiennent les mêmes antioxydants qui appartiennent à différentes familles chimiques :

- Caroténoïdes
- L'acide ascorbique
- Les composés phénoliques

De ce fait, les feuilles du citron sont extrêmement riches en polyphénols.

II. 3. Échantillonnage et collecte

Les échantillons des feuilles du citron (*Citrus limon*) proviennent de la ferme publique privée qui se trouvent au niveau de la Wilaya Ghardaïa.

La collecte des feuilles a été réalisée durant le mois janvier (2020) à la main à hauteur d'Homme, au hasard, sur le même arbre, a pris en considération les feuilles adultes. Avant l'utilisation du fruit, il doit subir un lavage par l'eau pour éliminer les souillures et les tâches noires qui se trouvent à la surface de la feuille.

La carte suivante montre la Localisation du site d'échantillonnage.



Figure 12 : Géographie de la zone de prélèvement des feuilles du citron (google map, 2020).



Figure 13 : photographies des feuilles du citron.

III. Montage et protocole général de synthèse

III. 1. Préparation de l'extrait aqueuse des feuilles du citron (*Citrus limon*)

Le dispositif expérimental utilisé dans cette étude, est représenté sur la figure ci-dessous (Figure 14).

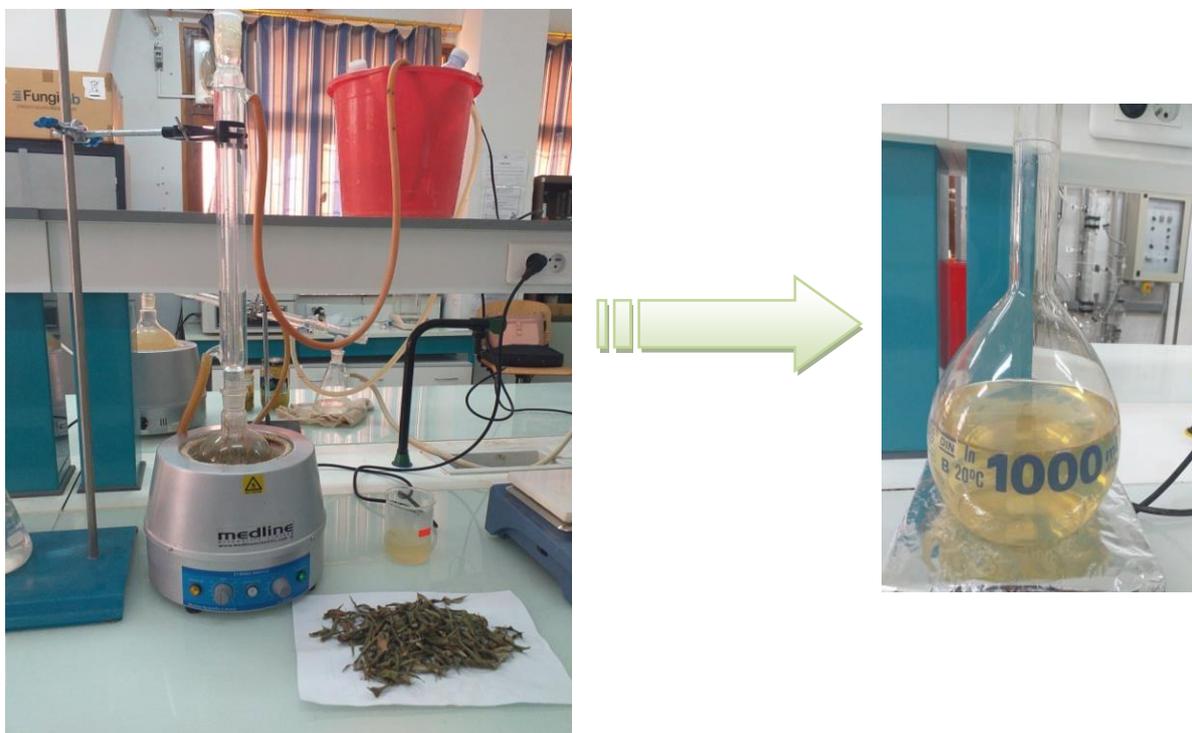


Figure 14 : Extraction aqueuse avec montage à reflux.

Les feuilles du citron ont été la première fois rincées quatre fois avec de l'eau de robinet pour enlever le sable et les débris puis laver par l'eau distillé, et alors séché à l'air à la température ambiante. L'extrait aqueux a été préparé par chauffage à reflux de 15 g de biomasse dans un 150 ml de l'eau distiller à 60 °C pendant 15 minutes, et filtré à l'aide du papier filtre pour enlever toutes les particules. La solution claire jaune pâle a été obtenue et stockée à 4-8 °C.

III. 2. Préparation de l'extrait de la plante poudre

On fait une deuxième préparation de l'extrait de plante avec les mêmes conditions précédentes. Après la filtration, le mélange final a été met dans un cristallisoir et sécher à 50 °C dans une étuve et après gratter avec une spatule pour obtenir une poudre.

III. 3. Biosynthèse des nanoparticules d'argent

D'un autre côté, Une solution aqueuse d'une couleur transparente a été préparée avec d'AgNO₃ agitée avec l'eau distillé à l'aide d'un mélangeur magnétique jusqu'à ce que la totalité du nitrate soit dissoute.

Ensuite, dans le processus de synthèse typique de nanoparticules d'argent, ajouter goutte à goutte 20 ml d'extrait dans les 90 ml de 1 mM de solution de nitrate d'argent. Le mélange réactionnel a été maintenu à 60 °C pendant 15 minutes sous agitation mécanique constante. Le pH reste entre 4,7 et 5,0 pendant la période de réaction. Le changement de couleur de la solution à partir de jaune a marron claire a été noté et la formation de nanoparticules a été contrôlée en utilisant un spectrophotomètre UV-Vis. Les nanoparticules d'argent synthétisées ont été centrifugées à 15 000 tr / min pendant 20 minutes, Le culot a été lavé avec de l'eau distillée plusieurs fois pour éliminer les impuretés et de l'éthanol à 90% pour obtenir de la poudre d'Ag NPs pure.

La synthèse des NPs d'Ag par cette méthode se produit généralement selon trois étapes distinctes :

- La dissolution des sels métalliques dans l'extrait en présence d'une quantité prédéfinie de surfactant.
- Le chauffage jusqu'à la température désirée sous agitation mécanique.
- Le refroidissement lent à température ambiante du mélange réactionnel, pour enfin obtenir une solution colloïdale.

✓ Préparation de l'extrait de la plante :



Chauffage à reflux à une température entre 60 et 70 °C pendant 15 mn.



Après Filtration

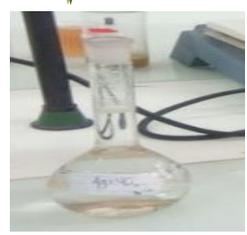


Extrait aqueux des feuilles du citron

✓ Préparation d'une solution de l'AgNO₃ :



Dissoute dans l'eau distillée



1 mM AgNO₃



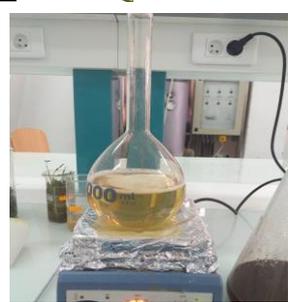
Ag NPs



Centrifugation Et lavage

20 mL d'extrait

90 mL de solution AgNO₃



Changement de couleur après l'addition de l'extrait des feuilles de citron avec la solution d'AgNO₃ de 1 mM indique la formation des nanoparticules d'argent

Figure 15 : Schéma illustrant le protocole de préparation de nanoparticules d'argent par extrait de feuilles du citron.

IV. Analyse et Caractérisation

IV. 1. Analyse des caractéristiques physico-chimiques d'extrait des feuilles du citron

L'étude physicochimique quantitative permet de détecter les différentes familles chimiques présentes dans les feuilles du citron. [135]

IV.1.1. Extraction des composés phénoliques

a) Principe d'extraction

La rupture des tissus végétaux et la diffusion a pour but de libérer les polyphénols de la matrice végétale.

b) Préparation des extraits

3g de la poudre des feuilles du citron sont extraits au moyen de 50 ml de méthanol sous agitation magnétique pendant 12 heures à température ambiante (25 °C) et à l'abri de la lumière puis filtrés avec du papier filtre.

Les filtrats sont mis dans des béchers, ensuite, séchés à l'aide d'une étuve à 40 °C jusqu'à l'obtention d'un poids stable. Les extraits sont pesés après l'évaporation pour estimer le rendement d'extraction comme suit :

$$\text{Où : Taux de la matière extraite (\%)} = ((p_1 - p_0) / E) \times 100$$

P₁ : poids de bécher vide (g).

P₀ : poids de bécher après l'évaporation (g).

E : poids d'échantillon (g).

IV.1.2. Dosage des composés phénoliques

IV.1.2.1. Dosage des poly phénols totaux

La concentration des phénols totaux a été déterminée par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu avec spectrophotométrie UV-visible et a été décrit en 1965 par Singleton et Rossi.

a) Principe

Le réactif de Folin-Ciocalteu est un acide de couleur jaune constitué par un mélange d'acide phosphotungstique (H₃PW₁₂O₄₀) et d'acide phosphomolybdique (H₃PMO₁₂O₄₀). Il est réduit lors de l'oxydation des phénols, en un mélange d'oxydes bleu de tungstène et de molybdène [136]. La coloration produite, dont l'absorption maximum à environ 760-765 nm est proportionnelle aux taux des composés phénoliques oxydés présents dans les extraits végétaux.

b) Mode opératoire

Le dosage des polyphénols totaux est réalisé selon la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu avec quelques modifications [137]. Pour réaliser ce dosage, Une quantité de 100 μl des échantillons (d'huile et des extraits des feuilles d'olivier) sont mélangés avec 500 μl du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (dilué 10 fois) et incubées à température ambiante dans l'obscurité. Après 2 min, 1,5 ml de carbonate de sodium Na_2CO_3 (20%) sont ajoutés. Le mélange final subit une agitation à l'aide d'un vortex.

Un blanc, contenant tous les réactifs, excepté l'échantillon qui est remplacé par le méthanol, est préparé dans les mêmes conditions.

Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, la lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

La détermination de la concentration en polyphénols totaux est effectuée en se basant sur une courbe d'étalonnage $y = ax + b$ (Voire annexe 05 figure 01) réalisée en parallèle par l'acide gallique est utilisé comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 0-2 mg/ml, dans les mêmes conditions et les mêmes étapes du dosage. La teneur des polyphénols totaux a été exprimés en mg d'équivalent d'acide gallique par gramme.

IV.1.2.2. Dosage de la concentration en flavonoïde

Le dosage des flavonoïdes est basé sur la complexation des flavonoïdes par l'aluminium suite à la chélation de métaux (Al^{3+}) utilisés sous forme de trichlorure d'aluminium (AlCl_3), par les groupements OH.

Le chlorure d'Aluminium forme des complexes jaunâtres avec les atomes d'oxygène présents sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes comme la montre la figure ci- dessous. [138]

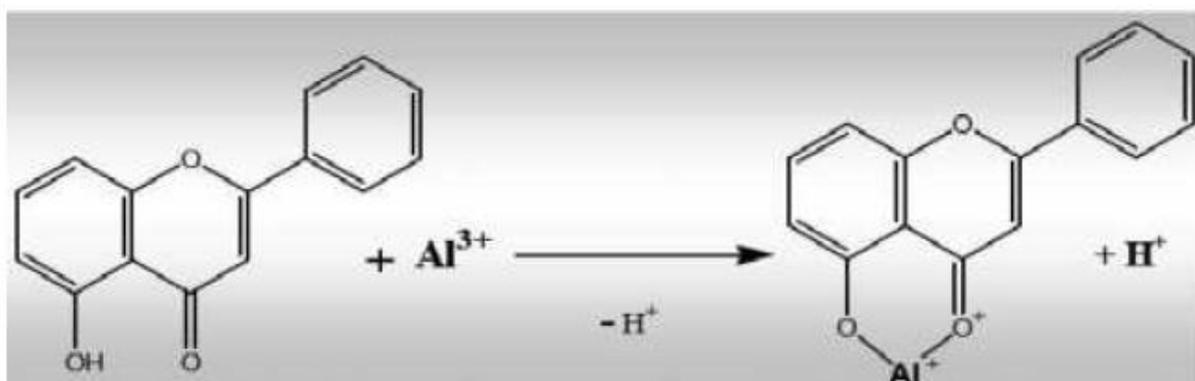


Figure 16 : Mécanisme de réaction de chlorure d'aluminium avec les flavonoïdes.

