

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de L'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université- Ain Témouchent –Belhadj Bouchaib

Faculté des Sciences et de Technologie

Département Science de La Nature et de La vie



Mémoire de fin d'études

Pour l'obtention du Diplôme de Master en Science Biologique

Option : Biochimie

Thème

Caractérisation et évaluation de quelques activités biologiques des nanoparticules à base des extraits d'une plante médicinale

Présenté Par

Melle : HADJ BOULENOIR Khadidja

Melle : KHITRI Chafika Fatna

Melle : GUERROUMI Marwa

Devante le jury composé de :

Présidente *Melle boudghane stambouli amina MCA* *UAT*

Examinatrice *Melle chibani hiba errahmane MCB* *UAT*

Encadrant *M bennabi farid MCA* *UAT*

Co-encadrant *M Mohamedi walid MAB* *UAT*

Année universitaire : 2022/2023

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Remerciements

*Je remercie **Allah** le tout puissant pour m'avoir donné la force, et la patience afin de pouvoir réaliser ce modeste travail.*

Je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui ont m'aide a le mener jusqu'au bout, et particulièrement.

Merci infiniment à nos chers parents.

*Nous tenons nos sincères remerciements à notre encadreur monsieur « **BENNABI Farid** »*

Enseignant au département de Biologie, Faculté des sciences département de sciences de la nature et de la vie, Université Belhadj Bouchaib, pour avoir accepté de nous encadrons et dirigé ce travail, pour ses conseils scientifiques et pour son aide, son talent, sa motivation et sa foi dans l'action de nous avoir apporté les outils méthodologiques indispensables à la conduit de cette recherche.

Nous remercions également les membres du jury pour l'honneur qu'ils ont accordé en acceptant d'examiner notre travail.

Nous remercions également tous les membres du laboratoire qui nous a beaucoup aidés et les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail que ce soit de loin ou de près et tous les professeurs qui ont contribué à notre éducation et à notre Formation.

Dédicace

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 mes collègues khadidja, marwa, qui ont partagent le travail avec moi.

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

A ma très chers amis : Zahira, qui ma toujours soutenu. A tous mes amis qui me connaisse de près ou de loin.

Chafika

Dédicace

Je dédie ce travail; À l'être le plus cher de ma vie « mon père », pour m'avoir toujours été à mes côtés, me soutenir et m'encourager Que ce travail traduit mon amour, ma gratitude et mon affection À la mémoire de mon père qui est présent, éternellement, dans ma mémoire C'est à lui tout le mérite Que ce travail ait été achevé pour honorer sa mémoire Lui qui a fait de moi la personne que je suis aujourd'hui .

À ma chère mère, source de confiance et d'affection. Que Dieu le tout puissant lui procure santé et longue vie.

À Mes chers frères Mohamed et Abd el-Kader et Abd El-Hak

À Mes chers amies Samah, chaima, et marwa.

Khadija

Dédicace

C'est avec l'aide et la grâce du Dieu que j'ai achevé ce travail

Je me dois d'avouer pleinement ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont soutenue durant mon parcours d'études, qui ont su me hisser vers le haut pour atteindre mon objectif.

C'est avec amour, respect et gratitude que je dédie ce modeste travail:

À mes très chers parents qui m'ont toujours encouragé, pour leurs sacrifices, leurs soutiens et leurs précieux conseils durant toute nous vie. Que Dieu les garde en bonne santé.

À mes supers frères et À mes chères sœurs et

À mes grands-parents.

*À toutes ma familles et À mon cher binôme **chafika et khadidja***

À mes chers amis pour tous les bons moments qu'on a vécus ensemble.

*À toute la promotion **2022**.*

Marwa

Résumé

Le processus de biosynthèse pour la production des nanoparticules est considéré comme un processus durable, respectueux de l'environnement, sans toxines et biocompatible. Ceci peut être synthétisé en utilisant des extraits de plantes comme agents réducteurs et stabilisants et ceci est acceptable sur le terrain.

L'extrait aqueux de *lavandula dentata* a été utilisé pour former des nanoparticules d'argent. Ces particules sont consacrées à diverses études spectroscopiques telles que FTIR, UV-vis, et DRX, et évalué in vitro leur effet antimicrobien par la méthode de diffusion de puits en milieu solide.

Les nanoparticules d'argent synthétisées ont été montrées un effet bactéricide très efficace contre les trois types des bactéries (*Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*).

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, les bio-ingrédients présents dans l'extrait de plante étaient 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.

Mot clés : Argent, Lavandula dentata , nanoparticule, biosynthèse, activité antibactérienne.

Abstract:

The biosynthesis process for the production of nanoparticles is considered to be a sustainable, environ- mentally friendly, toxin-free and biocompatible process. This can be synthesized using plant extracts as reducing and stabilizing agents and this is acceptable in the field.

The aqueous extract of *lavandula dentata* was used to form silver nanoparticles. These particles are devoted to various spectroscopic studies such as FTIR, UV-vis, SEM and DRX, and evaluated in vitro their antimicrobial effect by the solid medium well diffusion method.

The synthesized silver nanoparticles have been shown to have a very effective bactericidal effect against all three types of bacteria (*Escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*). The sum of the results obtained during this study clearly shows that silver nanoparticles have significant potential for the biological activi- ties investigated. As a result, the bio-ingrédients present in the plantextract were effective for the synthesis of Ag nanoparticles with a biological efficiency

which offers the possibility of incorporating it into the composition of food and pharmaceutical products.

Keywords : Silver, lavandula dentata , nanoparticle, biosynthesis, antibacterial activit

Résumé :

الملخص

تعتبر عملية التخليق الحيوي لإنتاج الجسيمات النانوية عملية مستدامة وصديقة للبيئة وخالية من السموم ومتوافقة حيويًا. تم استخدام المستخلص المائي. يمكن تصنيع ذلك باستخدام المستخلصات النباتية كعوامل اختزال واستقرار وهذا مقبول في المجال ، ويتم تقييم DRX و SEM و UV-vis و FTIR لتشكيل جزيئات الفضة النانوية. هذه الجسيمات مكرسة لدراسات طيفية مختلفة مثل ، لقد ثبت أن للجسيمات النانوية الفضية ال مُصنَّعة تأثيرها المضاد للميكروبات في المختبر بواسطة طريقة انتشار البئر الصلب تأتي رَافِعًا جُداً في قتل الجراثيم ضد جميع أنواع البكتيريا الثلاثة (الإشريكية القولونية ، العصوية الرقيقة ، المكورات يظهر مجموع النتائج التي تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة بوضوح أن جسيمات الفضة النانوية لها إمكانات (العنقودية الذهبية كبيرة للأنشطة البيولوجية التي تم فحصها. نتيجة لذلك، كانت المكونات الحيوية الموجودة في المستخلص النباتي فعالة في تخليق الكلمات الرئيسية: ذات الكفاءة البيولوجية التي توفر إمكانية دمجها في تركيبة المنتجات الغذائية والصيدلانية Ag الجسيمات النانوية الفضة، سالفيا فيربيناكا، الجسيمات النانوية، التخليق الحيوي، النشاط المضاد للبكتيريا

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

Partie théorique

Chapitre I : Présentation de la plante étudiée

I. 1. Lavandula dentata

I. 1.1. Etude botanique.....	4
I. 1.2. Répartition et dénomination.....	5
I. 1.3. Composition phytochimiques.....	6
I. 1.4. Effets thérapeutiques.....	6

Chapitre II : Généralités sur les nanoparticules

II. 1. Définition des nanoparticules.....	8
II. 2. Propriétés des nanoparticules d'argent.....	9
a) Propriétés biocides de l'argent.....	8
b) Propriétés physiques et chimiques de l'argent.....	9
c) Propriété désodorisante.....	9
II. 3. Production des nanoparticules d'argents	
II. 3.1. Sources des nanoparticules d'argents.....	9
II. 3.2. Stabilisation des nanoparticules d'argent.....	10

II. 3.3. Méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent.....	10
a) Méthodes physiques.....	10
b) Méthodes chimiques.....	10
c) Méthodes biologiques.....	11
II. 4. Effet toxique des nanoparticules.....	12
II. 5. Applications des nanoparticules.....	12
Partie pratique	

Chapitre III : Matériels et Méthodes

III. 1. Matériels et réactifs.....	15
III. 2. Matériel végétal.....	16
III. 2.1. Récolte et identification du matériel.....	16
III. 3. Méthodes végétal.....	18
III. 3.1. Séchage.....	18
III. 3.2 Test d'humidité.....	18
III. 3.3. Extraction des substances bioactives plante.....	18
a) Préparation des extraits aqueux de la plante.....	18
b) Détermination des rendements d'extraction.....	18
c) Biosynthèse des nanoparticules d'argent.....	21
III. 3.4. Caractérisation des nanoparticules d'argent.....	23
III. 3.4.1. Spectroscopie UV- visible.....	23
III. 3.4. 2. Spectroscopie infrarouge (IR).....	23
III. 3.4.3. Diffraction des Rayons X (DRX).....	23
III. 3.5. Evaluation de l'activité biologique.....	24

III. 3.5. 1. Évaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH.....	24
III. 3.6. Détermination de l'activité antibactérienne.....	26
III. 3.7. Détermination de l'activité anti inflammatoire.....	31
III. 3.7. 1. Évaluation de la toxicité vis à vis des globules rouges.....	34
III. 3.7. 2. Évaluation de l'effet des extraits sur la stabilisation de la membrane des globules rouges.....	34
Chapitre IV : Résultats et discussion	
IV.1. Les activités biologiques.....	37
IV.1.1. Evaluation des activités Antioxydants.....	37
IV. 1.2. Activité du radical DPPH.....	37
IV.2. Evaluation des activités anti inflammatoire.....	42
IV. 2.1 Evaluation de la toxicité des nanoparticules et d'extrait aqueux de lavandula dentata vis-à-vis des globules rouges.....	42
IV. 3. Evaluation de l'activité antibactérienne.....	44
IV. 3.1. Résultat de test aromatoigramme.....	44
Conclusion.	51