2 ml de jus ou des extraits méthanoliques sont mélangés avec 2 ml de solution de chlorure d'aluminium ($\text{AlCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}$) (2%). Puis homogénéiser et laisser au repos pendant 15

minutes à température ambiante à l'obscurité. Le blanc est préparé dans les mêmes conditions. Après 2 heures d'incubation à l'obscurité, la lecture est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 760 nm.

La quantité de flavonoïdes contenue dans notre échantillon est calculée en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec la quercitrine (1mg/ml). La quercitrine est utilisée comme standard pour préparer une gamme étalon dans la marge de concentration 0 - 250 mg L⁻¹. (Voire annexe 05 figure 02)

IV.2. Caractérisation des nanoparticules préparées

Compte tenu du caractère nanométrique et cristallin des Ag NPs synthétisés via la méthode « chimie verte dans cette étude, l'utilisation de nombreuses méthodes expérimentales a été nécessaire.

✓ Les Ag NPs biosynthétisés ont été caractérisés par spectroscopie par la bande de résonance plasmonique de surface en utilisant une spectroscopie UV-Visible.

✓ Les analyses par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre IR à transformée de Fourier de marque Bruker en mode de réflexion totale atténuée (ATR en anglais) dans l'intervalle 400 - 4000 cm⁻¹. Cette technique a été utilisée afin d'identifier les groupements fonctionnels présentes dans un échantillon ainsi que les liaisons développées après la formation des nanoparticules d'argent.

✓ L'analyse morphologique et la composition des nanoparticules ont été mises en évidence par microscopie électronique à balayage de type « COXEM-30 » couplé d'un spectromètre à dispersion d'énergie de rayons X (EDX) fonctionnant à une tension d'accélération de 25 Kv avec un grossissement de 30 000 X et une grande distance (WD) de 14,900. Les nanoparticules d'argent ont été obtenues par centrifugation et séchées pour être placées à l'intérieur de grilles de carbone pour observer la microstructure de la surface et EDX montrant la composition et le pourcentage des nanoparticules d'argent.

IV.3. Evaluation des activités biologiques

IV.3.1. Evaluation de l'activité antioxydant avec la méthode antiradicalaire contre le radical DPPH

L'activité antiradicalaire de DPPH[•] a été déterminée en se basant sur les essais décrits par Brand-Williams et *al.* [139] avec quelques modifications. Ainsi, dans un volume de 1 ml, on prépare différentes concentrations de l'extrait à tester dans le méthanol, on ajoute, ensuite 2 ml de la solution de DPPH[•] de concentration 0,1 mM. Après agitation vigoureuse, le mélange est incubé pendant 1 heure à l'obscurité et à température ambiante, puis l'absorbance

est mesurée à 515 nm par un spectrophotomètre UV-vis (JASCO-V530). Une solution contenant 1 ml méthanol et 2 ml de DPPH[•] considérée comme blanc analytique est préparée en parallèle.

L'estimation de l'activité antiradicalaire est exprimée par la valeur du pourcentage d'inhibition (%I) calculé à l'aide de la formule suivante :

$$\%I = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$$

Avec Abs₀ : absorbance du blanc analytique.

Abs₁ : absorbance de la solution en présence d'extrait.

La courbe donnant la variation du (%I) en fonction des différentes concentrations de l'extrait, permet de déterminer l'activité antiradicalaire ou EC₅₀ (Efficient Concentration 50%), définie comme étant la quantité d'extrait nécessaire pour diminuer de moitié la concentration initiale de DPPH. À titre d'indication, un standard : l'acide ascorbique connus pour leur effet anti-radicalaire contre le DPPH ont été testés en parallèle.

V. Evaluation de l'activité antimicrobienne et antifongique

Tous les produits chimiques synthétisés sont testés sur différentes bactéries afin d'évaluer L'activité antibactérienne.

V.1. Les souches bactériennes pathogènes

Les souches choisies pour tester l'activité antimicrobienne de nos produits, ont été fournies par l'American Type Culture Collection (ATCC), et ont été obtenues de laboratoire de microbiologie du Centre Universitaire d'Ain Témouchent et Le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

Les germes qui ont été choisies sont les suivants :

- Des Bactéries à gram positif :
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Des Bactéries à gram négatif :
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
 - ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Une levure :
 - ✓ *Candida albicans* ATCC 10231.

Tableau 05 : Généralités sur les souches bactériennes utilisées.

Les Souches Testées	Caractères bactériologiques	Habitats	Pouvoir pathogène
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	Bactérie Gram -	-Le tube digestif	-Septicémie méningite du nourrisson, de plaies opératoires et gastro-entérites. -Douleurs abdominales et des diarrhées sanglantes.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853.	Bactérie Gram -	-Eau et sols humides -Surface des Végétaux	-Infections nosocomiales (personnes fragilisées ou immunodéprimées) -Infections urinaires, oculaires et pulmonaires
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	Bactérie Gram +	- Les fosses nasales - La gorge - Le tube digestif	-Infection hospitalière. -Responsable des abcès, des plaies, des septicémies, de pneumonie et de l'intoxication alimentaire. -Infections mortelles chez l'homme.
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Levure		

a) Milieu de culture (voire l'annexe 04)

- Milieu de culture liquide
 - ✓ Bouillon Muller-Hinton (BMH)
 - ✓ Bouillon Sabouraud (BS) (Sigma- Aldrich)
- Milieu de culture solide
 - ✓ Gélose Mueller Hinton (MH) (Sigma- Aldrich)
 - ✓ Gélose dextrose de pomme de terre (PDA)

V.2. Méthodes de détermination de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne et antifongique de nos produits synthétisés, a été évaluée in vitro, sur différentes souches bactériennes et fongiques, par la méthode de diffusion en milieu solide tel que décrite par Iqbal et al. [140] avec quelque modification. Cette activité est déterminée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne qui apparaît autour du puits contenant un produit actif.

a. Préparation de l'inoculum

b. Conservation des souches étudiées

Les souches référentielles sont conservées à 4 °C dans des tubes stériles contenant 10 ml Mueller Hinton (MH) inclinée pour les bactéries et Gélose sabouraud pour la souche fongique (levure).

c. Ensemencement des souches conservées

a) Pour les bactéries :

Dans un endroit stérile et à partir des souches bactériennes conservées, Les souches sont revivifiées dans du bouillon nutritif (MH) à 37 °C pendant 24 h. Après, un ensemencement a été faite sur des boites pétri contenant de la gélose de M-H puis remettre en incubation à 37 °C pendant 24 h pour vérifié leur pureté.

b) Pour la levure :

La levure sont revivifiées dans du bouillon nutritif Sabouraud à 30 °C pendant 48 h, puis cultivée sur boite contenant de la gélose PDA pendant 24 à 48 h pour vérifier leur pureté.

d. Préparation des suspensions microbiennes

a) Préparation des suspensions bactériennes

Une ansée de colonies bien isolées (deux à trois colonies) est mise dans un tube stérile à vis contenant 10 mL de Bouillon Muller-Hinton puis laissé incuber à 37 °C pendant 18 h, pour favoriser leur croissance bactérienne.

b) Préparation des suspensions fongiques

La levure a été cultivée dans le Bouillon Sabouraud à 30 °C pendant 24 à 48 h, pour favoriser leur croissance.

c) Ajustements de la charge microbienne

Après l'incubation des suspensions, un certain volume de cette culture est dilué dans le Bouillon sélectif, La suspension bactérienne est bien homogénéisée, et la densité optique (DO) pour chaque souche est ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre (JENWAY 6715 UV/Vis. Spectrophotomètre) dans une longueur d'onde de 625 nm avec un intervalle compris entre [0.08 - 0.10] l'équivalent de 10^8 UFC/ml pour les bactéries [141], et dans une longueur d'onde de 530 nm avec un intervalle compris entre [0.12 - 0.15] l'équivalent de 1 à 5×10^6 UFC/ml pour *Candida albicans*. Pfaller et al. [142]

e. Test d'activité antibactérienne par diffusion en milieu solide (Antibiogramme par la méthode des puits)

Pour chaque espèce bactérienne ont été préparées deux boîtes de pétri. L'une contenant les antibiotiques de référence, sous forme de disques de papier, et l'autre boîte de pétri contient nos produits.

L'activité antibactérienne de nos échantillons a été étudiée pour chaque souche Selon la technique d'inondation. À partir d'une culture de 18 à 20 h (10^5 - 10^6 UFC/mL), Chaque boîte de Pétri est écouvillonnée (sous forme de stries serrées) par la souche bactérienne donnée en surface du milieu Mueller Hinton pour les bactéries et Gélose SB pour la levure préalablement coulé dans des boîtes de Pétri. Après 15 mn, à température ambiante, temps durant lequel les bactéries se fixent à la surface du milieu de culture, des puits ont été découpés à l'aide de pipettes Pasteur (l'extrémité épaisse de 6 mm). Le fond des puits est obturé par une goutte de gélose Mueller Hinton pour limiter la diffusion de notre produit sous la gélose. Ensuite 20 μ l d'échantillon d'étude est distribuée dans chaque puits. Après de pré-diffusion des échantillons d'étude à température ambiante (20 mn), les boîtes sont incubées dans l'étuves pendant 24 h à la température de 37 °C pour les bactéries et 30 °C pour la levure, après ce temps les auréoles d'inhibition sont mesurées en mm à l'aide d'une règle.

Chapitre III :

Résultats et Discussion

Ce chapitre présente les méthodes expérimentales utilisées dans le cadre de cette étude. Le but de ce chapitre est de présenter la méthode de synthèse des NPs d'argent par chimie verte. La voie verte des nanoparticules métalliques (NPs) a attiré une attention considérable ces dernières années car ces protocoles sont simples, peu coûteux et plus respectueux de l'environnement que les méthodes de synthèse standard.

I. L'analyse des composés phénoliques de l'extrait des feuilles du citron

Les composés phénoliques jouent un rôle très important pour la stabilité oxydative et l'activité antioxydant. Ils sont actuellement l'objet de nombreuses études à cause de leur action bénéfique sur la santé [143]

Les résultats du dosage colorimétrique des composés phénoliques réalisés sur l'extrait aqueux des feuilles du citron limon sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 06 : Les composés phénoliques d'extrait de citron limon.

	composés phénoliques		
	Rendement de l'extraction (en %)	Polyphénols totaux (mg éq AG/100g MS)	Flavonoïdes (mg éq Q/100g MS)
L'extrait des feuilles du citron	46.43	3035,22	782,12

Toutes les valeurs sont exprimées par la moyenne de trois essais (n=3)

a. Rendement de l'extraction méthanoïque

La méthode d'extraction par macération en utilisant le méthanol pur (99%) comme solvant d'extraction, et l'extraction hydro-méthanoïque des polyphénols à partir des feuilles du citron a permis d'obtenir des extraits riches aux différents composants Biochimiques.

La teneur en composants des extraits est reportée en pourcentage de la matière sèche et présentée dans le tableau 06.

Le taux d'extraction est noté pour les feuilles (46.43%). L'extraction des composés phénoliques à partir de la matière végétale est influencée par leur nature chimique, la variété, la méthode d'extraction et les dimensions des particules de l'échantillon.

b. Polyphénols totaux

Les polyphénols sont des composés ubiquistes, ils attirent l'attention depuis quelques années à cause de leurs propriétés antioxydantes, en effet, ils sont capables de piéger des radicaux libres, d'inhiber la peroxydation lipidique en réduisant les radicaux hydroxyles, superoxydes et peroxydes. Ils sont aussi capables de piéger les ions métalliques, car ils ont des propriétés chélatrices.

Les résultats du dosage spectrophotométriques des polyphénols totaux obtenus pour les extraits méthanoliques de des feuilles du citron est rapportée en mg équivalent d'acide gallique par g du poids sec (mg éq AG/100g MS) Des mesures de densité optique pour chaque extrait se sont réalisées à 350 nm (Annexe 05 figure 01), sont présentés dans le tableau 06.

Le dosage des composés phénoliques des poudres issues du séchage conventionnel à l'étuve Ventilée montre que la teneur en polyphénols totaux pour les feuilles est de (3035,22 mg éq AG/100g MS) donc l'extrait des feuilles du citron limon contient une quantité appréciable de composés phénoliques.

c. La teneur des flavonoïdes

La quantification des flavonoïdes a été faite par rapport à une courbe d'étalonnage linéaire de quercetine ($y = ax$) réalisée par un étalon qui est la quercetine à différentes concentrations. Des mesures de densité optique pour chaque extrait se sont réalisées à 430 nm (Annexe 05 figure 02). La quantité en flavonoïdes totaux est exprimée en microgramme (mg) équivalent quercetine par 100 g MS.

Les teneurs en flavonoïdes obtenues à partir des extraits des feuilles est 782,12 mg EAG/100g MS.

Et d'après les recherches, les feuilles du citrus limon est contenu aussi d'autre composés phytochimiques, tels que les terpénoïdes, acide ascorbique et ils sont très riche en caroténoïdes.

II. La Biosynthèse des nanoparticules d'argent à base de l'extrait des feuilles du citron

La biosynthèse et la synthèse "verte" sont d'autres domaines remarquables de la chimie pour la préparation des NPs d'Argent en solution. Dans ces synthèses, la biomolécule agit directement à la fois en tant que stabilisant et agent réducteur. En raison de l'abondance des groupements carboxyles, carbonyles, hydroxyles et phénols dans d'extraits aqueux des feuilles du citron, ces derniers peuvent réduire le cation Ag^+ et stabiliser les NPs d'argent ainsi formées via ces groupements. Donc, en utilisant une solution aqueuse d'extrait des feuilles du citronne tant que bioréducteur.

Les NPs d'argent préparés sont caractérisés en utilisant :

II.1. Spectrophotomètre UV-visible

La formation des nanoparticules d'argent peut être contrôlée à la fois par un changement visible de couleur et quantitativement par mesure des spectres UV-Vis. C'est la méthode incontournable et la plus simple. Les spectres d'absorbance d'échantillons contenant des nanoparticules d'argent sont systématiquement observés dans les études. La position, la

forme de la bande plasmonique ainsi que sa largeur à mi-hauteur (FWHM) dépendent fortement de la taille et de la forme des nanoparticules.

Il s'agit tout simplement à rajouter des extraits naturels dans une solution aqueuse d'un sel d'Argent (AgNO_3) et attendre jusqu'à la variation de la couleur de la solution indiquant la formation des NPs d'Ag.

La formation d'Ag NPs est détectée par l'observation du changement de couleur de la réaction moyen de jaune pâle d'extrait à la couleur brun rougeâtre dans les 24 heures. Le changement de couleur de la solution est dû à excitation des vibrations de Plasmon de surface des Ag NPs. La Figure 17 montre le spectre d'absorption UV-Vis de nanoparticules d'argent produites Ag NPs allant de 400 à 700 nm et on remarque un pic symétrique exceptionnel autour de 430 nm. C'est à la suite de la résonance plasmonique de surface des Ag NPs. Le même phénomène a été signalé par d'autre chercheur. [144-146]

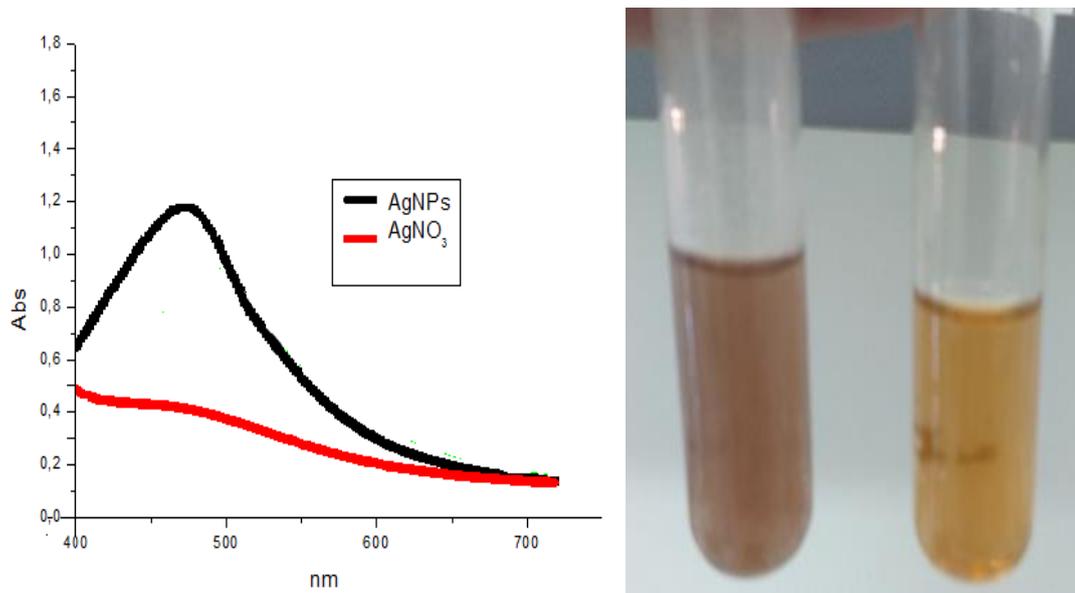


Figure 17 : Le spectre d'absorption UV-Vis de nanoparticules d'argent produites.

II.2. Caractérisation par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

Pour pouvoir étudier les interactions possibles entre la surface des nanoparticules d'argent et les composés de l'extrait des feuilles du citron, des spectres FTIR de l'extrait et des nanoparticules d'Ag ont été enregistrés dans un intervalle de nombre d'onde entre 4000 et 450 cm^{-1} (Figure 18). En comparant à la fois les deux spectres FTIR, on a constaté que de nombreux pics obtenus dans le cas du spectre de l'extrait ont été répétés dans le spectre FTIR en présence de nanoparticules d'argent avec des changements dans la position ainsi que dans l'intensité des bandes de transmission et la disparition ou l'apparition de quelques autres.

La comparaison entre les deux spectres IR d'extrait des feuilles du citron avant et après l'addition de nitrate d'argent montre un changement dans les principales bandes caractéristiques d'extrait des feuilles de citron. Nous remarquons que :

- ✓ La disparition d'une bande à 1100 cm^{-1} correspond à une vibration d'élongation de la liaison C-O de polyols telles que les flavonoïdes, triterpénoïdes et polysaccharides et qui démontre la présence de composés phénoliques dans l'extrait de plante ainsi que la bande de vibration située vers 1300 cm^{-1} attribuée aux C-H du cycle aromatique et la bande intense située vers 1509 cm^{-1} attribuée à l'amide secondaire (N-H) et l'apparition d'une bande intense située vers 1185 cm^{-1} qui confirme que les composés phénoliques sont considérés comme des agents réducteurs dans ce cas.
- ✓ Une diminution de l'intensité de la bande large située à 3369 cm^{-1} caractéristique des OH qui représentent les groupements OH libres dans la molécule et formant un groupe OH liaisons hydrogène.
- ✓ L'apparition de deux pics est observée à 520 et 460 cm^{-1} attribués à la liaison Ag-O de l'oxyde d'argent.

L'analyse spectroscopique IR a permis de confirmer la formation des nanoparticules d'argent et après la réduction des ions Ag^+ et ces résultats sont similaires à ceux observés par Padma [147]

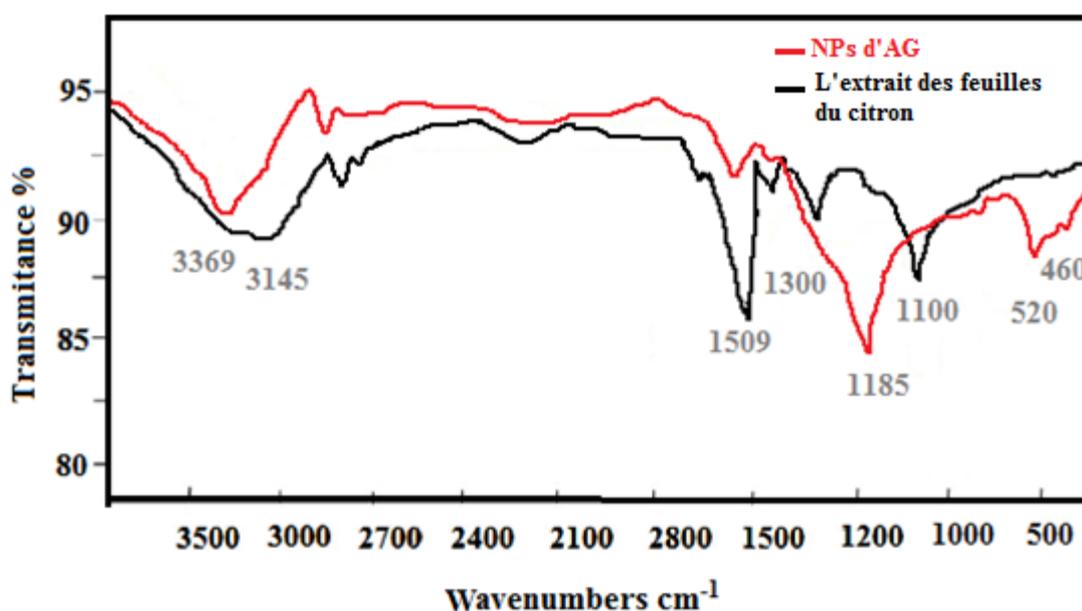


Figure 18 : Spectre FTIR d'extrait des feuilles du citron et NPs d'Ag.

II.3. Caractérisation par spectroscopie électronique à balayage MEB et EDX

Dans le cadre de notre étude, l'analyse par spectroscopie électronique à balayage MEB a principalement été réalisée pour connaître deux types d'informations : la taille et la morphologie des particules synthétisées.

L'image MEB des Ag NPs synthétisées par extrait aqueux des feuilles de citron limon est représentée dans la figure 19. On observe d'assemblage des petites nanoparticules sphériques de taille inférieure à 100 nm. Le même comportement a été signalé par d'autres chercheurs. [148-149]

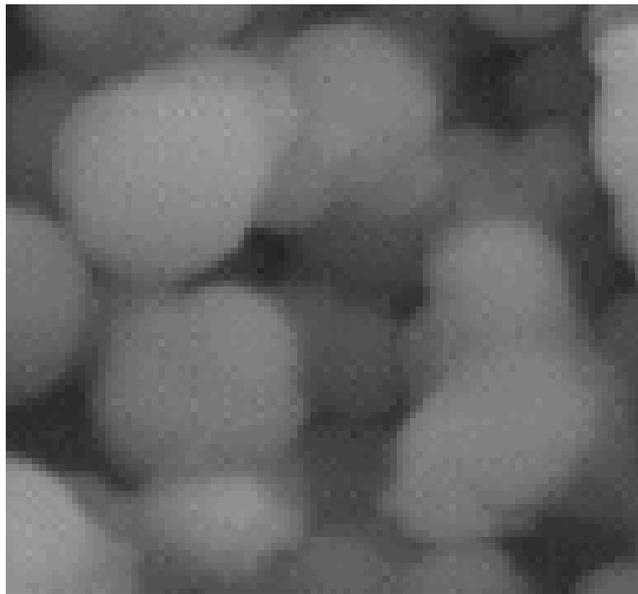


Figure 19 : image MEB des nanoparticules synthétisées.

Pour connaître la composition atomique des nanoparticules, une analyse par MEB-EDX a été réalisée, la figure 20 représente les résultats d'analyse EDX des Ag NPs synthétisée montre un pourcentage très important de l'argent qui confère la formation des NPs d'Ag.