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1 : Photo de <i>Lavandula dentata</i>	4
Figure 2 : Morphologie florale de l'épi d <i>Lavandula.d</i>	4
Figure 3 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée a celles des principales structures chimiques et biologiques	8
Figure 4 : Approche physique chimique d'élaboration nanoparticules.....	11
Figure 5 : Photographie des parties aériennes de lavandula dentata	17
Figure 6 : Carte géographique de la région de la récolte (targa).....	17
Figure 7 : Organisme descriptif la préparation de l'extrait aqueux.....	20
Figure 8 : Schéma illustrant le protocole de préparation de nanoparticules d'argent par extrait des feuilles de <i>L. dentata</i>	22
Figure 9 : Mécanisme de réaction de 2, 2-diphényle-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	24
Figure 10 : le test DPPH.....	25
Figure 11 : Souches de références de collection internationale ATCC.....	27
Figure 12 : Une série des différentes concentrations des solutions (AgNPs / l'EQ).....	28
Figure 13 : La zone stérile.....	29
Figure 14 : Des boites de pétries contenant de M-H.....	29
Figure 15 :L'ensemencement des souches testées.....	29
Figure 16 : Déposition des disques à l'aide d'un pince Stérile.....	30.
Figure 17 : l'injection des différentes concentrations à l'aide d'une micropipette.....	30
Figure 18 : Organisme descriptif la préparation des suspensions érythrocytaire.....	33
Figure 19 : Dilutions de (EQ/AgNPS/Diclofénac).....	35
Figure 20 : série de différentes solutions (EQ/AgNPs/Diclofénac) des tests.....	35
Figure 21 : Variation du pourcentage de l'activité antioxydant en fonction de la concentration des nanoparticules.....	37
Figure 22 : Variation du pourcentage de l'activité antioxydant en fonction de la concentration de l'extrait aqueux	38
Figure 23 : Variation du pourcentage de l'activité antioxydant en fonction de la concentration	

d'acide ascorbique.....	39
Figure 24 : Représentation graphique montre la comparaison d'extrait aqueux et des nanoparticules avec l'acide ascorbique par rapport à l'IC 50.....	40
Figure 25 : Evaluation du pourcentage d'hémolyse des Suspensions érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des nanoparticules et d'extrait aqueux par rapport Diclofénac.....	42
Figure 26 : Évaluation des pourcentages d'inhibitions de l'hémolyse des suspensions érythrocytaire en fonction des différentes concentrations en nanoparticules et extrait aqueux de lavandula dentata.....	43
Figure 27 : Résultats l'aromatogramme de AgNPs et l'extrait aqueux de la L.dentata.....	45
Figure 28 : Représentation graphique de l'activité antimicrobienne d'extrait aqueux de la plante lavandula dentata réalisée par la méthode de diffusion sur disque.....	46
Figure 29 : Représentation graphique de l'activité antimicrobienne des nanoparticules réalisée par la méthode de diffusion sur disque.....	47
Figure 30 : Représentation graphique montre la comparaison entre les résultats de l'activité antimicrobienne des nanoparticules et d'extrait aqueux de L.dentata	47

Liste des tableaux :

Tableau 1 : classification botanique de <i>L.dentata</i>	5
Tableau 2 : différentes dénomination de <i>L.dentata</i>	5
Tableau 3 : Propriété physique de l'argent.....	8
Tableau 4 : Exemples des nanoparticules et ses applications	12
Tableau 5 : le matériel utilisé (Appareillage).....	15
Tableau 6 : les réactifs et les produits chimiques.....	16
Tableau 7 : situation géographique de la région de récolte.....	17
Tableau 8 : les souches bactériennes.....	22
Tableau 9 : les valeurs de CI50 de AgNPs et l'extrait aqueux, l'acide ascorbique.....	40

Liste des abréviations

Ag : argent

NPs : nanoparticule

Ag NPs : nanoparticule d'argent

DPPH : Le radicale stable [2,2-diphényle 1-1-picrylhydrazyl]

EAQ : Extrait aqueux

E. coli : Escherichia coli

g : gramme

h : heure

IC50 : Concentration inhibitrice a 50%

Ph : potentiel d'hydrolyse

Min : minute

mm : millimètre

nm : nanomètre

R : Rendement

Tr /min : Tour / minute

UV : Ultra violet

L.dentata : Lavandula dentata

Pa : Pseudomonas aeryginosa

Sa : Staphylococcus aureus

mg/ml :milligramme par millilitre

MH :Mueller Hinton

Introduction générale

Introduction

Depuis la nuit des temps, les chercheurs ont développé d'extraordinaires vertus médicinales que recèlent les plantes, dont la connaissance et l'utilisation thérapeutique sont basées sur l'analyse et l'observation connues sous le nom de la phytothérapie (**Delille, 2013**).

L'utilisation des plantes en phytothérapie est très ancienne est bien connus selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), environ 65 80 % de la population mondiale consomme des drogues les méthodes traditionnelles pour répondre aux besoins des soins de santé primaires, en raison de la pauvreté et du manque d'accès à la médecine moderne (**Jiofuck, Fokunang et al., 2009**).

Aujourd'hui, l'avènement des nanosciences et des nanotechnologies représente l'un des développements les plus prometteurs des sciences physiques, s'intéressant à la conception à la caractérisation, à la production et à l'application de matériaux et de produits qui gagnent en échelle en contrôlant la structure, la forme et la taille à l'échelle nanométrique (1 à 100 nm). Ces matériaux présentent de nouvelles propriétés physicochimiques plus favorables et uniques qui sont assez différentes des mêmes matériaux à l'état brut ou atomique (**Ramsden, 2005**).

Les produits végétaux sont essentiels à la synthèse des nanoparticules (NPs). L'argent (Ag) est le métal de choix parmi les métaux précieux avec des applications potentielles dans les systèmes biologiques, la matière organique et la médecine (**Zargar et al., 2011**).

Par conséquent, cette thèse vise à produire des nanoparticules d'argent par un procédé simple, rapide et propre pour faire face à l'environnement et aux manipulateurs. Pour mieux comprendre l'intérêt des substances bioactives de *Lavandula dentata*, il nous semble utile de réaliser ce travail lié à la synthèse de nanoparticules d'argent à partir de cet extrait végétal.

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention de substances biologiquement actives qui sont à l'origine de plusieurs médicaments modernes car elles sont riches en métabolites secondaires notamment en composés phénoliques riches en substances biologiques bénéfiques.

Notre objectif est l'évaluation de l'activité antibactérienne, l'activité antioxydant et l'activité anti inflammatoire de l'extrait aqueux (les feuilles)et des nanoparticules à base d'extrait aqueux de la plante médicinale *Lavandula dentata*

Chapitre I

Présentation de plante étudiée

I.1. La lavande (*Lavandula dentata*)

I.1.1. Etude botanique

Les espèces de *Lavandula* sont d'importantes plantes ornementales, mellifères et productrices d'huiles essentielles. Le genre *Lavandula*, affilié à la sous-famille des Népétoïdées, est composé de quelques 39 espèces de nombreux hybrides, et près de 400 cultivars enregistrés (Bachiri et al., 2016).

Lavandula dentata, également connue sous le nom de lavande frangée. (Hui et al. ,2019) , de la famille des Lamiacées (Reby,2017) est un arbuste très aromatique aux rameaux dressées, ligneux à la base, qui produit de longues tiges florales (Giuliani et al.,2013) , pouvant atteindre 1 m de hauteur et de largeur (Figure 1)

Les feuilles sont sessiles, étroites, linéaires, épaisses, à bord denté à denté, collantes, longues de 3 cm et enroulées en verticilles sur la tige ligneuse quadrangulaire (Lim,2014) , de couleur vert grisâtre (Giuliani et al. ,2013) Les fleurs se trouvent en grappes serrées dans un épi pédonculé de 2,5 à 5 cm de long (Giuliani et al., 2020), au sommet des longues tiges feuillues grises et minces et se composent de bractées papuleuses bleu-violet et de minuscules fleurs bleu-violet plus pâles (Lim,2014) (Figure 2)



Figure(1) : *L.dentata*



Figure(2) : morphologie florale de l'épi d L.d

Tableau n°1: classification botanique de *L.dentata* (Benabdelkader, 2012)

Règne	Plantae
Embranchement	<i>Spermatophytes</i>
sous Emb	<i>Angiospermes</i>
classe	<i>Dicotylédones</i>
famille	<i>Lamiaceae</i>
Sous famille	<i>Nepetoideae</i>
Genre	<i>Lavandula</i>
Sous Genre	<i>Lavandula</i>
Espèce	<i>L.dentata</i>

1.2. Répartition et dénomination :

La plupart des espèces de lavande provient des régions montagneuses des pays bordant la Méditerranée occidentale (Catherine et al., 2001), les îles de l'Atlantique, la Turquie, le Pakistan et l'Inde.

En outre, ils sont originaires du nord, de l'est et du sud de l'Afrique, de la péninsule arabique, de la Bulgarie et de la Russie.

Aujourd'hui, les espèces de lavande sont largement cultivées dans le monde entier, notamment en France, en Bulgarie, en Russie, en Italie, en Espagne, en Angleterre, aux États-Unis et en Australie (Nuri et al., 2015) , Le nom de cette plante varié d'un pays a un autre comme le montre le **Tableau n°2** :

Nom latin	Lavandula dentata
Anglais	Lavender
Français	Lavande
Kabyle	Amezir
Arabe	Khzema

. 1.3. Composition phytochimiques

Des études phytochimiques qualitatives permettent de détecter les différentes familles chimiques qui composent les plantes ; les tests sont basés sur l'intensité du précipité et de la turbidité, la coloration étant proportionnelle à la quantité de substances recherchées. **(Bachiri et al., 2016)**

De plus, avons-nous procédé à la caractérisation des métabolites secondaires pharmacologiquement significatifs tels que les stérols et les triterpènes, les tanins, les flavonoïdes, les alcaloïdes, les saponosides et les composés réducteurs.

Ainsi, la présence des alcaloïdes est mise en évidence grâce aux réactifs de Mayer et de Dragendorff ; celle des tanins, par une solution aqueuse de trichlorure ferrique (FeCl₃) et des tanins galliques et catéchiques, par le réactif de Stiasny. **(Bachiri et al., 2016)**

Les composés appartenant au groupe des flavonoïdes sont révélés par la réaction à la cyanidine. La présence des dérivés anthracéniques est révélée à l'aide d'un résidu de poudre de la plante épuisée par chloroforme (CHCl₃), puis, une solution d'hydroxyde d'ammonium (NH₄OH) diluée à 50 % qui, elle, permet de mettre en évidence les deux formes hétérosidiques (Ohétérosides et C-hétérosides) . **(Bachiri et al., 2016)**

1.4. Effet thérapeutiques

Lavandula dentata est utilisé pour les douleurs de la rate. *Carum carvi* est le plus couramment utilisé pour traiter les troubles digestifs. **(Oulidi et al. ,2016)**

Lavandula dentata utile pour la rétention d'urine, l'élimination des calculs rénaux et urétraux cicatrisation des plaies, rhumatismes.

De plus, L'utilisation de l'extrait de *Lavandula dentata* est une tentative d'améliorer les crises d'asthme et leurs effets ainsi que d'augmenter les défenses de l'organisme contre l'asthme. **(Aziza et al. ,2021)**

Chapitre II

Généralité sur les nanoparticules

Chapitre 2 : Généralités sur les nanoparticules

II.1. Définition des nanoparticules

Les nanoparticules (NP) sont des structures composées de centaines à des milliers d'atomes. Du fait de leur taille (1 à 100 nanomètres) (Chuto, 2010), ils sont plus grands que les atomes et plus petits que les cellules.

De plus, une masse moléculaire atomique ou microscopique forme des nanoparticules, constituées d'un million d'atomes liés entre eux de manière presque sphérique avec un rayon inférieur à 100 nm.

L'argent est l'un des métaux essentiels à la transition, blanc et brillant possédant une conductivité électrique et thermique élevée, Il est utilisé sous de nombreuses formes sous forme de pièces de monnaie, de récipients, de solutions, de feuilles, de sutures et de colloïdes sous forme de lotions, et pommades, etc. (Firdhouse et al., 2015).

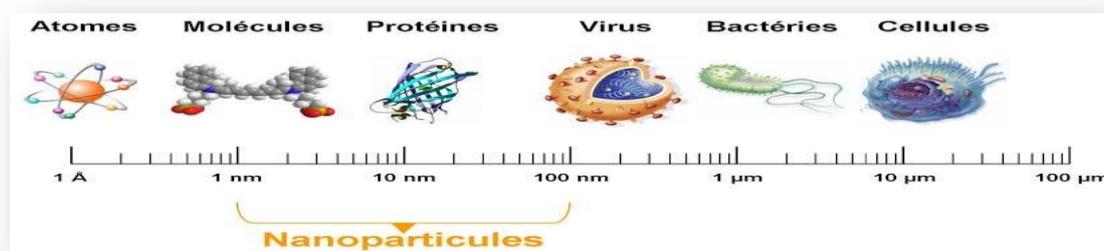


Figure 3 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celles des principales structures chimiques et biologiques (Pierre et Marie Curie, 2016)

II. 2. Propriété des nanoparticules d'argent :

a) propriété biocide de l'argent :

Les propriétés bénéfiques de l'argent pour limiter la propagation des infections et améliorer l'hygiène quotidienne sont connues et utilisées depuis plus de 7000 ans (Lansdown, 2002), (Phung, 2006). Les Romains utilisaient le nitrate d'argent, sans connaître le processus d'action, pour traiter les blessures, les brûlures et les ulcères (Klasen, 2000). Par la suite, ce composé est également utilisé pour prévenir la

contamination de l'eau ou pour éviter les infections oculaires chez les nourrissons par application d'AgNO₃ (Lansdown ,2002). Ses qualités antimicrobiennes, attribuées au relargage d'ions Ag , ont été admises dès l'identification des bactéries comme agents responsables d'infections (Klasen ,2000).

b) Propriétés physiques et chimiques de l'argent :

L'argent est un métal assez ductile et surtout malléable, apprécié pour son éclat blanc spécifique, qui est attaqué par les sulfures contenus dans les aliments, Les sulfures présents dans l'atmosphère réagissent avec l'argent pour former Ag₂S. Le ternissement est accéléré par la présence de cuivre dans les alliages.

Tableau n°3: Propriété physique de l'argent (Djeghboub ,2010)

Etat ordinaire	Solide
Densité (g/cm ³)	10,5
Rayon atomique nm	0,153
Énergie de fusion	104, 2 J·g-1
Energie de vaporisation	2, 636 kJ·g-1
Vitesse du son	2 600 m·s-1 à 20 °C
Electronégativité	1,93

c) Propriété désodorisante :

Le nano-argent est également intégré dans les réfrigérateurs pour ses propriétés désodorisantes.

Nous avons choisi d'exclure les effets bénéfiques relatifs à ces propriétés, été pour plusieurs raisons. (Rémy Tello et al, 2011).

II. 3. Production des nanoparticules d'argents

II. 3.1. Sources des nanoparticules d'argents

Les nanoparticules se régénèrent naturellement (ex. éruption volcanique, érosion) ou bien par l'intervention humaine (ex. émissions et rejets industriels, fabrication contrôlée) (Handy et al.,2008). Les nanoparticules d'argent manufacturées sont produites soit à partir du métal naturel qui est physiquement réduits en particules ultrafines, soit à partir de l'argent ionique qui est électrochimiquement réduit puis stabilisé en particules (El Badawy et al.,2010).

II. 3.2. Stabilisation des nanoparticules d'argents

Les nanoparticules de métaux nobles ont été largement étudiées pour comprendre et appliquer leurs réponses plasmoniques, lorsqu'elles sont liées à un rayonnement électromagnétique, dans des domaines de recherche tels que la détection, la photocatalyse, l'électronique et la biomédecine.

Ainsi, la stabilisation des nanoparticules fabriquées est essentielle pour maintenir le comportement plasmonique souhaité (**Kang et al., 2019**).

II.3.3 Méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent :

Les nanoparticules sont synthétisées selon différentes approches (figure4) essentiellement par :

➤ la méthode ascendante, ou « bottom up » :

les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule (hydrolyse ou condensation d'oxydes).

➤ la méthode descendante ou « top-down » :

Une grande structure devient graduellement progressivement plus dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations (broyage). (**Marie-Anne, 2014**)

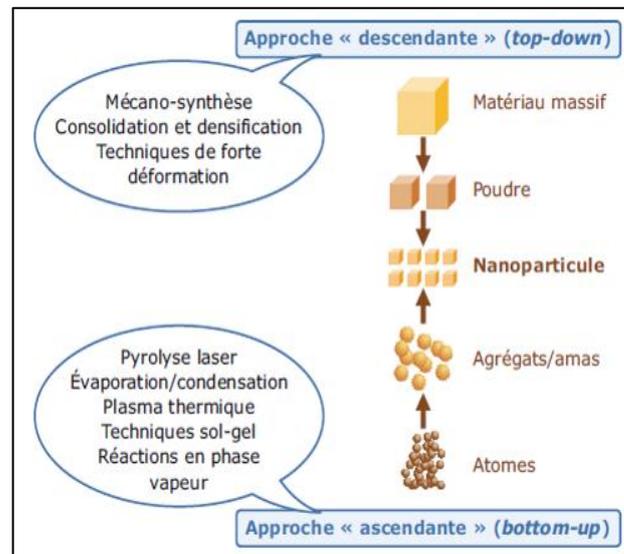


Figure 4 : Approche physique chimique d'élaboration nanoparticules (Madhumitha et al., 2013)

a) Méthodes physiques :

selon les procédés physiques actuels, les nanoparticules sont généralement formées par évaporation-condensation.

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

Les nanoparticules sont obtenues par refroidissement très rapide de la vapeur métallique. Ce processus peut produire un très grand nombre de particules rapide de la vapeur métallique. (Guitou, 2014).

b) Méthodes chimiques :

Principaux procédés chimiques:

- Les réactions en phase vapeur (carbures, nitrures, oxydes, alliages métalliques), Les réactions et les précipitations en milieu liquide (la plupart des métaux et oxydes).
- Les réactions en milieu solide (la plupart des métaux et oxydes).
- Les techniques sol-gel (la plupart des oxydes).
- Les fluides supercritiques avec réaction chimique (la plupart des métaux, oxydes et quelques nitrures)
- Les réactions par coprécipitation chimique ou hydrolyse (métaux et oxydes métalliques) (Ostiguy, 2010).

C) Méthode biologique :

la réduction biologique est développée comme une méthode prometteuse en raison de ses avantages particuliers, 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 (Nair S et al,2009), des enzymes (Willner,2006) et des plantes ou des extraits de plantes (Shankar SS et al.,2004)

II. 4. Effet toxiques des nanoparticules

la toxicité est déterminée par de nombreux facteurs, notamment la taille des particules, le type de matériau de revêtement et la structure morphologique. De nombreux rapports ont démontré que la cytotoxicité des AgNPs dépend de la taille (Zhang et al., 2018).

Ainsi, L'effets néfastes de l'argent sur l'homme, L'argent sous forme de nanoparticules peut pénétrer dans le corps humain par différentes voies. Après ingestion ou contact dermique en présence d'une lésion cutanée, les nanoparticules métalliques peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et/ou lymphatique et s'accumuler dans les organes provoquant une perte d'identité cellulaire (Saulou ,2009)

La dangerosité des nanoparticules vient principalement de leur forme et de leur taille, car elles peuvent être facilement inhalées et interagir avec les voies respiratoires, puis cardiovasculaires (Saulou ,2009).

II. 5. Applications des nanoparticules :

Tableau n°04 : Exemples des nanoparticules et ses applications

Nanomatériaux	Applications
Argent	Déodorants dentifrice agent de dépollution des eaux et des sols encrent habillement
Dioxyde de titane	Bêton, ciment, crème de soin crème solaire agents de dépollution des eaux et des sols peintures habillement
Noir de carbone	Maquillages, batterie, peinture, habillement

Nanotube de carbone (NTC)	Cellule photovoltaïque, batterie, peinture, habillement
Fullerènes	Crème de soin vectorisation de médicaments, de Protéines, de gènes pneumatiques
Oxyde de zinc	Conditionnement et emballage, plastique, crème De soin, cellule photovoltaïque, peinture
Silice amorphe	Béton, dentifrice, peinture, habillement
Argile	Conditionnement et emballage plastique, béton, Crème de soin, maquillage, habillement
Oxyde ferrique	Maquillage, agents de dépollution des eaux et des Sols, peintures, détection, marquage et imagerie biologique

Chapitre III

Matériels et Méthodes

Introduction

Ce travail a été réalisé au niveau de laboratoire pédagogique de Département De Science de la Nature et de la Vie de l'Université Belhadj Bouchaib (Ain témouchent).

Notre travail consiste à synthétiser des nanoparticules d'argent (NPsAg) par la méthode de bioréduction des ions d'argent par les biomolécules de l'extrait aqueux de la plante *lavandula dentata*. Ainsi, nous tenterons d'examiner le rôle des nanoparticules synthétisés dans l'amélioration des activités biologiques.

La recherche a trouvé des résultats, dont le plus important est que les feuilles de *lavandula dentata* sont une excellente source de production de nanoparticules d'argent, faciles à appliquer et à former, respectueuses de l'environnement et leurs composants sont sans danger pour l'environnement. La formation de nanoparticules d'argent a été confirmée par le changement la couleur de la solution vers le marron foncé et L'aspect morphologique, la disposition des nanoparticules, la taille et la densité ont été examinés avec des différentes techniques d'analyse (UV-Vis, DRX et FTIR).

III.2. Matériel Végétal

III.2.1. Récolte et identification du matériel végétal

La partie aérienne de *Lavandula dentata* illustré dans la figure ci-dessous, ont été récoltés au mois de février 2022 dans la région de Targa de wilaya d'Ain Témouchent. La plante a été choisie sur la base de leur rentabilité, disponibilité et propriétés médicinales.



Figure n°5 : Photographies des parties aériennes de *Lavandula dentata*.