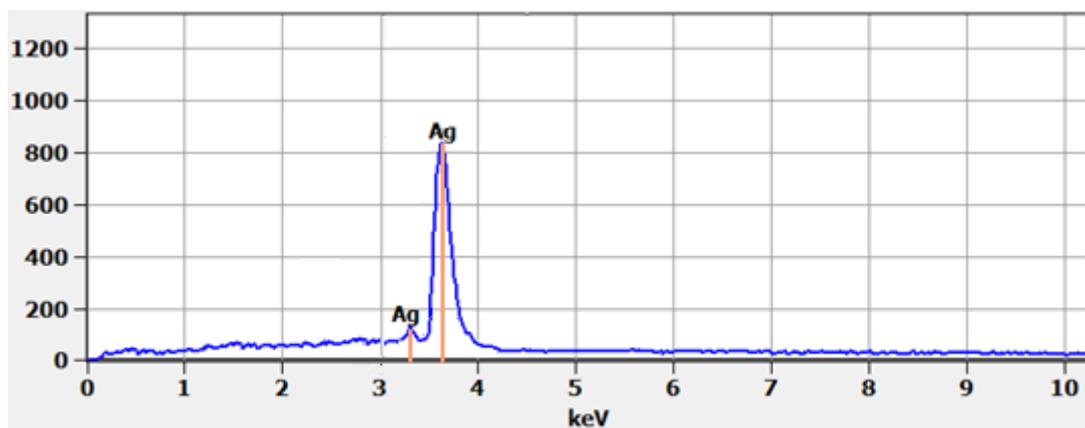


Figure 20 : Spectre EDX des Ag NPs synthétisées.

II.4. Mécanisme de formation des nanoparticules d'argent

Le mécanisme de formation des nanoparticules est tiré de la littérature en tenant compte du fait que l'extrait de la plante est très riche en polyphénols. La présence de Ag^+ provoque l'oxydation des groupement hydroxyles pour former un complexe d'argent intermédiaire puis une quinone et des ions Ag^+ , ces derniers sont réduits en Ag métallique en présence d'électrons libres.

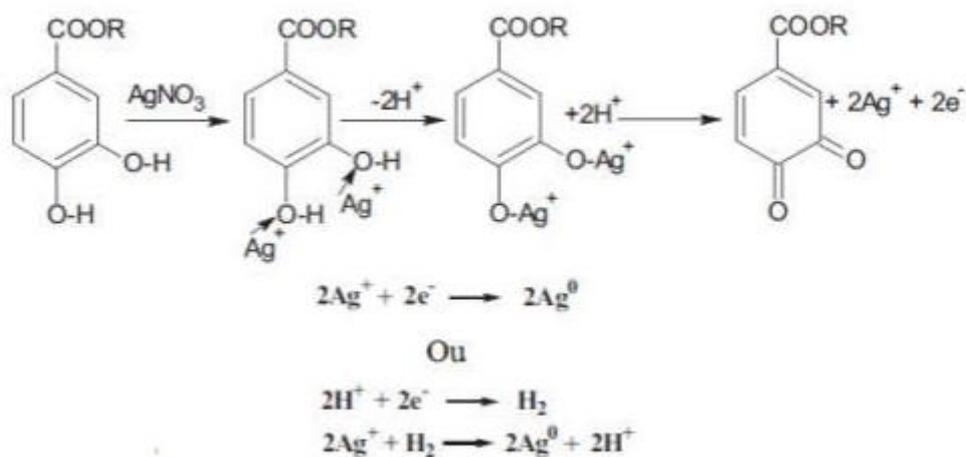


Figure 21 : Mécanisme de la réaction des d'Ag NPs.

La stabilité colloïdale des nanoparticules est assurée par l'interaction entre les hydrogènes du groupement phénolique de l'extrait aqueux et les nanoparticules d'argent chargées négativement.

II.5. Les résultats des activités biologiques

II.5.1. L'évaluation de l'activité antioxydant avec Piégeage des radicaux DPPH°

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer toute l'activité antioxydant des fruits ou d'autres tissus de plante car il y a différents antioxydants et radicaux libres.

L'activité antioxydant des extraits aqueux des feuilles du citron et les NPs d'Ag a été déterminée par l'Activité antiradicalaire DPPH et l'acide ascorbique est utilisé comme standard pour préparer la gamme d'étalonnage.

Ce radical est stable et la capacité des antioxydants à donner un atome d'hydrogène est suivie par la réduction de coloration du radical, a été suivie avec spectrophotomètre UV-visible à 517 nm. L'acide ascorbique est utilisé comme standard pour préparer la gamme d'étalonnage.

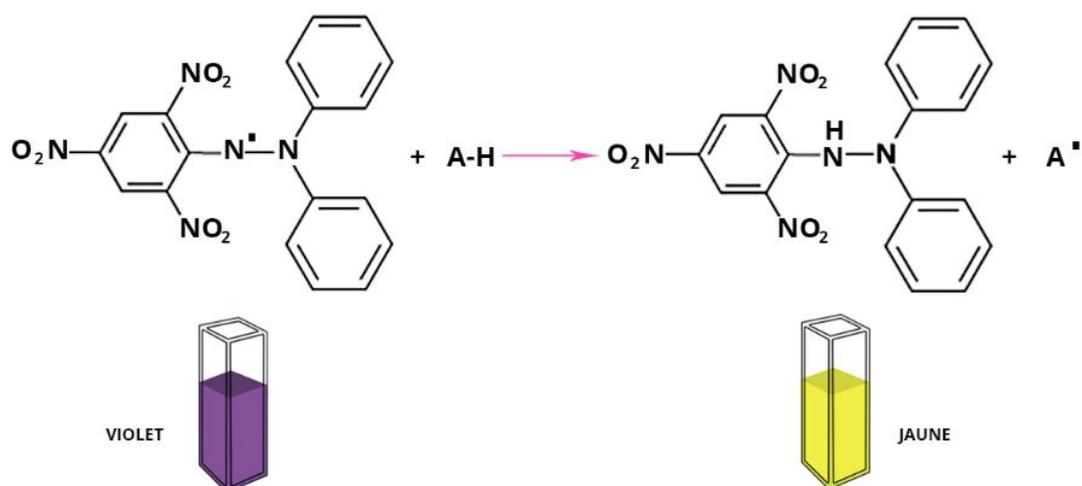


Figure 22 : mécanisme de réduction de radical DPPH (Décoloration de la solution du DPPH du violet en jaune).

Ensuite, nous avons déterminé les CE_{50} des échantillons étudiés à partir des équations des régressions linéaires des graphes représentés dans l'annexe 05 figure 03 CE_{50} est la concentration nécessaire pour réduire 50 % du radical DPPH. Les valeurs inférieures de CE_{50} indiquent l'efficacité de l'échantillon et ainsi un pouvoir antioxydant plus fort. En générale, Les extraits les plus riches en composés phénoliques manifestent les activités les plus importantes contre le radical DPPH.

Les résultats des concentrations efficaces des échantillons testés qui causent la réduction de 50% du DPPH° sont résumés dans le tableau 07 et les figures 23 et 24.

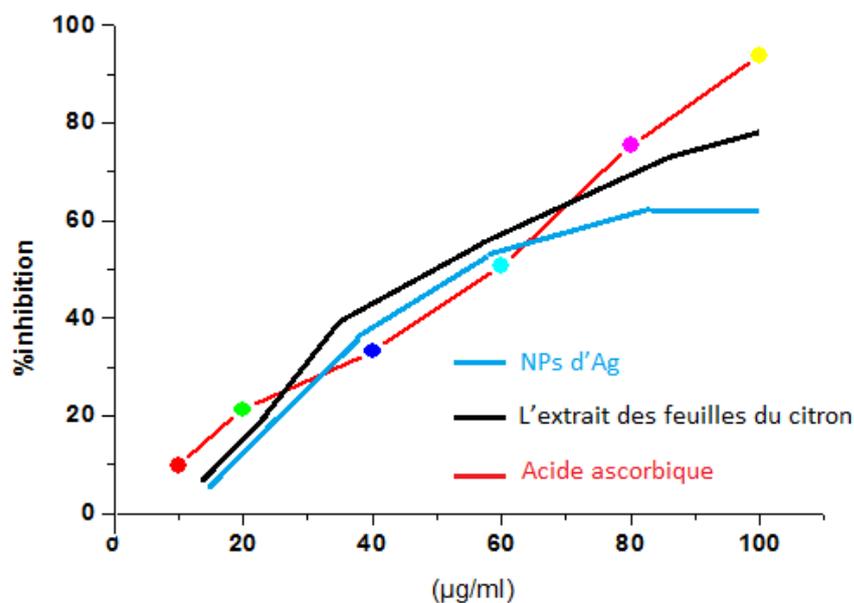


Figure 23 : l'évaluation de la réduction du radical libre DPPH en fonction des concentrations de l'acide ascorbique, L'extrait des feuilles du citron et NPs d'Ag.

Tableau 07 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH et les valeurs de CE₅₀ des échantillons testés.

	L'extrait des feuilles du citron	NPs d'Ag	Acide ascorbique
Pourcentage d'inhibition du radical DPPH (en%)	54.20	53.86	58,5
CE ₅₀ (µg/ml)	6.24	6.26	4.25

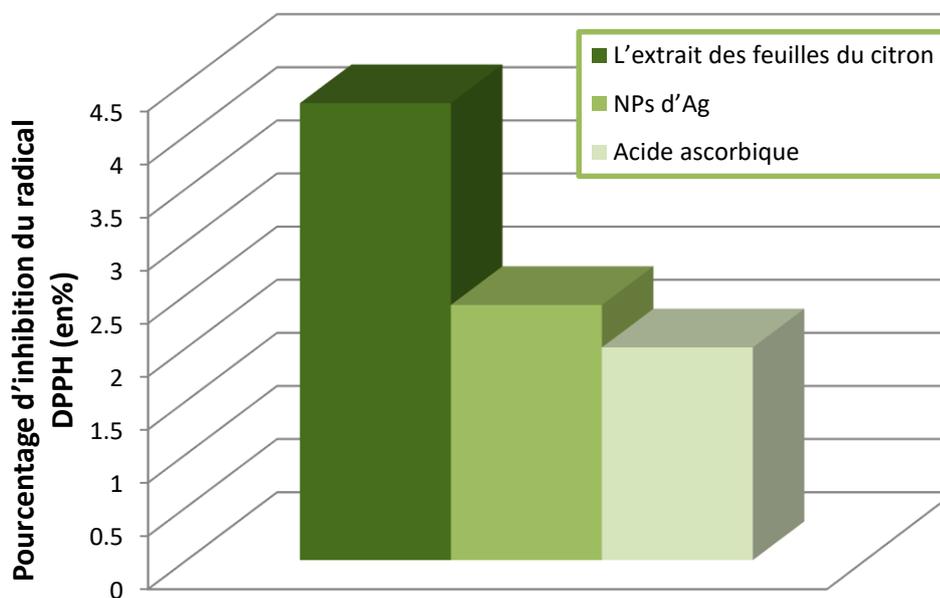


Figure 24 : Pourcentage d'inhibition du radical DPPH par l'acide ascorbique, les extraits des feuilles de citrus limon et NPs d'Ag.

Ces résultats montrent que les deux échantillons présentent une capacité de piéger le radical DPPH. Alors que l'extrait présente un pourcentage d'inhibition 54.20% et les nanoparticules 53.86%. En suivant ces résultats, nous pouvons déduire que l'activité antiradicalaire des NPs Ag est comparable que celle de l'extrait. Généralement, les feuilles de citrus limon constituent une source de composés phénoliques avec des activités antioxydants appréciables. Comme figurant dans le tableau 06, les deux échantillons (L'extrait des feuilles du citron et NPs d'Ag) possèdent une capacité de neutralisation de DPPH° inférieure à celle de standard (acide ascorbique), qui sont respectivement 6.24 µg/ml, 6.26 µg/ml et 4.25 µg/ml.

Donc l'effet antioxydant des nanoparticules est attribuée à la composition chimique de l'extrait qui contient une concentration très élevée en composés phénoliques.

II.5.2. L'activité antibactérienne et antifongique

L'activité antibactérienne et antifongique de nos produits synthétisés, a été évaluée in vitro, sur différentes souches bactériennes et fongiques, par la méthode de diffusion de puits en milieu solide. Vis –à vis une bactérie Gram positif dont fait partie : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, deux bactéries Gram négatif dont fait partie : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 et un fungi le *Candida albicans* ATCC 10231.