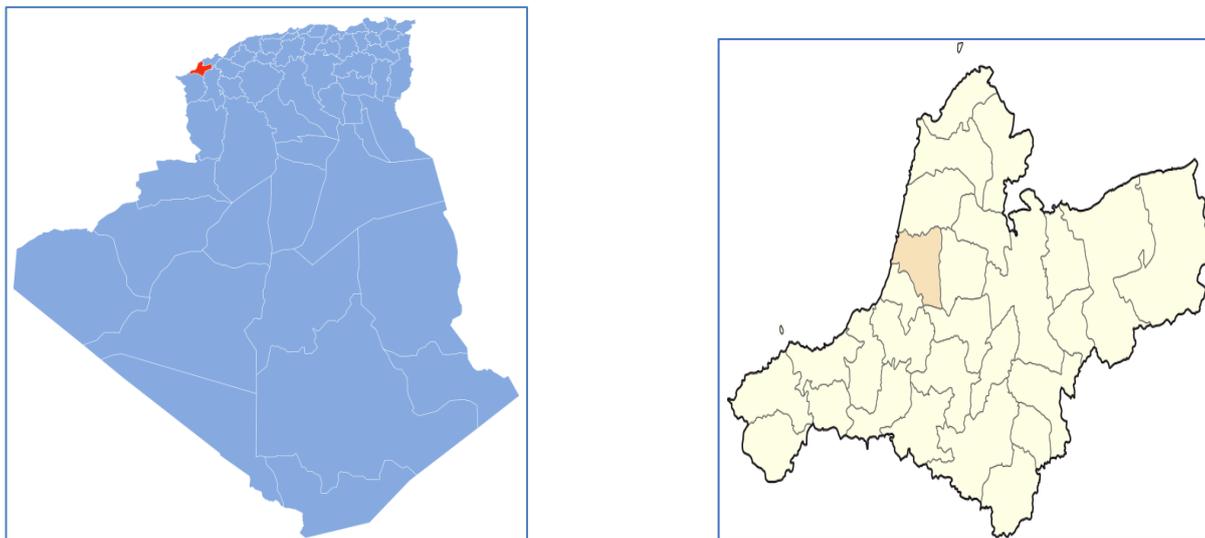


Figure n°6 : Carte géographique de la région de la récolte (Targa)

Région	Altitude	Latitude	Longitude	Etage bioclimatique
Targa	34m	35° 25'7'' Nord	1° 10' 39'' Ouest	Semi-aride sec et froid

Tableau n°7 : situation géographique de la région de récolte.

III.3. Méthodes

III.3.1. Séchage

La partie aérienne de la plante fraîchement récoltée, est utilisée pour le test de l'humidité à température ambiante pendant quelques jours. Une fois séchées, ces dernières ont été réduites.

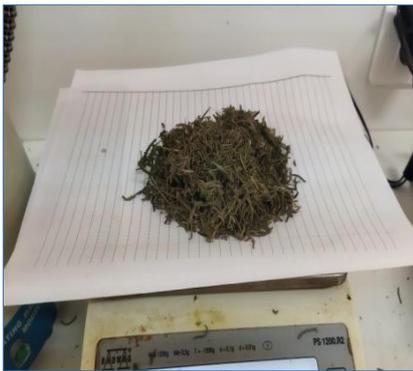
III.3.2. Extraction des substances bioactives

a) Préparation d'extraits aqueux des feuilles *d'Avandula dentata*

50g de biomasse végétale été portés par chauffage à reflux dans 500ml d'eau distillée à 60 ° C pendant 15 minutes, et filtré à l'aide du papier filtre pour éliminer toutes les particules, puis séché à l'étuve à 40 °C. Pour obtenir l'extrait sec La sauge s'évapore complètement après grattes avec une spatule pour obtenir

une poudre.

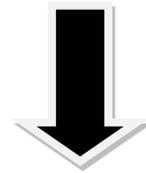
L'extrait aqueux a été préparé par chauffage à reflux de 5 g de biomasse (feuilles) dans un 50 ml de l'eau distiller à 60 °C pendant 15 minutes, et filtré à l'aide du papier filtre pour enlever toutes les particules. La solution marron claire pâle a été obtenue et stockée à 4-8 °C.



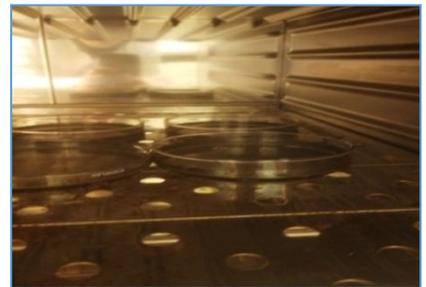
Plante séchée



Montage à reflux



Extrait séché dans l'étuve



L'extrait

Figure n° 7 : Organisme descriptif la préparation de l'extrait aqueux

C) Biosynthèse des nanoparticules d'argent :

Un extrait aqueux des feuilles *Avandula dentata* a été utilisé pour la synthèse des AgNPs, et d'un autre côté, une solution aqueuse d'une couleur transparente a été préparé avec d'AgNO₃ agité avec l'eau distillé à l'aide de mélange magnétique jusqu'à ce que la totalité du nitrate soit dissoute.

Brièvement, dans protocole typique de nanoparticules d'argent, ajouté goutte à goutte 20 ml d'extrait dans les 90 ml de 5mM de solution de nitrate d'argent. Le mélange réactionnel a été maintenu à 60 °C pendant 15 minutes sous agitation à 500 rpm sur une plaque agitatrice magnétique pendant 24h. La solution incolore de nitrate d'argent est passé au marron foncé, la bioréduction complète d'AgNO₃ aux ions Ag⁺ qui a été confirmée par le changement de la couleur et la formation des nanoparticules a été contrôlée par l'utilisation de spectrophotomètre UV-Vis. Après la synthèse des AgNPs, la solution content des nanoparticules a été centrifugée à 5000 tr/min éliminer les impuretés pour obtenir de la poudre d'AgNPs pure.

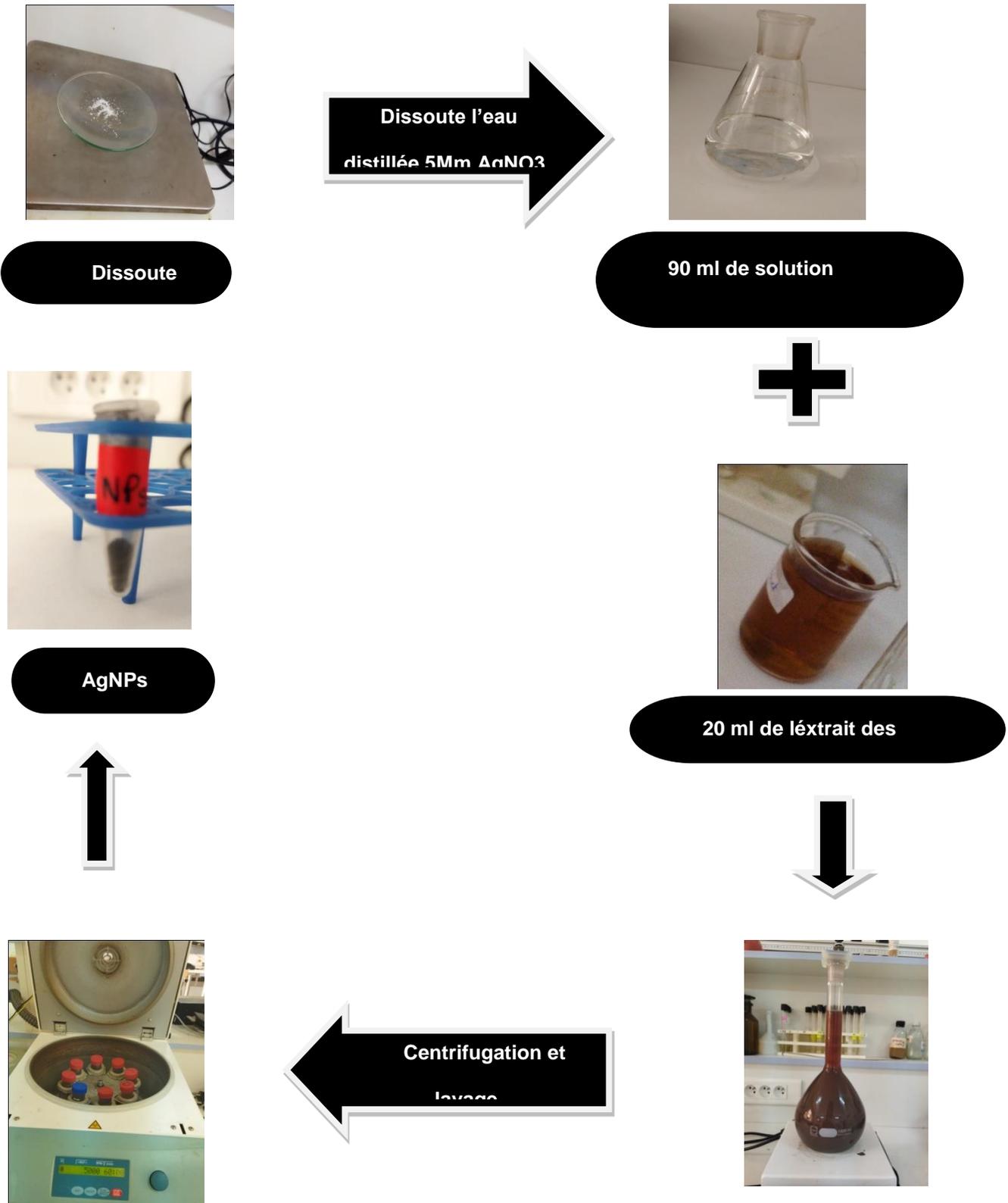


Figure n°8 :Schéma illustrant le protocole de préparation de nanoparticules d'argent par extrait des feuilles de *L. dentata*.

III.3.4.Caractérisation des nanoparticules d'argent

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

Les AgNPs biosynthétisés ont été caractérisés par spectroscopie par la bande de résonance plasmonique de surface en utilisant :

III.3.4.1.Une spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-Visible est une technique très utilisée pour les substances organiques et minérales, elle repose sur la transition d'électrons de valence qui passent de l'état fondamental à l'état excité grâce à une onde électromagnétique.

Les mesures spectrophotométriques ont été réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau-visible (Thermo) pour les deux extraits préparés (AgNPs et extrait) utilisez une cuve en quartz de 10mm de trajet optique. L'enceinte du spectrophotomètre est thermostatée à 25°C. L'analyse a été effectuée entre 200 et 700 nm. L'appareil est connecté à un microordinateur. Le logiciel UV-Probe, permet l'enregistrement et la visualisation des spectres des échantillons analysés.

III.3.5. Evaluation de l'activité biologique

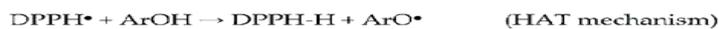
III.3.5.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH

Le DPPH c'est un composé chimique (2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle) parmi les premiers radicaux libres utilise pour étudier la relation structure -activité antioxydant en raison de sa stabilité en forme radicale libre.

L'évaluation de l'activité anti-radicalaire a été réalisée par le teste DPPH déterminée décrits la première fois par (**Brand-Williams ,1996**)

Le mécanisme général de cette réaction est reposé principalement sur la décoloration des solutions préparée (AgNPs/l'EQ) sa réduction du radical (DPPH) ayant une couleur violette par les antioxydants en lui transférant un proton, alors il se transforme en en une molécule stable DPPH-H de couleur jaune. L'absorbance est mesurée par spectrophotomètre à 517 nm. Une faible absorbance indique une meilleure activité anti- radicalaire.

Chemical reactions:



where ArOH: phenolic AO

Mechanism of reaction: HAT

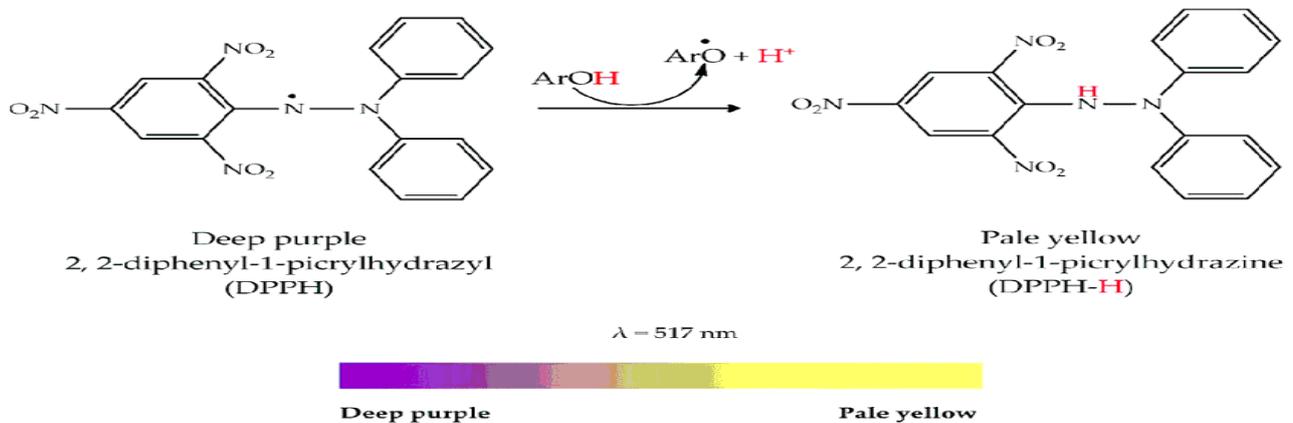


Figure n° 9 : Mécanisme de réaction de 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)(Bibi Sadeer, Montesaño et al., 2020)

Mode opératoire

L'activité antiradicalaire de DPPH a été déterminée en se basant sur les essais décrits par Brand-Williams avec quelques modifications dans un volume de 1 ml de différentes concentrations de chaque extrait est ajouté à 1 ml de la solution méthanolique du DPPH (0,028 g/l) fraîchement préparée. En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 1ml du méthanol avec 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée. Le mélange est ensuite soumis à une agitation, après on laisse d'incuber à l'obscurité pendant 30 min et à la température ambiante, puis la lecture des absorbances est effectuée à 517 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV visible.

En ce qui concerne le contrôle négatif, ce dernier est préparé en parallèle en mélangeant 1ml du méthanol avec 1 ml d'une solution méthanolique de DPPH à la même concentration utilisée.



Figure n°10 : Le test DPPH

Le pourcentage d'inhibition (PI) est calculé selon l'équation suivante :

$$\text{PI}\% = \frac{[\text{Abs contrôle} - \text{Abs extrait}]}{\text{Abs contrôle}} \times 100$$

Les valeurs de l'EC50 ont été déterminées graphiquement par régression linéaire.

III.3.6. Détermination de l'activité antibactérienne

Le principe de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de l'extrait aqueuse de feuille de *lavandula dentata* et les nanoparticules d'argent à base d'extrait aqueux des feuilles de la plante étudiée in vitro sur quatre souches microbiennes par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

Cette méthode est pour vérifier la sensibilité et la résistance de certaines souches microbiennes.

Cette activité est déterminée par mesure du diamètre de la zone d'inhibition de la croissance bactérienne

qui apparaît autour des disques contenant un produit actif.

Les souches bactériennes pathogènes

L'étude a été réalisée sur quatre souches bactérienne appartenant à la collection ATCC (American type culture collection), qui ont été fournies par le laboratoire de recherche de l'université de Ain tèmouchent Les souches qui ont été choisies sont les suivantes :

- **Des Bactéries à gram négatif :**
 - ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922
 - ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 22
- **Des Bactéries gram positif :**
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
 - ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 43300

Tableau n°8: les souches bactériennes

Nom des souches	N°ATCC	Type	Maladie provoquée
<i>Escherichia coli</i>	25922	Gram négative	Les infections: urinaires, méningites
<i>Pseudomonas saeruginosa</i>	A22	Gram négative	Les infections: pulmonaires, urinaires
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	Gram positif	Les infections : cutanées, osseuses.
<i>Staphylococcus aureus</i>	43300	Gram positif	Les infections : Toxi-infection alimentaire, entérocolites aigues.

- **Conservation des souches**

Les souches microbiennes identifiées précédemment sont conservées dans des tubes stériles contenant 10ml de la gélose de M-H à 4°C.



Figure n°11 : Souches de références de collection internationale ATCC.

Préparation des suspensions bactérienne

Pour l'obtention d'une culture pures les souches sont alors repiquées à partir des boîtes de conservation dans le BMH (Bouillon Muller-Hinton), puis incubée à 37°C pendant 18 h pour vérifier leurs prêté et pour favoriser leur croissance bactérienne.

Ajustements de la charge microbienne

La densité optique (DO) 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- 0.1] l'équivalent de 10 UFC/ml pour les bactéries (**Tenfen et al. ,2017**). Après 18h, La lecture de la DO pour chaque souche.

➤ Préparation du milieu de culture

Pour réaliser l'activité antibactérienne ont utilisé :

Bouillon Mueller-Hinton (BMH) : ce milieu il est comme un milieu de base pour préparer tout inoculumbactérien.

Milieu Muller Hinton MH : le milieu de référence le plus utilisé pour les tests de la sensibilité aux antimicrobiens est la gélose nutritive Muller Hinton.

- Nous avons pesé 17,5g de gélose Mueller Hinton, ajouté 500 ml d'eau distillée, et mis Chauffer la solution dans l'agitateur.

➤ Préparation des échantillons

Préparation des concentrations de l'AgNPs

Une série des différentes concentrations des AgNPs a été réalisée avec un solvant organique Diméthyl sulfoxyde (DMSO) en vue d'obtenir un mélange homogène à différentes concentrations **12,5mg 25mg et 50mg** et pour l'homogénéiser le mélange on fait agitation à l'aide de vortex.

Préparation des concentrations de l'extrait aqueux

Pour l'extrait aqueux, on fait préparer trois échantillons **12.5mg 25mg et 50mg** d'extrait aqueux sec des feuilles de *Lavandula dentata* dans 1ml de DMSO puis mélange les solutions préparées par un vortex.



Figure n°12 : Une série des différentes concentrations des solutions (AgNPs / l'EQ).

➤ **Préparation des disques**

On utilise des disques à partir de papier Whitman de 6mm. Ces disques doivent avoir un contour régulier pour fournir des zones d'inhibition facilement mesurables. Ceux-là stériliser les disques en autoclave à 120°C pendant 20 minutes.

➤ **Ensemencement**

Dans un milieu stérile, à partir des souches stockées, l'ensemencement se fait à 4 boîtes de Pétri étiquetées dans un milieu contenant de l'agar M-H puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

Pour éviter la contamination du manipulateur et de la paillasse on va tremper un écouvillon stérile dans la suspension microbienne.

A l'aide de l'écouvillon, on a ensemencé les boîtes délicatement.



Figure n° 13: La zone stérile.

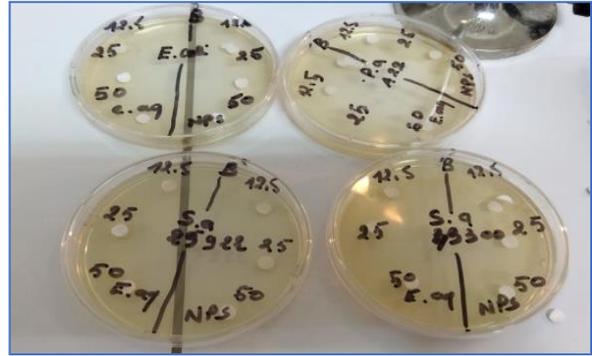


Figure n° 14 : Des boites de pétries contenant

DE M-H



Figure.n°15:L'ensemencement des souches testées.

Application des disques

A l'aide d'une pince bactériologique, les disques sont déposés chaque disque à la surface des boîtes préalablement ensemencées, six disques sont déposés dans chaque boîte. Ensuite à l'aide d'une micropipette nous injectons un volume de 20 μ l chaque échantillon dans les disques, après elles sont fermées et laissées au réfrigérateur pendant 20 min puis mise dans l'étuve à 37°C pendant 24h pour incubation.



Figure n°16 : Déposition des disques à l'aide d'un pince Stérile.



Figure n°17 : l'injection des différentes concentrations à l'aide d'une micropipette.

➤ **L'aromatogramme**

L'aromatogramme est une méthode de diffusion sur disque (**Essawi et Srour .,2000**). Le but de cette méthode est de mettre en évidence l'activité antimicrobienne des différents extraits.

Cette méthode a l'avantage de s'appliquer à un très grand nombre d'espèces bactériennes et d'avoir été largement utilisée, il y a une cinquantaine d'années à l'échelle mondiale. Elle consiste, tout simplement, à utiliser des disques de papier imprégnés des différents produits à tester.

➤ **Incubation et Lecture**

Après incubation de 24 heures, les résultats sont observés, les extraits se traduisent par l'apparition autour du disque d'une zone circulaire transparente correspondant à l'absence de la croissance et donc la zone d'inhibition de principe actif. En mesurant les zones d'inhibition à l'aide d'une règle graduée (millimétrée). Cette zone d'inhibition sera comparée à une échelle d'estimation de l'activité antibactérienne (**Djenadi, Micolau et al., 2011**). Ils ont classé le diamètre des zones d'inhibition (DZI) de la croissance microbienne comme suit (**Ben Hassine, Ben Ismail et al., 2012**)

- Non sensible (-) : $D \leq 8$ mm
- Sensible (+) : $9 \leq D \leq 14$ mm
- Très sensible (++) : $15 \leq D \leq 19$ mm
- Extrêmement sensible (+++) : $D \geq 20$ mm

III.3.7. Détermination de l'Activité anti-inflammatoire :

Principe de l'expérience :

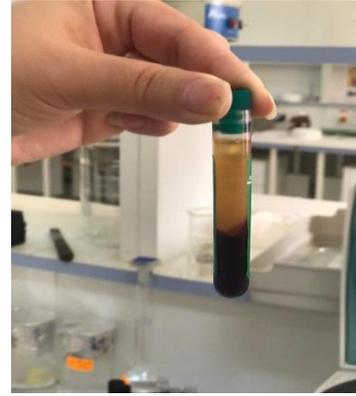
Dans notre recherche, l'activité anti-inflammatoire *in vitro* est évaluée par deux tests dont le premier est le test de stabilisation membranaire par la chaleur et le deuxième est le test d'hémolyse en se basant sur la méthode suivie par Shinde et ses collaborateurs. (**Shinde et al., 1999**).