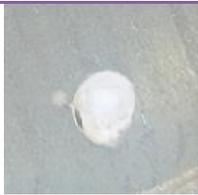
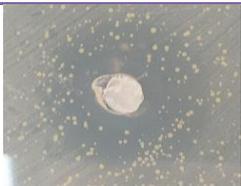
Cette méthode consiste à déposer des échantillons sur un milieu nutritif dans lequel une souche bactérienne a été inoculée. Elle permet de voir directement l'effet antibactérien du matériau soit par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des puits de l'échantillon si celui-ci diffuse, soit par l'absence de la croissance bactérienne dans la zone ayant été en contact avec le matériau si celui-ci est inhibiteur mais ne diffuse pas.

Tableau 08 : résultats de l'activité antibactérienne de nos produits par la méthode de diffusion en milieu solide.

Le tableau ci-dessous reporte les valeurs en mm des zones d'inhibitions atteintes avec les différentes souches étudiées.

Selon Ponce et al. [150], le diamètre des zones d'inhibition renseigne sur la sensibilité d'une bactérie, donc les résultats sont exprimés selon quatre niveaux d'activité :

- souche résistante ($D < 8$ mm)
- souche sensible ($9\text{mm} \leq D \leq 14\text{mm}$)
- souche très sensible ($15\text{mm} \leq D \leq 19$ mm)
- souche extrêmement sensible ($D > 20$ mm)

	Les bactéries			Fungi
	Gram +	Gram -		
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
AgNO ₃	18	6	14	16
				
L'extrait	13	0	0	20
				
Ag NPs	25	12	13	33
				
eau distillé Témoin -	0	0	0	0

A fin d'examiner l'activité antimicrobienne de l'extrait des feuilles du citron limon, solution de nitrate d'argent AgNO₃ et des nanoparticules d'argent synthétisées, On observe que les différentes souches de bactéries étudiées réagissent différemment aux antibiotiques testés, même s'il s'agit de deux souches d'un même gram bactérien.

L'effet inhibiteur renommé de l'argent est connu pour de nombreuses années et utilisé pour diverses applications médicales. Il ressort à travers l'observation des zones d'inhibition répertoriées dans le tableau précédent, que AgNO₃ testée manifestent des zones d'inhibition dont le diamètre varie de 18 à 14 mm contre *S. aureus* et *E. coli*, à l'exception de *P. aeruginosa* qui se révèle résistante a cette produit. D'autre part, l'extrait aqueux de feuilles du citron présente une activité antibactérienne vis-à-vis le *S. aureus* donc elle montre clairement un effet plus important sur les bactéries Gram positif. En effet, l'absence de zone d'inhibition

dans les boîtes test ensemencées avec *E. coli* et *P. aeruginosa* traduit leur résistance à l'extrait étudié. Le potentiel antibactérien de l'extrait étudié dépend de sa teneur en polyphénols et plus particulièrement en flavonoïdes et tanins. [151]

En plus, les NPs d'Ag montrent une efficacité antimicrobienne plus élevée par rapport le sel de nitrate d'argent en raison de leur faible taille et son grande superficielle, qui fournit à un meilleur contact avec micro-organismes.

Quelle que soit la bactérie utilisée, on observe des halos d'inhibition autour les NPs d'Ag, ce qui signifie qu'il y a de phénomène de diffusion de l'agent antibactérien et qui indiquant que les NPs d'Ag présentent un effet inhibiteur de la croissance bactérienne, aussi appelé effet bactériostatique. Donc L'argent a été l'un des premiers antimicrobiens utilisés historiquement, mais notre étude montre que les NPs d'Ag peuvent être plus efficaces que l'argent.

De nombreuses études in vitro menées sur le potentiel antibactérien des composés phénoliques les ont confirmés comme agents antimicrobiens contre un grand nombre de microorganismes pathogènes avec des spectres d'activités variables. Donc, Il a été constaté que les NPs d'Ag formés avaient une activité antibactérienne améliorée et les résultats montrent que la richesse d'extrait des feuilles du citron en composés phénoliques à effet synergique élevé.

Après 24 h d'incubation, la plaque de gélose contenant le *Candida albicans* montre une forte reprise de croissance par rapport les autres souches alors qu'elle très sensible.

Les trois échantillons montrent une activité antifongique vis-à-vis le *Candida albicans* et les NPs d'Ag donne le meilleur effet inhibiteur avec un. Ces résultats concordent avec ce qui trouvé par Najimu Nisha et al. [152], Kim et al. [153] Et Lee et al. [154]

Les observations menées révèlent que à l'aide d'extraits des feuilles de citrus limon naturels, les NPs d'Ag synthétisés confirment leur effet antibactérien sur les pathogènes courants dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et le *Candida albicans*.

Conclusion générale

Les nanoparticules d'argent ou nano-argent sont des molécules ayant une taille de 20-40 nm, ils composées à 80% d'atome d'argent et à 20% d'ions argent, Ils sont très prisés par l'industrie pharmaceutique et agroalimentaire, de part notamment leur propriété biocide.

Les travaux expérimentaux nous a permis de valider la synthèse de nanoparticules d'argent colloïdale par une voie verte. L'eau a en effet été utilisée comme solvant et l'utilisation de l'extrait des feuilles du citron (*citrus limon*) comme agent stabilisant pour la réduction du nitrate d'argent a été validée.

Les nanoparticules d'argent préparés sont caractérisées en solution en mesurant leur résonance des plasmons de surface par spectrophotométrie UV-vis, une spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, MEB et EDX.

Les résultats des analyses des composés phénoliques montrent que la teneur moyenne en polyphénols, flavonoïdes et tanins totaux de l'extrait aqueux des feuilles du citron (*citrus limon*) sont respectivement de 3035,22 mg équivalent acide gallique par 100 gramme d'extrait, 782,12 mg équivalent quercétine par gramme d'extrait. En plus, des études récentes suggèrent que les feuilles du citron sont une source appréciable en composé bioactifs comparativement à l'huile essentielle de citron.

Dans ce travail, nous rapportons une méthode simple et respectueuse de l'environnement. Les NPs d'Ag ont été synthétisés avec succès et le taux de réaction pour la synthèse des nanoparticules par cette méthode et avec l'utilisation de l'extrait des feuilles du citron est 2.5 h, qui sont beaucoup plus rapides que la synthèse avec les feuilles de coriandre négociée (12 h). [155]

Nous avons pu montrer que les NPs d'Ag synthétisés présentent un spectre de résonance plasmon de surface avec un maximum d'absorption à 782,12 nm et une allure supposant la formation des nanoparticules de forme sphérique ou proche d'une sphère. Matières organiques solubles dans l'eau présente dans le matériel végétal étaient principalement responsables la réduction ainsi que la stabilisation des ions Ag à nanométrique particules, confirmées par spectroscopie FTIR étude. La taille et la forme des nanoparticules et la composition de leur surface a été étudiée à l'aide de mesures MEB et EDX. En générale, La réduction d'ions d'argents par l'extrait des feuilles du citron donne des nanoparticules plus stable avec différent diamètre inférieure à 10 nm. Il est à noter que dans le cas de formation des nanoparticules d'argent, il est nécessaire d'utiliser des techniques plus fiables comme la microscopie électronique à transmission (TEM) pour déterminer la taille exacte des particules.

D'autre coté, les nanoparticules synthétisées ont montré un effet bactéricide très efficace contre les trois types des bactéries et un activité antifongique vis-à-vis le *Candida albicans*. Les nanoparticules d'argent préparées de cette manière ont également montré des propriétés antioxydant raisonnables. Tous ces résultats démontrent que le bio-ingrédients présents dans l'extrait de plante était efficaces pour la synthèse des nanoparticules d'Ag avec une efficacité biologique qui offre la possibilité de l'incorporer dans la composition des produits alimentaires et pharmaceutiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Chapitre I : Rappel bibliographique

- [1] Ramsden Jeremy J, what is nanotechnology? *Nanotechnology Perceptions* 1, 3–17, 2005.
- [2] Amandine Andrieux - Ledier. Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métalloorganiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques. Chimie théorique et/ou physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, Français, 2012.
- [3] K.M. Kumar, M. Sinha, B.K. Mandal, A.R. Ghosh, K.S. Kumar, P.S. Reddy, *Spectrochim. Acta A* 91, pp. 228-233, 2012.
- [4] Mina Ider. Elaboration et caractérisation des nanomatériaux à base de métaux nobles. Physique [physics]. Université du Maine, Français, 2017.
- [5] Mohsen Zargar, Azizah Abdul Hamid, Fatima Abu Bakar, Mariana Nor Shamsudin, Kamyar Shameli, Fatemeh Jahanshiri, Farah Farahani, Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L, *Molecules*; 16(8) : 6667-76. 8 Aug 2011.
- [6] R. Sankar, A. Karthik, A. Prabu, S. Karthik, K.S. Shivashangari, V. Ravikumar, *Colloids Surf. B* 108, pp. 80-84, 2013.
- [7] ES. Jin, GS. Ghodake, NG. Deshpande, YP. Lee, « PEAR FRUIT EXTRACT-ASSISTED ROOMTEMPERATURE BIOSYNTHESIS OF GOLD NANOPATES, » *Colloids Surf B.*, p. 75:584–9, 2010.
- [8] R. Sanghi, P. Verma, « BIOMIMETIC SYNTHESIS AND CHARACTERISATION OF PROTEIN CAPPED SILVER NANOPARTICLES, » *Bioresour Technol*;100: 501–4, 2009.
- [9] M. Noruzi, D. Zare, K. Khoshnevisan, D. Davoodi, «RAPID GREEN SYNTHESIS OF GOLD NANOPARTICLES USING ROSA HYBRIDA PETAL EXTRACT AT ROOM TEMPERATURE, » *Spectrochim Acta A*, p. 79:1461–5, 2011.
- [10] Sachindri Rana; P. T. Kalaichelvan, «ÉCOTOXICITE DES NANOPARTICULES, » pp. 1-11, 2013.
- [11] O. Salata, « APPLICATIONS DE NANOPARTICULES EN BIOLOGIE ET EN MEDECINE, » *J Nanobiotechnology*, 2004.
- [12] P. L. Freund, M. Spiro, *J. Phys. Chem.*, 89, 1074-1077, 1985.
- [13] C. L. Haynes, R.P. Van Duyne, *Nano Lett.*, 3, 939-943, 2003.
- [14] P. C. Andersen, K.L. Rowlen, *Applied Spectroscopy*, 56, 124A-135A, 2002.
- [15] A. J. Haes, S. Zou, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, *J. Phys. Chem. B*, 108, 109-116, 2004.
- [16] V. P. Zharov, K.E. Mercer, E.N. Galitovskaya, M.S. Smeltzer, *Biophys. J.*, 90, 619- 627, 2006.

- [17] J. C. Maxwell Garnett, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, 203, 385-420, 1904.
- [18] G. Mie, *Annalen der Physik*, 330, 377-445, 1908.
- [19] M. Raffi, F. Hussain, T.M. Bhatti, J.I. Akhter, A. Hameed, M.M. Hasan, *J. Mater. Sci. Technol.*, 24, 192-196, 2008.
- [20] E. Grabowska, A. Zaleska, S. Sorgues, M. Kunst, A. Etcheberry, C. Colbeau-Justin, H. Remita, *J. Phys. Chem. C*, 117, 1955-1962, 2013.
- [21] K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp. *Acc. Chem. Res.*, 39, 443-450, 2006.
- [22] Stéphanie GEORGE, Nicolas LAMPROYE, « Caractérisation des nano-objets ». *Tech L'ingénieur*.
- [23] M. Ricaud et O. Witschger, « LES NANOMATERIAUX. DEFINITIONS, RISQUES TOXICOLOGIQUES, » *Inst. Natl. Rech.*, pp. 1-52, 2012.
- [24] Journal Officiel de l'Union Européenne. Recommandation de la commission du 18 octobre relative à la définition des nanomatériaux. (2011/969/UE) Consultable sur <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:FR:PDF>, 2011.
- [25] A.- Moselle et A. Moselle, « NANO-OBJETS, NANOMATERIAUX ».
- [26] Afsset, « LES NANOMATERIAUX : EFFETS SUR LA SANTE DE L'HOMME ET SUR L'ENVIRONNEMENT, » Juillet 2006.
- [27] ISO (International Organization for Standardization). *Nanotechnologies - Vocabulaire - Partie 2 : Nano-objets (ISO/TS 80004-2 :2015)*. Edition 1. 10p. 2015.
- [28] ISO (International Organization for Standardization). *Nanotechnologies -Terminology and definitions for nano-objects - Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. (ISO/TS 27687 : 2008)*. Edition 1. 2008.
- [29] M. Ricaud et O. Witschger, « Les nanomatériaux. Définitions, risques toxicologiquescaractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention, », *Inst. Natl. Rech.* 1-52, 2012.
- [30] Guerricha Maroua et selmane Sassia, la synthèse verte des nanoparticules métallique de cuivre CuO par l'extrait Moringa, mémoire de master, Université Echahid Hamma Lakhdar. El Oued, 2018.
- [31] H.Q. Jiang, S. Manolache, A.C.L. Wong and F.S. Denes, Plasma-enhanced deposition of silver nanoparticles onto polymer and metal surfaces for the generation of antimicrobial characteristics. *J. Appl. Polym. Sci.* 93, 1411. 2004.