L'activité anti-inflammatoire de l'extrait aqueux de la partie aérienne de *lavandula dentata* sera réalisée *in vitro* en cette recherche, la plante sera réalisée *in vitro*. Cette procédure expérimentale est basée sur l'utilisation des membranes de globules rouges. En particulier, ces cellules représentent des similitudes avec certaines membranes cellulaires de notre corps, telles que lysosomes. Evaluation du degré d'activité anti-inflammatoire des composés EQ (extrait aqueux) de la partie aérienne

de lavendula dentata par stabilise les membranes cellulaires en présence d'agents hémolytiques, selon la méthode utilisée par Shinde et ces collaborateurs est légèrement modifiée. (Shobana et Vidhya. ,2016).

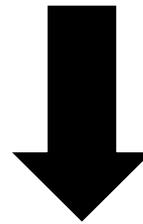
Préparation de la suspension érythrocytaire

On va prélever dans un tube héparinisé environ 6ml de sang frais sur un volontaire qui ne prenait pas d'antibiotiques Médicaments inflammatoires non stéroïdiens pendant deux semaines consécutives avant le traitement échantillon. Les échantillons ont été prélevés au niveau de laboratoire universitaire de biologie de Belhadj Bouchaib d'Ain Témouchent. Le sang frais a été centrifugé à 3000 rpm pendant 10 min retirer le surnageant et récupéré le culot a été lavé trois fois avec l'eau physiologique jusqu'à l'obtention d'un surnageant clair, le volume sanguin à 30% (v/v) mesuré et reconstitué à 10% (v/v) en suspension avec l'eau physiologique.



Le Sang

**Le sang après la
centrifugation**



**Suspension
érythrocytaire**

Figure n°18 : Organisme descriptif la préparation des suspensions érythrocytaire.

III.3.7.1. Evaluation de la toxicité de l'extrait vis-à-vis des globules rouges

Le principe de test de toxicité

Dans notre recherche le test de toxicité est très important, a été réalisé par préparation des différentes concentrations à utiliser.

Mode opératoire

En effet, on mélange 1,6ml de différentes concentrations des trois extraits à tester avec un volume de 0,4 ml de suspension de globules rouges à 10 %.Le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min. Auquel on a ajouté dans un tube sec 1,6 ml d'eau physiologique ou bien l'eau distillé avec 0,4 ml de la suspension a été utilisé comme un contrôle pour vérifier l'état des globules rouges ou le 100 % d'hémolyse. Après incubation des tubes et récupération du surnageant par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min. La mesure de l'absorbance du surnageant a été effectuée à 560nm, à l'aide d'un spectrophotomètre.

III.3.7.2. Evaluation de l'effet des extraits sur la stabilisation de la membrane des globules rouges

Le principe de teste de stabilisation

Ce teste base sur l'effet des extraits de la plante étudiée sur la stabilisation des érythrocytes, après induction de l'hémolyse par une solution hypotonique associée à une température élevée, selon le protocole de (**Ganesh et al., 2013**).

Mode opératoire

Ce test a été réalisé par préparation de deux séries de tubes à hémolyse, à l'aide d'une micropipette on met un volume de 0,5ml d'extraits avec un volume de 1,5 ml du tampon phosphate (0,15 M, pH 7.4) et 2 ml de la solution hyposaline (Nacl à 0.36%) la solution préparée a été mélange par le vortex et incubés à 37°C pendant 20 min. Par la suite, ont rajouté un volume de 0,5ml de la suspension des érythrocytes (10%) dans un chaque tube, enchainé d'une incubation, à 56°C pendant 30min, les tubes ont été mis dans de l'eau froide pendant 20 min. Après l'incubation des tubes on récupère le surnageant par la centrifugation à 3000rpm pendant 5 min. La mesure de l'absorbance du surnageant a été effectuée à 560nm, à l'aide d'un spectrophotomètre. De la même façon un tube contenant un volume de 2ml de solution hyposaline et 2ml du tampon et 0,5 ml de la suspension de globules rouges et 0,5 ml d'eau physiologique a été utilisé comme un contrôle positif.

Calcule le pourcentage d'hémolyse

Le pourcentage d'hémolyse a été calculé selon l'équation suivantes :

$$\text{d'inhibition de l'hémolyse} = [(AC - At.) / AC] * 100\%$$

Ac : absorbance de control

At : absorbance de l'échantillon (test).

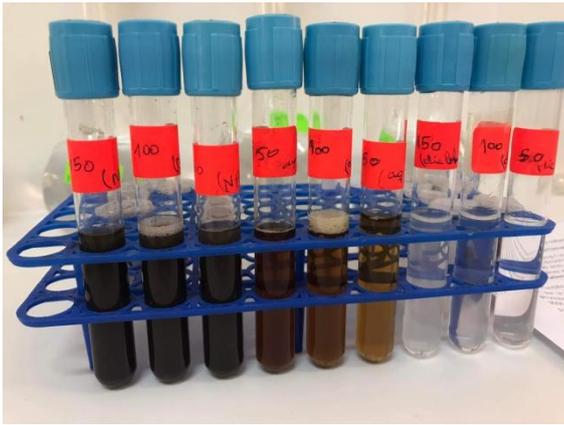


Figure n°19 : Dilutions de (EQ/AgNPS/Diclof2nac).

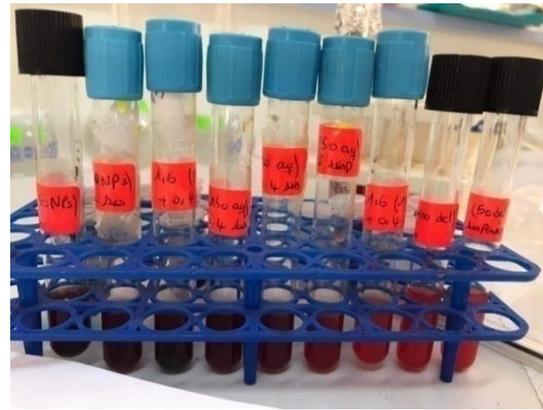


Figure n°20 : série des différents solutions
EQ/AgNPs /Diclofénac) des tests

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Les activités biologiques

IV. 1.1. Evaluation de L'activité anti-oxydante

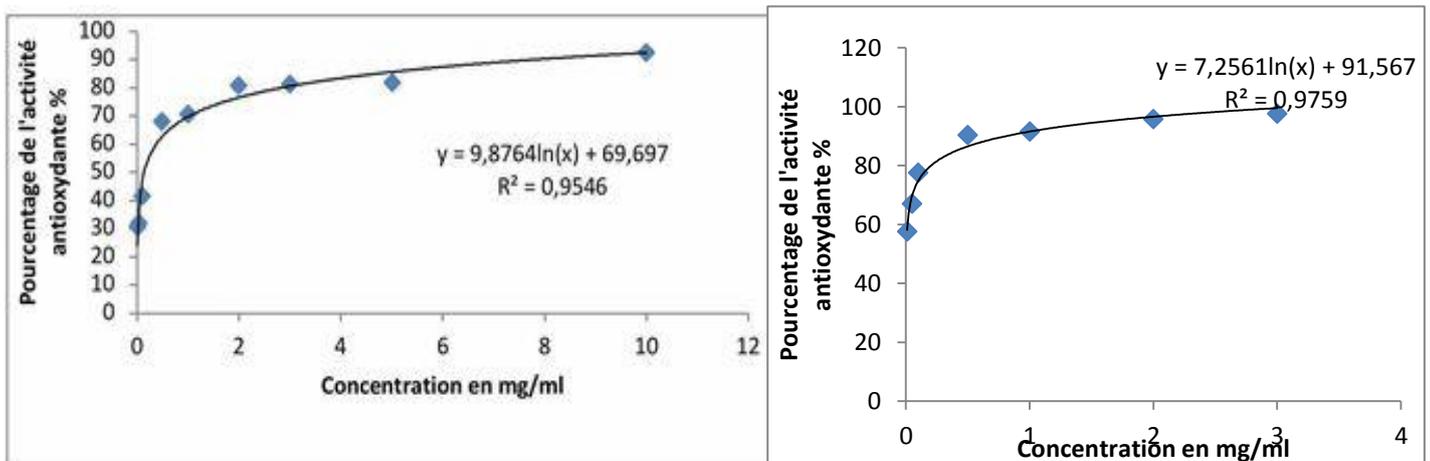
IV. 1.2 Activité du radical DPPH

Plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer son activité antioxydant complète des tissus végétaux, car il existe différents antioxydants et radicaux libres.

Les activités anti oxydantes de l'extrait aqueux de feuilles de *lavandula dentata* et des AgNPs ont été déterminé par l'activité de piégeage du DPPH, l'acide ascorbique a été utilisé comme étalon pour préparer la plage d'étalonnage. Ce radical libre est stable et la capacité des antioxydants à donner des atomes d'hydrogène est La réduction de la coloration des radicaux libres a ensuite été contrôlée avec un spectrophotomètre UV visible à 517 nm. La gamme a été préparée en utilisant l'acide ascorbique comme standard étalonnage.

Calcul de CI50

D'après la figure 21 on peut déterminer IC 50 des nanoparticules : $0,0056 \pm 1,7682 \pm 0,3391$



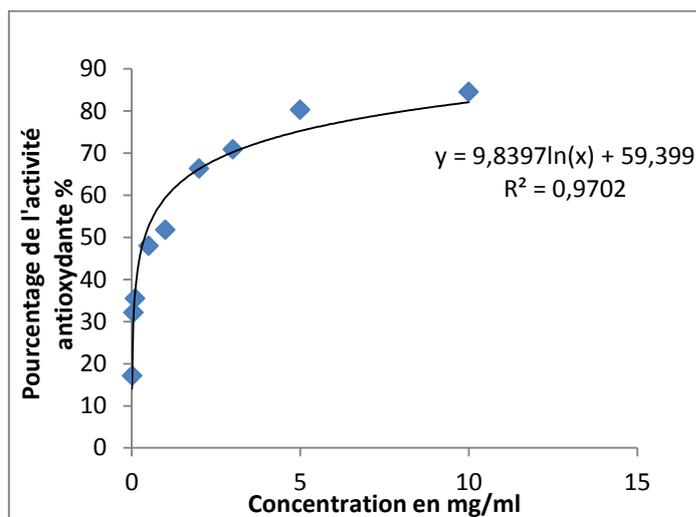


Figure n°21: Variation du pourcentage de l'activité antioxydante en fonction de la concentration des nanoparticules.

D'après la figure 22 le IC 50 de l'extrait aqueux c'est $0,8073 \pm 1,738 \pm 1,9678 \pm 0,6656$

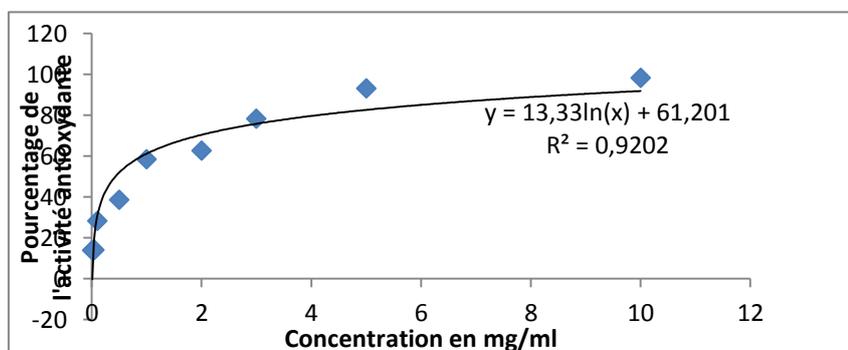
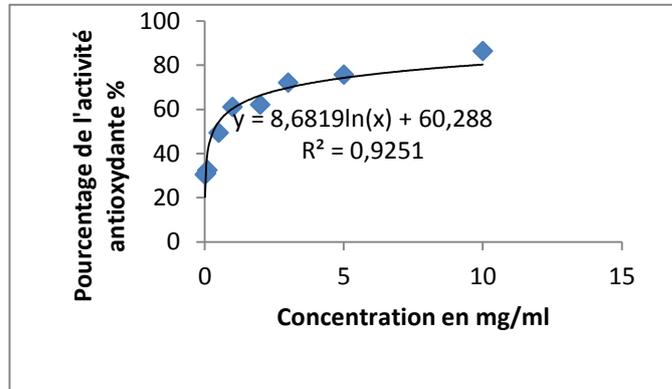
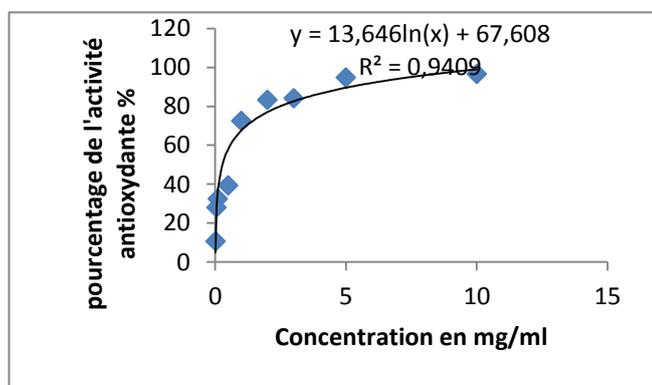


Figure n°22: Variation du pourcentage de l'activité antioxydante en fonction de la concentration de l'extrait aqueux.

D'après la figure 23 on détermine le IC50 qui est : $0,0166 \pm 0,0203 \pm 0,0033$

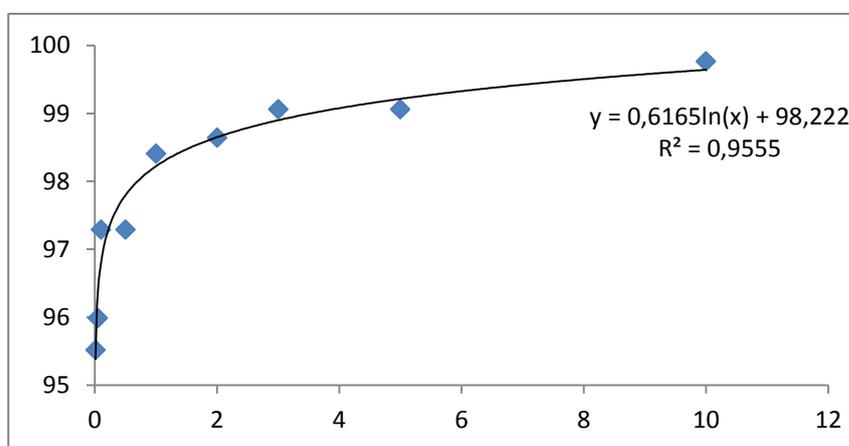
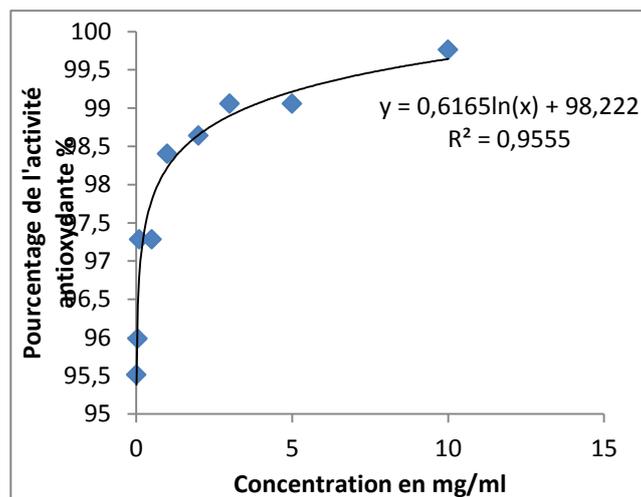
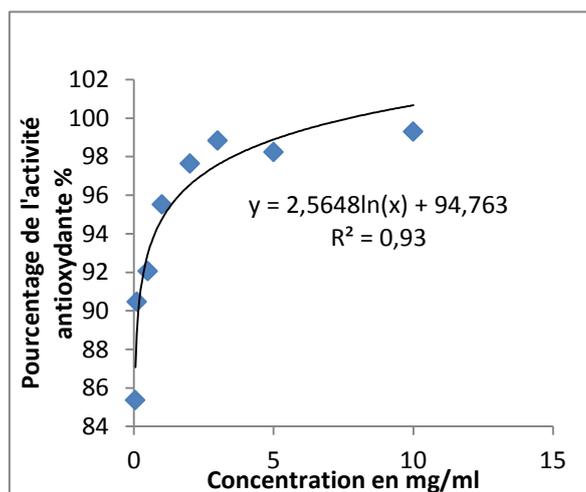


Figure n°23 : Variation du pourcentage de l'activité antioxydant en fonction de la concentration d'acide ascorbique

Les valeurs CI50 calculées pour l'acide ascorbique, l'extrait aqueux et l'AgNPs de *Lavandula dentata* les résultats illustrée dans le tableau 09

Tableau n°9: les valeurs de CI50 de AgNPs et l'extrait aqueux , l'acide ascorbique.

Les échantillons	L'extrait aqueux	Les nanoparticules	L'acide ascorbique
CI50	1,294	0,704	0,033

Comparaison de l'extrait aqueux et les nanoparticule avec l'acide ascorbique par rapport IC50

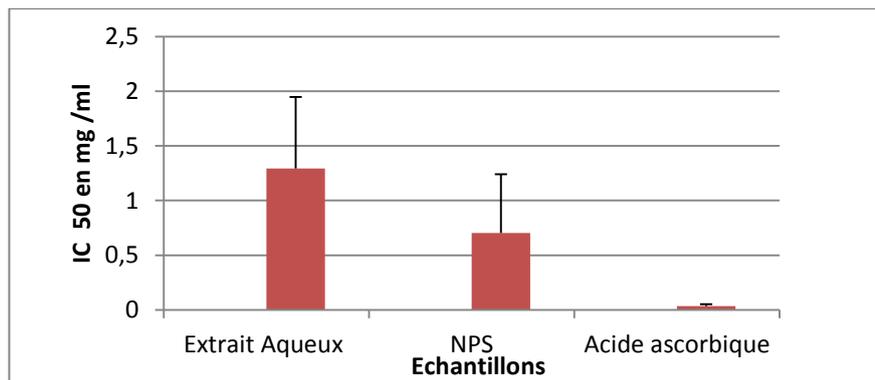


Figure n°24: Représentation graphique montre la comparaison d'extrait aqueux et des nanoparticules avec l'acide ascorbique par rapport à l'IC 50

Le profil anti radicalaire obtenu (figure n°24) révèle que tous l'extrait aqueux et les nanoparticules à base d'extrait aqueux de cette plante doués d'un effet antioxydant considérable. Ce qui confirme et indique que l'extrait et les nanoparticules de la plante *Lavandula dentata* ont un pouvoir anti-radicalaire important notamment l'inhibition de certain enzyme tels que la xanthine oxydase qui est un enzyme producteur des radicaux libres. Nos résultats montrent que l'extraits d'acide ascorbique (IC50=0,0334mg/ml) et l'extrait des nanoparticules (IC50= 0,7043 mg/ml) possèdent une activité antioxydant plus faible par rapport à celui de l'extrait aqueux (IC50= 1,294675mg/ml). On peut constater que les nanoparticules à base d'extrait aqueux ont un pouvoir de piégeage du radical DPPH important,

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

Des travaux similaires concernant l'activité antioxydante des extraits des feuilles et de *Lavandula dentata* ont démontrés que le pouvoir anti-radicalaire être dû à la présence des composés phénoliques, et qu'ils ont la capacité de piéger les espèces radicalaires et les formes réactives de l'oxygène (Kelly et al., 2012).

Ont montrées que l'extrait aqueux de notre plante est plus riche en polyphénols donc ça capacité de piéger les radicaux DPPH est plus élevée. Plusieurs études ont montrées que l'effet scavenger des produits végétaux est principalement attribuable aux composés phénoliques comme les flavonoïdes, les tanins...etc. (**Nagavani et al., 2010, Cartea et al., 2010**). Les flavonoïdes sont classés comme des antioxydants mixtes (**Romalho et al., 2005**), car ils sont capables de donner des protons aux radicaux libres, et sont encore capables d'empêcher la formation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit par l'inhibition des facteurs impliqués dans ce processus, ou par chélation des traces métalliques impliqués dans leur production (**Agatia et al., 2012**) .

IV. 2. Évaluation de l'activité anti-inflammatoire

La réalisation de l'activité anti-inflammatoire in vitro de l'AgNPs et l'extrait aqueux de *L.dentata*, deux tests sont réalisés : le test de stabilisation membranaire par la chaleur et le test d'hémolyse. Diclofénac est utilisé comme un anti-inflammatoire. Les résultats sont montrés dans les figures suivantes.

IV. 2.1 Evaluation de la toxicité des nanoparticules et d'extrait aqueux de *Lavandula dentata* vis-à-vis des globules rouges

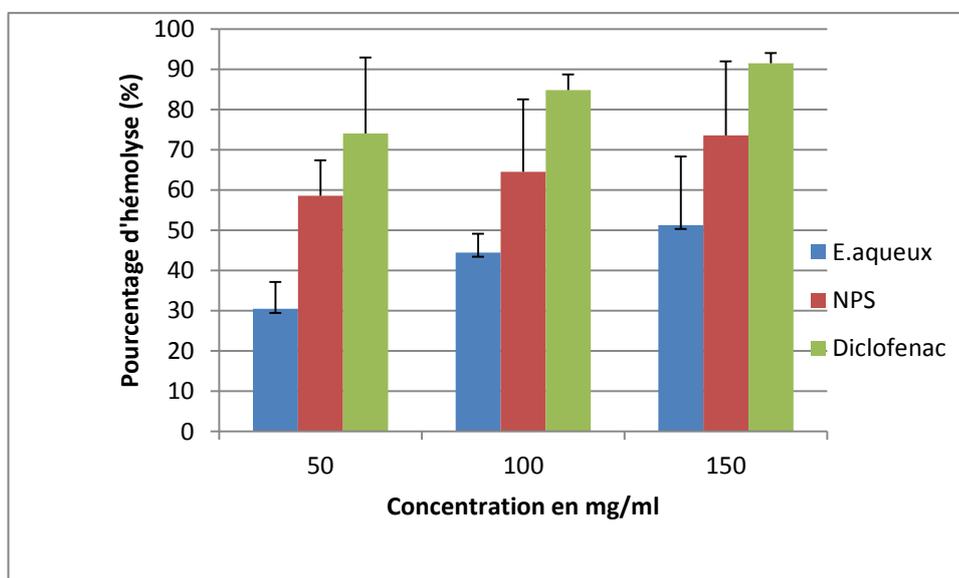


Figure n°25 : Evaluation du pourcentage d'hémolyse des Suspensions érythrocytaire en fonction des différentes concentrations des nanoparticules et d'extrait aqueux par rapport Diclofinac.