- [32] S. Hirano, Y. Wakasa, A. Saka, S. Yoshizawa, Y. Oya-Seimiya, Y. Hishinuma, A. Nishimura, A. Matsumoto and H. Kumakura, Preparation of Bi-2223 bulk composed with silver-alloy wire. *Physica C Superconductivity* 392, 458. 2003.
- [33] X.L. Ren and F.Q. Tang, Enhancement Effect of Ag-Au Nanoparticles on Glucose Biosensor Sensitivity. *Acta Chim. Sinica* 60, 393. 2002.
- [34] S.Y. Yeo, H.J. Lee and S.H. Jeong, Preparation of nanocomposite fibers for permanent antibacterial effect. *J. Mater. Sci.* 38, 2143. 2003.
- [35] H.S. Wang, X.L. Qiao, J.G. Chen, X.J. Wang and S.Y. Ding, Mechanisms of PVP in the preparation of silver nanoparticles. *Mater. Chem. Phys.* 94, 449. 2005.
- [36] J.P. Zhang, P. Chen, C.H. Sun and X.J. Hu, Sonochemical synthesis of colloidal silver catalysts for reduction of complexing silver in DTR system. *Appl. Catal. A: Gen.* 266, 49. 2004.
- [37] R.J. Chimentao, I. Kirm, F. Medina, X. Rodriguez, Y. Cesteros, P. Salagre and J.E. Sueiras, Different morphologies of silver nanoparticles as catalysts for the selective oxidation of styrene in the gas phase. *Chem. Commun.* 4, 846. 2004.
- [38] Petit, C., Rusponi, S., et al. "Magnetic properties of cobalt and cobalt-platinum nanocrystals investigated by magneto-optical Kerr effect." *Journal of Applied Physics* 95(8). 2004.
- [39] Zheng, N., Fan, J., et al. "One-step one-phase synthesis of monodisperse noble-metallic nanoparticles and their colloidal crystals." *Journal of the American Chemical Society* 128(20): 6550-6551. 2006.
- [40] Tang, Y. and Ouyang, M. "Tailoring properties and functionalities of metal nanoparticles through crystallinity engineering." *Nature Materials* 6(10): 754- 759. 2007.
- [41] Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR, Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol* 4, 634–641, 2009.
- [42] Yokoyama T, Basic properties and measuring methods of nanoparticles. In : Hosokawa M, Nogi K, Naito M, Yokoyama T (eds) *Nanoparticle technology handbook*. Elsevier, Amsterdam, pp 3–48, 2008.
- [43] Chen Q, Yue L, Xie FY, Zhou ML, Fu YB, Zhang YF and Weng J, Preferential facet of nanocrystalline silver embedded in polyethylene oxide nanocomposite and its antibiotic behaviors, *Journal of Physical Chemistry C*, 112, 10004–10007, 2011.
- [44] Lansdown ABG, Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action, *J. Wound Care*, 11, 125, 2002.

- [45] Silver S, Phung LT, Silver G, Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33, 627, 2006.
- [46] Duran N, Marcato PD, De Souza GIH, Alves OL, Esposito E, Antibacterial effect of silver nanoparticles produced by fungal process on textile fabrics and their effluent treatment, *J Biomed Nanotechnol*, 3, 203–208, 2007.
- [47] Rai M, Yadav A, Gade A, Silver nanoparticles: As a new generation of antimicrobials, *Biotechnol Adv*, 27, 76–83, 2009.
- [48] Huang H, Yang X, Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method, *Carbohydr. Res.*, 339, 2627–2631, 2004.
- [49] Djeghboub Widad, Nanoparticules d'or et d'argent déposées sur oxyde de cerium synthétisées sous irradiation, Thèse de Magister, 99, 2010.
- [50] Z.S. Pillai and P.V. Kamat, What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method. *J. Phys. Chem. B* 108, 945, 2004.
- [51] Y. C. Zhu, M.R. Ji, H.G. Zheng, Y. Li, Z.P. Yang and Y.T. Qian, Seed-mediated synthesis of silver with skeleton structures. *Mater. Lett.* 58, 1121, 2004.
- [52] N. K. Chaki, J. Sharma, A.B. Mandle, I.S. Mulla, R. Pasricha and K. Vijayamohan, Size dependent redox behavior of monolayer protected silver nanoparticles (2–7 nm) in aqueous medium. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 6, 1304, 2004.
- [53] G. Malandrino, S.T. Finocchiaro and I.L. Fragala, Silver nanowires by a sonoself-reduction template process. *J. Mater. Chem.* 14, 2726, 2004.
- [54] H.Y. Ma, B.S. Yin, S.Y. Wang, Y.L. Jiao, W. Pan, S.X. Huang, S.H. Chen and F.J. Meng, Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles by a Novel Electrochemical Method. *Chem Phys Chem.* 5, 68, 2004.
- [55] J.Q. Cheng and S.W. Yao, Synthesis and characterization of silver nanoparticles by sonoelectrode-position. *Rare Met.* 24, 376, 2005.
- [56] Q.F. Zhou and Z. Xu, The preparation of nano-scale plate silver powders by visible light induction method. *J. Mater. Sci.* 39, 2487, 2004.
- [57] K. Mallick, M.J. Witcomb and M.S. Scurrill, Polymer stabilized silver nanoparticles: A photochemical synthesis route. *J. Mater. Sci.* 39, 4459, 2004.
- [58] P.D. Cozzoli, R. Comparelli, E. Fanizza, M.L. Curri, A. Agostiano and D. Laub, Photocatalytic Synthesis of Ag Nanoparticles Stabilized by TiO₂ Nanorods: A Semiconductor / Metal Nanocomposite in Homogeneous Nonpolar Solution. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 3868, 2004.

- [59] F.K. Liu, P.W. Huang, Y.C. Chang, F.H. Ko and T.C. Chu, Microwave-assisted synthesis of silver nanorods. *J. Mater. Res.* 19, 469, 2004.
- [60] T. Yamamoto, H.B. Yin, Y. Wada, T. Kitamura, T. Sakata, H. Mori and S. Yanagida, Morphology-Control in Microwave-Assisted Synthesis of Silver Particles in Aqueous Solutions. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 77, 757, 2004.
- [61] H.B. Yin, T. Yamamoto, Y. Wada and S. Yanagida, Large-scale and size-controlled synthesis of silver nanoparticles under microwave irradiation. *Mater. Chem. Phys.* 83, 66, 2004.
- [62] L.H. Xin, R.M. Zhou, E.B. Gracien and A.O. Francis, Synthesis of silver nano-particles by EB irradiation. *J. Radiat. Res. Radiat. Process* 22, 69, 2004.
- [63] X.W. Zheng, L.Y. Zhu, X.J. Wang, A.H. Yan and Y. Xie, A simple mixed surfactant route for the preparation of noble metal dendrites. *J. Cryst. Growth* 260, 255, 2004.
- [64] L. Sintubin, W. De Windt, J. Dick, J. Mast, D. van der Ha, Willy Verstraete et N. Boon, Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84, 741, 2009.
- [65] S. Galdaneo, Influence des conditions de broyage sur la distribution de nanoparticules magnétiques (Fe, Co) dans une matrice de cuivre. Thèse de l'Université Paris 7. 2001.
- [66] G. Madhumitha, Roopan SM. Devastated Crops: Multifunctional Efficacy for the Production of Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, Article ID 951858, 12 pages, 2013.
- [67] A. Simchi, Ahmadi R, Seyed Reihani SM and Mahdavi A, Kinetics and mechanisms of nanoparticle formation and growth in vapor phase condensation process, *Materials and Design*, 28, 850–856, 2007.
- [68] W. Wang and Gu BH, Preparation and Characterization of Silver Nanoparticles at High Concentrations, *ACS Symposium Series*, 878, Chapter 1, 1–14. 2012.
- [69] Li D, Hong BY, Fang WJ, Guo YS and Lin R, Preparation of well-dispersed silver nanoparticles for oil-based nanofluids, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 49(4), 1697–1702, 2010.
- [70] L. Gibbons Vernett and Getman FH, The potential of silver in non aqueous solutions of silver nitrate, *Journal of American Chemical Society*, 36(10), 2091–2095, 1914.
- [71] W.L Cheng, Dong SJ and Wang EK, Studies of electrochemical quantized capacitance charging of surface ensembles of silver nanoparticles, *Electrochemistry Communications*, 4(5), 412–416, 2002.

- [72] W.Z. Zhang, X.L Qiao and J.G Chen, Synthesis of silver nanoparticles-Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion, *Materials Science and Engineering B*, 142, 1–15, 2007.
- [73] K.B Narayanan and N. Sakthivel, Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes, *Advances in Colloid and Interface Science*, 156(1–2), 1–13, 2010.
- [74] N. M. Bulgakova and A.V. Bulgakov, Pulsed laser ablation of solids: transition from normal vaporization to phase explosion, *Appl. Phys. A-Mater*, 73, 199, 2001.
- [75] M.A. Shannon, Laser Ablation Mass Removal versus Incident Power Density during Solid Sampling for Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy, *Anal. Chem.* 67, 4522, 1995.
- [76] A. Dupont, P. Caminat, P. Bournot and J.P. Gauchon, Enhancement of material ablation using 248, 308, 532, 1064 nm laser pulse with a water film on the treated surface, *J. Appl. Phys*, 78, 2022, 1995.
- [77] A. Vogel, Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond at femtosecond time scales, *Appl. Phys. B-Lasers O.* 68, 271, 1999.
- [78] S. Nair, A. Sasidharan, S. Nair, and S. Raina, Role of size scale of ZnO nanoparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cells, *J.Mater.sci.*, 20, S235-S241, 2008.
- [79] S.S Shankar, A. Rai, B. Ankamwar, A. Singh, A. Ahmad, M. Sastry, *Nat. Mater.*, 3, 482, 2004.
- [80] I. Willner, R. Baron and B. Willner, Growing metal nanoparticles by enzymes, *Advance Material*, 18, 1109–1120, 2006.
- [81] M. Zargar , A. A. Hamid , F. Abu Bakar , M. Nor Shamsudin , K. Shameli , F. Jahanshiri , Farah Farahani , Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L, *Molecules*;16(8) : 6667-76. 8 Aug 2011.
- [82] S.J Jang, I.J Yang, C.O Tetey, K.M Kim, H.M Shin. In-vitro anticancer activity of green synthesised silver nanoparticles on MCF-7 human breast cancer cells. *Mater Sci Eng*, 68: 430 – 435, 2016.
- [83] Fahriye Taşkiran, Deniz Uzunoğlu, Ayla Özer, Biosynthesis, Characterisation and determination of adsorbent proprieties of silver nanoparticules with Cyprus Acacia (*Acacia cyanophylla*) leaf extract, *Anadolu University Journal of Science and Technology A- Applied Sciences and Engineering*. - Volume: 18 Number: 3 Page: 733- 745, 2017.
- [84] V. Kumar, S. K Yadav, Plant-mediaed synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *J Chem Technol Biotechnol* 84, 151–157, 2009.

- [85] Yusheng Liu, Shimou Chen, Lei Zhong, Guozhong Wu, Preparation of high-stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation, *Radiation Physics and Chemistry*, 78, 251–255, 2009.
- [86] W. Zhang, X. Qiao, J. Chen, Synthesis of silver nanoparticles—Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion. *Mat. Sci. And Engineering B*, 142, 1, 2007.
- [87] Thomas Courant, Nanoparticules incorporant des complexes inorganiques à visée diagnostique, thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, s, 2011
- [88] A. R.Vilchis-Nestor, V.Sánchez-Mendieta, M.A.Camacho -López, R.M.GómezEspinosa, J.A.Arenas-Alatorre , Synthèse sans solvant et propriétés optiques de nanoparticules d'Ag et d'or à l'aide de l'extrait de *Camellia Sinensis* , *Mater. Lett.*, vol. 62, pp. 3103-3105, 2008.
- [89] J.Y.Song, E.Y.Kwon, B.S.Kim, Synthèse biologique de nanoparticules de plante de l'extrait de feuille de *Diopyros Kaki*, *Bioprocess. Biosyst. Eng*, Vols. 159-164, p. 33, 2010.
- [90] J.Y.Song, B.S.Kim, Synthèse biologique rapide de nanoparticules d'argent à l'aide d'extraits de feuilles de plante, *Bioprocess. Biosyst. Eng*, vol. 32, pp. 79-84, 2009.
- [91] S. Shiv Shankar, A.Ahmad, R.Pasricha, M. J. Sastry, La bioréduction des ions chloroaurate par les feuilles de Geranium et son champignon endophyte donne des nanoparticules d'Or de différentes formes, *Mater. Chem*, vol. 13, pp. 1822-1846, 2003.
- [92] R. Haverkamp, A.Marshall , «Le mécanisme de formation des nanoparticules métalliques chez les plantes : limite d'accumulation, *J. nanoparticle. Res.* vol. 11, n° 16, pp. 1453-1464, 2009.
- [93] P. Raveendran, J. Fu, S.L. Wallen, Synthèse totalement verte et stabilisation de nanoparticules métalliques, *Am. chem. Soc.* vol. 125, n° 146, pp. 13940-13941, 2003.
- [94] S.S. Shankar, A. Ahmad and M. Sastry, Geranium Leaf Assisted Biosynthesis of Silver Nanoparticles. *Biotechnol. Prog.* 19, 1627, 2003.
- [95] S. Shiv Shankar, A. Ahmad, R. Pasricha, M. J. Sastry, «LA BIORÉDUCTION DES IONS CHLOROAUATE PAR LES FEUILLES DE GERANIUM ET SON CHAMPIGNON ENDOPHYTE DONNE DES NANOPARTICULES D'OR DE DIFFÉRENTES FORMES, » *Mater. Chem*, vol. 13, pp. 1822-1846, 2003.
- [96] S. Shiv Shankar, A. Rai, A. Ahmad, M. Sastry, « SYNTHÈSE RAPIDE DE NANOPARTICULES D'AU, D'AG ET DE BIMÉTALLIQUES D'AU AU NOYAU D'AG AU MOYEN D'UN BOUILLON DE FEUILLES DE NEEM (AZADIRACHTA INDICA, » *J. Colloid. Interface. Sci.*, vol. 175, pp. 496-502, 2004.
- [97] S.Maensiri, P.Laokul, J.Klinkaewnarong, S.Prokha, V.Promark, S.Seraphin, «NANOPARTICULES D'OXYDE D'INDIUM (IN₂O₃) UTILISANT L'EXTRAIT D'ALOE

VERA: SYNTHÈSE ET PROPRIÉTÉS OPTIQUES,» Optoelectronics and Advanced Materials, vol. 2, pp. 161-165, 2008.

[98] Hassan PA, Kulshreshtha SK, “Modification to the cumulant analysis of polydispersity in quasielastic light scattering data”, Journal of Colloid and Interface Science, 300,744–748, 2006.

[99] Sista Kameswara Srikar et al Green and Sustainable Chemistry, 6, 34-56, 2016.

[100] Amandine Andrieux Ledier, “Elaboration de nanoparticules d’argent par réduction de sels métallo-organiques, contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques“, thèse de doctorat de l’Université Paris IV, Pierre et Marie Curie, 164, 2012.

[101] J. Glusker, A. Katz, C. Bock // Rigaku J. V. 16. № 2. P. 8–16. 1999.

[102] S. Si, T.K. Mandal // Chemistry. V. 13. № 11.P. 3160–3168. 2007.

[103] Jose R. Peralta-Videa et al Nanotechnol. Environ. Eng. 1: 4, 2016.

[104] P. Raveendran, Fu J., S.L. Wallen // Am. Chem. Soc. V. 125. № 46. P. 13940– 13941. 2003.

[105] R. Haverkamp, A. Marshall // J. Nanoparticle. Res. V. 11. № 6. P. 1453– 1464. 2009.

[106] P. Selvakannan, S. Mandal, S. Phadtare, A. Gole, R. Pasricha, S.D. Adyanthaya, M. Sastry // J. Colloid. Interface. Sci. V. 269. № 1. P. 97–102. 2004.

[107] R. L. Willett, K.W. Baldwin, K.W. West, L.N. Pfeiffer //Proc. Natl. Acad. Sci. V. 102. № 22. P. 7817–7822. 2005.

[108] A. Baghizadeh, S. Ranjbar, V. Kumar Gupta, M. Asif, S. Pourseyedi, M. J. Karimi, R. Mohammad inejad, « Green synthesis of silver nanoparticles using seed extract of *Calendula officinalis* in liquid phase », Journal of Molecular Liquids 207, 159– 163. 2015.

[109] C. Luo, Y. Zhang, X. Zeng, Y. Zeng, Y. Wang, The Role of Poly (ethylene glycol) in the Formation of Silver Nano-particles. J. Coll. and Inter. Science 288, 444. 2005.

[110] Y. Wang and N. Toshima, J. Phys. Chem. 101, 5301. 1997.

[111] G. Schmid, Chem. Rev. 92, 1709. 1992.

[112] M. G. Bawendi, M. L. Steigerwald, and L. E. Brus, Annu. Rev. Phys. Chem. 41, 477. 1990.

[113] W. A. Deheer, Rev. Mod. Phys. 65, 611. 1993.

[114] S. Joseph and B. Mathew, J. Rec. Sc. Res. 3, 185. 2014.

[115] A. N. Shipway, M. Lahav, and I. Willner, Adv. Mater. 12, 993. 2000.

[116] H. Q. Jiang, S. Manolache, A. C. Wong, and F. S. Denes, J. Appl. Polym. Sci. 93, 1411. 2004.

[117] Y. Cui and C. M. Lieber, Science 291, 851. 2001.

- [118] T. Textor, M.M.G. Fouda, B. Mahltig, *Appl. Surf. Sci.* 256, 2337-2342. 2010.
- [119] A. T. Le, P. T. Huy, P. D. Tam, T. Q. Huy, P. D. Cam, A. A. Kudrinskiy, Y. A. Krutyakov, *Curr. Appl. Phys.* 10, 910. 2010.
- [120] S. Shrivastava, T. Bera, S. K. Singh, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash. *ACS Nano.* 3, 1357. 2010.
- [121] A. T. Le, L. T. Tam, P. D. Tam, P. T. Huy, T. Q. Huy, N. V. Hieu, A. A. Kudrinskiy, Y. A. Krutyakov. *Mater. Sci. Eng. C.* 30, 910. 2010.
- [122] MTIMET Issam, "Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent", thèse de doctorat, INSA de Rouen, 156, 2011.
- [123] Smith MW, Ambudkar IS, Phelps PC, Regec AL, and Trump BF: HgCl₂⁻ induced changes in cytosolic Ca²⁺ of cultured rabbit renal tubular cells. *Biochem. Biophys. Acta* 931: 130. 1987.
- [124] Jain P and Pradeep T, "Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter", *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 59–63, 2005.
- [125] M. Jannathul Firdhouse, P. Lalitha, "Biosynthesis of Silver Nanoparticles and Its Applications", *Journal of Nanotechnology*, vol. 2015, Article ID 829526, 18 pages, <https://doi.org/10.1155/2015/829526>, 2015.
- [126] Alt V, "An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement", *Biomaterials*, 25, 4383–4391, 2004.
- [127] Fu J, Ji J, Fan D and Shen J, "Construction of antibacterial multilayer films containing nanosilver via layer-by-layer assembly of heparin and chitosan-silver ions complex", *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, 79A (3), 665–674, 2006.
- [128] Elechiguerra JL, Burt JL, Morones JR, Bragado AC, Gao X and Lara HH, "Interaction of silver nanoparticles with HIV-1", *Journal of Nanobiotechnology*, 3, 1–10, 2005.

Chapitre II: Matériels et Méthodes

- [129] N. Sahu, D. Soni, B. Chandrashekar, B.K. Sarangi, D. Satpute, R.A. Pandey, *Bioprocess and Biosystems Engineering* 36, 999-1004. 2013.
- [130] J.Y. Song, H.K. Jang, B.S. Kim, *Process Biochemistry* 44, 1133-1139. 2009.
- [131] R.R. Kannan, W.A. Stirk, J. Van Staden, *South African Journal of Botany* 86, 1-8. 2013.
- [132] Débuigine G. et Couplan F., *Petit Larousse des plantes qui guérissent*. Ed : Larousse, Paris. 895 p. 2008.

- [133] Gollouin F., Tonelli N. De fruits et de graines comestibles du monde entier. Edition Brigitte Peyrot Poos, Paris, La voisier SAS.PP. 186-195. 2013.
- [134] PADRINI, P et LUCHERONI, M.T., *Le grand livre des huiles essentielles- guide pratique pour retrouver vitalité, bien-être et beauté avec les essences*. Ed : De Vecchi, Paris. 1996.
- [135] K. Bouhadjra, étude de l'effet des antioxydants naturels et de synthèse sur la stabilité oxydative de l'huile d'olive vierge, thèse pour l'obtention du diplôme de magister, Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou. 2011.
- [136] Ribéreau-Gayon P, Les composés phénoliques des végétaux. Editions Dunod, Paris 254 pp, 1968.
- [137] Hayes, J-E., Allen,A., Brunton,N., O'Grady,M-N., Kerry,J-B. Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, vol.126, pp. 948–955. 2011.
- [138] Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. *Edition Dunod. Paris*. pp: 173-201. 1968.
- [139] W.Brand-Williams;Cuvelier M.E; Berset C; Use of a free radical method to Evaluate Antioxydant Activity. *lebensm-Wiss uTechnol* 28: 25-30. 1995.
- [140] Iqbal, Z; Gul,S; Ul Haq, I; Munawar, A; Ahmad,A; Amin, F.*Antibacterial and antifungal activity of Mentha longifolia Mirkalan village of Nizampur region Nowshehra district of KPK, Pakistan*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5(6): 318-321. 2017.
- [141] Penssini G.L., Prado Dias Filho Celso B., Nakamura V., Cortez D.A.G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from Piper Regnelli (Miq). *C. D. C. var. pallescens* (C.D.C). *yunk. Memorias do instituo Oswaldo Cruz*, 98. 2003.
- [142] Pfaller M.A., Burmeister L., Bartlett M.S., Rinaldi M.G. Multicenter Evaluation of Four Methods of Yeast Inoculum Preparation. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1437-1441. 1988.

Chapitre III: Résultats et Discussion

- [143] Bouaziz M., Fki I., Jemai H., Ayadi M. and Sayadi, S. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108: 253-262. 2008.

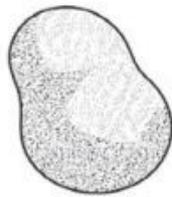
- [144] Selvaraj Raja, V. R., Varadavenkatesan Thivaharan. "Green biosynthesis of silver nanoparticles using *Calliandra haematocephala* leaf extract, their antibacterial activity and hydrogen peroxide sensing capability." 10: 253–261. 2015.
- [145] P. Mulvaney, Surface plasmon spectroscopy of nanosized metal particles, *Langmuir* 12, 788–800. 1996.
- [146] P.C. Nagajyothi, K.D. Lee, Synthesis of plant-mediated silver nanoparticles using *Dioscorea batatas* rhizome extract and evaluation of their antimicrobial activities, *J. Nanomater.* 2011.
- [147] Padma S. Vankar • Dhara Shukla, Biosynthesis of silver nanoparticles using lemon leaves extract and its application for antimicrobial finish on fabric, *Appl Nanosci*, 2:163–168. 2012.
- [148] N. Ahmad, S. Sharma, R. Rai, Rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles using peels of *Punica granatum*, *Int. J. Nanoparticles* 5, 185–195. 2012.
- [149] P. Phanjom, E. Zoremi, J. Mazumder, M. Saha, S.B. Baruah, Green synthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Myrica esculenta*, *Int. J. Nanosci. Nanotechnol.* 3, 73–79. 2012.
- [150] Ponce A.G; Fritz.R; Del Valle. C; et Roura.S.I. Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic swiss chard. *Society of food science and technology (Elsevier)*. 36: 679-984, 2003.
- [151] Dib, M. E. A., Allali, H., Bendiabdellah, A., Meliani, N., & Tabti, B. Antimicrobial activity and phytochemical screening of *Arbutus unedo* L. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(4), 381-385. 2013.
- [152] S. Najimu Nisha, O.S. Aysha, J. Syed Nasar Rahaman, P. Vinoth Kumar, S. Valli, P. Nirmala, A. Reena, Lemon peels mediated synthesis of silver nanoparticles and its antidermatophytic activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 124, 194–198. 2014.
- [153] Kim, Keuk-Jun, W.S. Sung, S.K. Moon, J.S. Choi, J.G. Kim, D.G. Lee, Anti-fungal effect of silver nanoparticles on dermatophytes, *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 482–1484. 2008.
- [154] J. Lee, K.J. Kim, W.S. Sung, J.G. Kim, D.G. Lee, The Silver Nanoparticle (Nano-Ag): a New Model for Anti-fungal Agents, *InTech*, 295–308. 2010.
- [155] Narayanan KB, Sakthivel N, Coriander leaf mediated biosynthesis of gold nanoparticles. *Mater Lett* 62(30) :4588–4590. 2008.

REFERENCES NUMERIQUES

- [A] <http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/risques-nanoparticules-Frejafon.xml>
- [B] <https://ogi.ctcpa.eu/upload/files/MARINA-Guide-Inventaire-2017.pdf>
- [C] www.quiodansmonassiette.fr
- [D] <http://www.inrs.fr/risques/nanomateriaux/terminologie-definition.html>
- [E] <http://culturesciencesphysique.ens-lyon.fr/ressource/risques-nanoparticules-Frejafon.xml>
- [F] (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Citronnier>), (<https://www.wikiwand.com/fr/Citron>)

Les annexes :

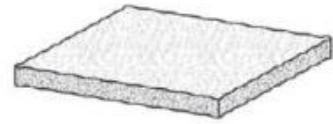
Annexe 01 : Les trois principales formes de nano-objets



a) nanoparticule (3 dimensions externes à l'échelle nanométrique)

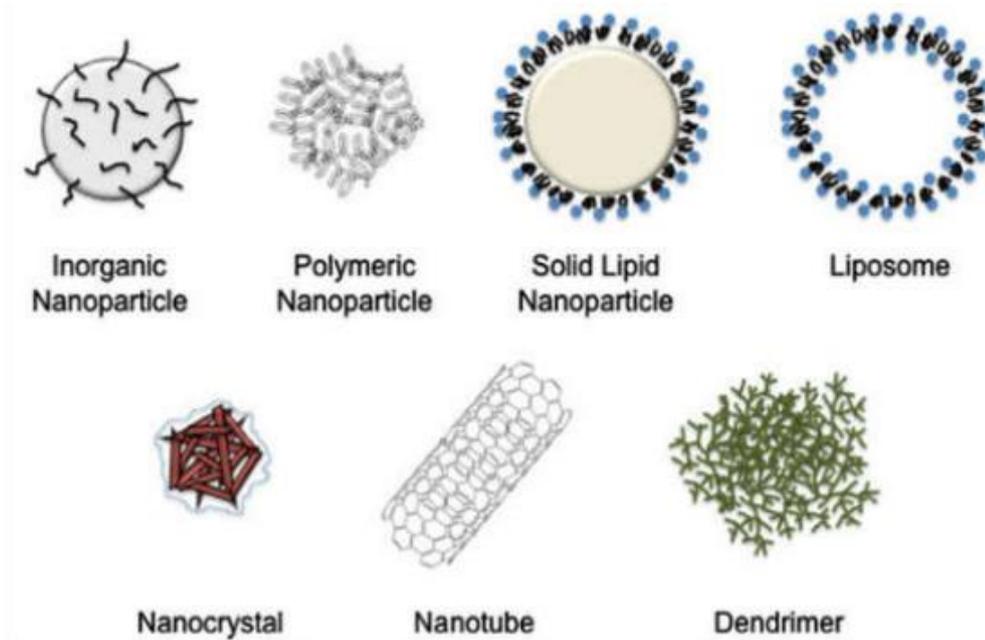


b) nanofibre (2 dimensions externes à l'échelle nanométrique)

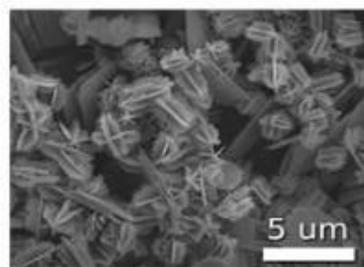


c) nanoplaque (1 dimension externe à l'échelle nanométrique)

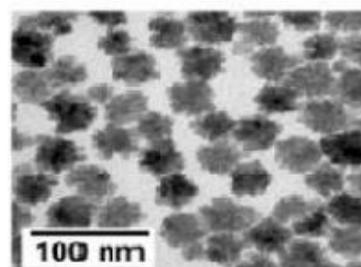
Annexe 02 : Les différents types des nanoparticules



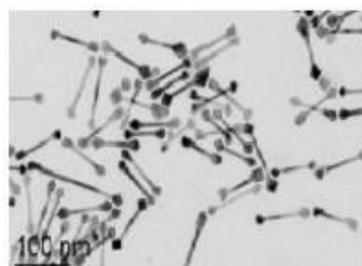
Annexe 03 : Différentes formes des Nanoparticules



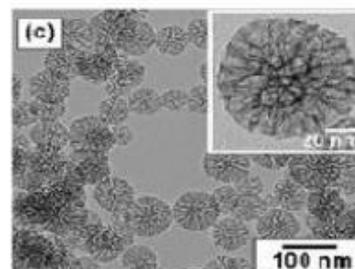
Nanocristaux étoilés d'oxyde de vanadium



Nanoparticules d'oxyde de fer



Nanobâtonnets de Co avec des extrémités de Fe



Nanoparticule de Silice

Annexe 04 : Les Milieux de culture

➤ Milieu de culture liquide

- ✓ Bouillon Muller-Hinton (BMH)

Elle porte les caractéristiques suivantes :

- Peptone de caséine 17,5 g
- Extrait de viande 2,0 g
- Amidon 1,5 g
- Eau distillée 1 L
- pH 7,4
- ✓ Bouillon Saboureau (BS) (Sigma- Aldrich)
 - Tryptone 5,0 g
 - Peptone pepsique de viande 5,0 g
 - Glucose 20,0 g
 - Eau distillée 1 L
 - pH 5,7

➤ Milieu de culture solide

- ✓ Gélose Mueller Hinton (MH) (Sigma- Aldrich)
 - 38g de poudre déshydraté
 - 1L d'eau distillé.
- ✓ Gélose dextrose de pomme de terre (PDA) Composite de
 - Pomme de terre 200 g
 - Dextrose/Glucose 15,0g
 - Agar - agar 20,0 g
 - Eau distillée 1 L
 - pH 5,6

Annexe 05 : Les courbes d'étalonnages

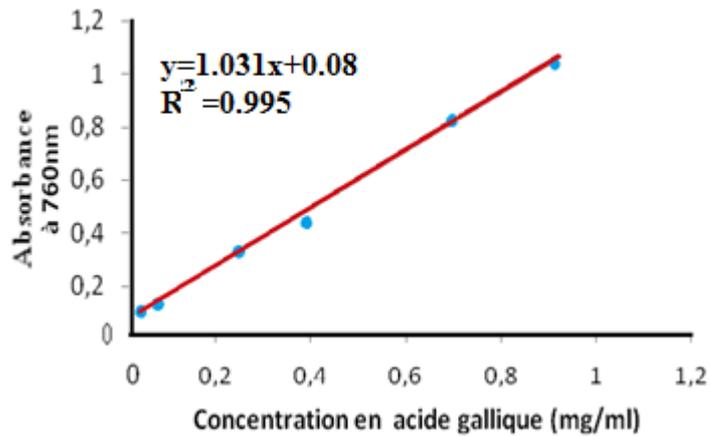


Figure 01 : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique pour le dosage des composés phénoliques

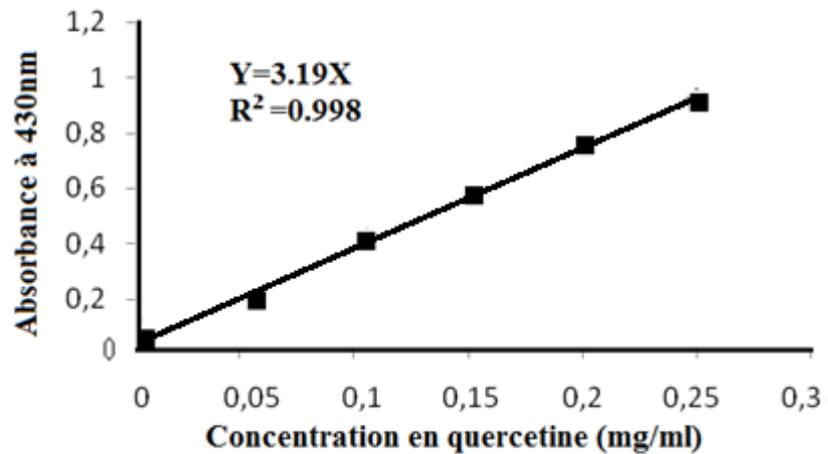


Figure 02 : Courbe d'étalonnage de la quercetine pour le dosage des flavonoïdes

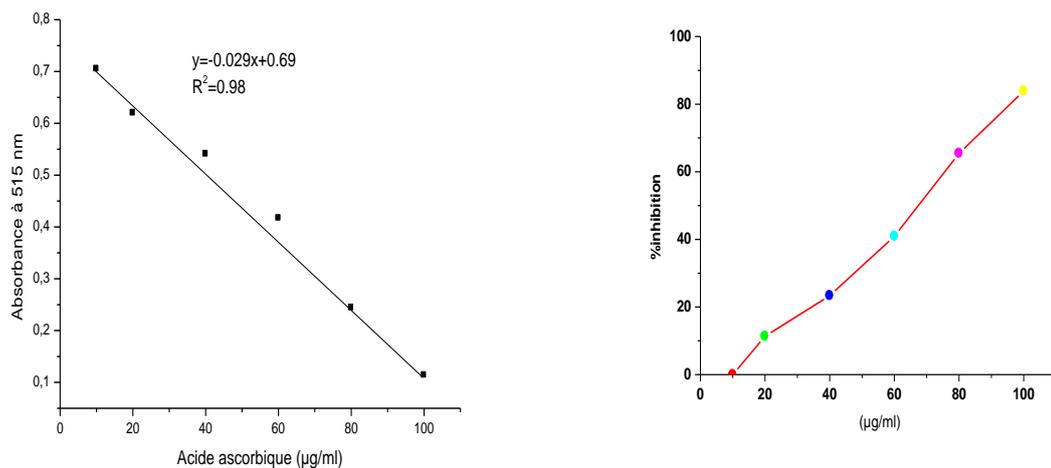


Figure 03 : Courbe d'étalonnage de l'acide ascorbique

Annexe 06 : Evaporation à sec par le retavapor.



Annexe 07 : Microscope électronique à balayage (MEB) couplée à l'analyse chimique (EDS)