Les résultats de teste toxicité représenté par des pourcentages d'hémolyse des globules rouges, en fonction des différentes concentrations.

Selon la figure ci-dessus on constate que chaque fois que le taux de concentration augmente il y aura une augmentation du pourcentage d'hémolyse que ce soit pour le diclofénac ,Nps et l'extrait aqueux. Pour le diclofenc a montré un effet supérieur par rapport les NPs et l'extrait aqueux avec des pourcentages d'inhibition égale 74,02%, 84,79% et 91,46%.

Donc, ces résultats montre des taux d'hémolyses sont obtenus dans les concentrations élevées, ce qui probablement due à l'absence de l'effet toxique de la plante.

Teste d'hémolyse

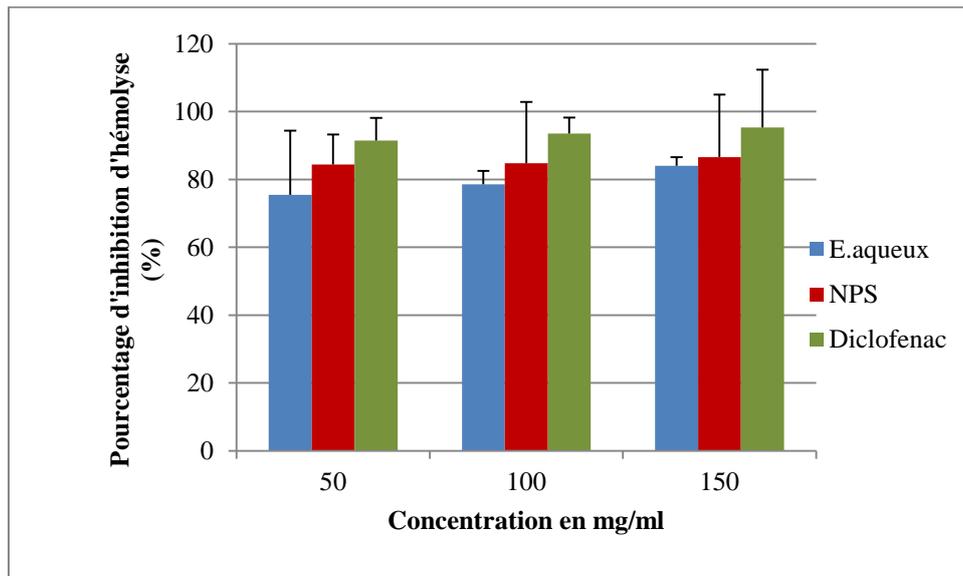


Figure n°26: Évaluation des pourcentages d'inhibitions de l'hémolyse des suspensions érythrocytaire en fonction des différentes concentrations en nanoparticules et extrait aqueux de *Lavandula dentata*.

A partir des résultats mentionnés dans l'histogramme (Figure n°26), on observe que Le diclofinac présente une inhibition très hautement significative de l'hémolyse des globules rouges, avec un effet dose dépendant aux concentrations de 50, 100, 150µg/ml, avec une inhibition maximale de 91% à la dose de 150 µg/ml. Le diclofinac a donné un effet plus élevé à la valeur 91% par rapport à l'extrait aqueux et les nanoparticules. L'évaluation du pourcentage d'inhibition montre que Le diclofinac possède une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de l'hémolyse des globules rouges par la chaleur à différentes concentrations.

D'autres travaux sur les activités anti-inflammatoires d'un extrait aqueux et nanoparticule de la *Holoptelea integrifolia* et qui se fait par (Prakash, Gnanaprakasam et al. 2013) il montre que Les AgNPs synthétisés par le vert ont été testés pour leurs propriétés anti inflammatoires en utilisant l'action qui se produit par la chaleur sur la protéine BSA dans des conditions optimales. L'étude spectroscopique

UV-vis a été réalisée à 660 nm. AgNPs a présente des effets dépendants de la concentration. Par rapport à la norme (acide acétylsalicylique), les AgNPs ont montré une efficacité 4 fois moindre pour soumettre l'effet induit par la chaleur sur la protéine BSA. Dans des études antérieures, des extraits aqueux et éthanoliques d'IH ont montré de bonnes activités anti-inflammatoires sur des rats (par le biais d'un test d'oedème de la patte induit par la carraghénane) par rapport à l'indométhacine standard .

D'après

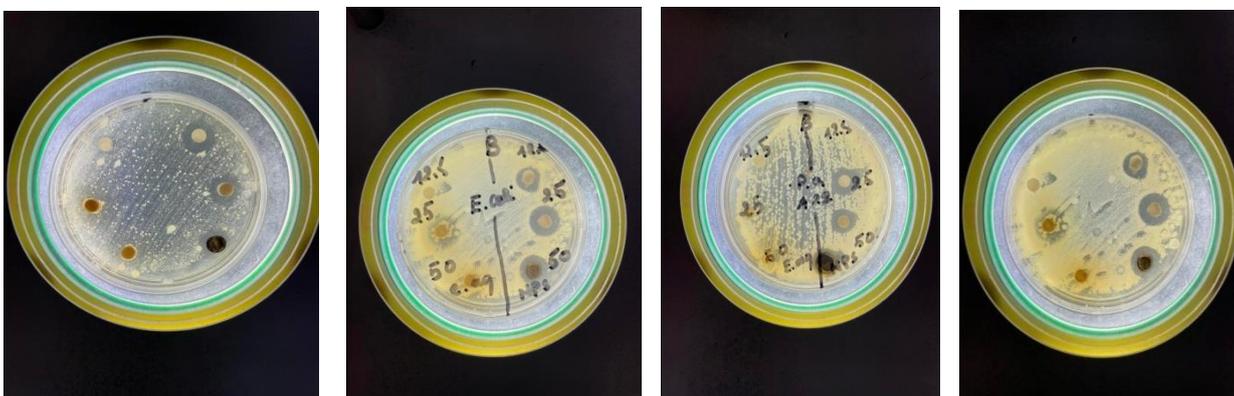
les études réalisées par (**Bagora Bayala ,2014**) sur quelque plantes médicinales de la famille lamiacée qui ont montré une activité anti-inflammatoire par l'inhibition de peroxygénase .

Selon (**Loukhaoukha et saidi ,2017**) Les résultats obtenus montre que *Lavandula stoechas* est riche en composé bioactifs qui est responsable de l'activité anti-inflammatoire .ces résultats indique que l'effet de *L. stoechas* est proportionnel a la dose .cependant *L.Stoechas* a des propriétés anti-inflammatoire nettement plus faible que celles diclofénac.

IV.3. Évaluation de L'activité antibactérienne

IV .3.1.Résultat de test aromatogramme

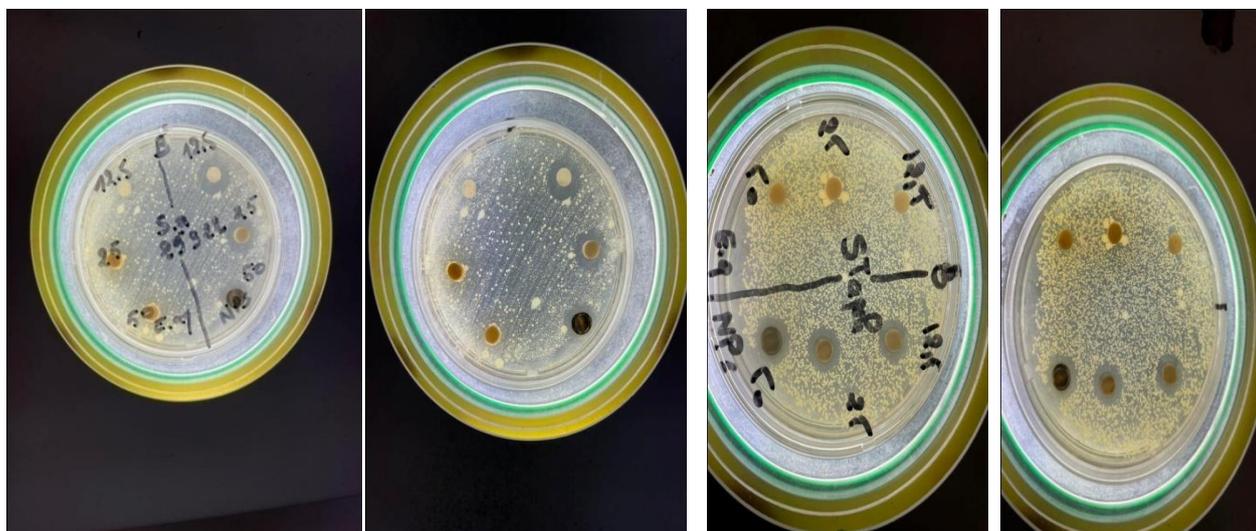
la réalisation de l'activité antibactérienne ce fait a l'action de série de différentes concentrations d'AgNPs ainsi l'extrait aqueux de la plante étudié (*L.dentata*) sur quatre souches bactériennes , puis les micro-organismes ont été cultivés et inoculés, qui sont les bactéries à gram positives (*S.aureus* ATCC 25922, *S.aureus* ATCC 43300) et des bactéries à gram négatives(*P.aeruginosa* (A22) et *E.coli*). les résultats obtenus sont représentés dans la figure ci - dessus



Escherichia Coli

Pseudomonas -Aeruginos

Les souches à Gram-



Staphylococcus aureus 25922

Staphylococcus aureus 43300

Les souches à Gram+

Figure n° 27 : Résultats l'aromatogramme de AgNPs et l'extrait aqueux de la *L.dentata*.

Les résultats obtenu illustrées dans les figures (26,27 ,28) montre que l'extrait aqueux des feuilles de *lavandula dentata* est non sensible chez les souches testé *E. coli* ,*Pseudomonas -aeruginosa* ,*Staphylococcus aureus 25922* et *Staphylococcus aureus 43300* . Les résultats de L'activité antibactérienne des Ag NPs synthétisées a partir de *L.dentata* est illustrées sur les Figures (26,27). L'effet anti-bactérienne de nos produit se traduit par une zone d'inhibition autour des disques contenant des AgNPs a été évalué vis-à-vis de quatre souches bactériennes (*E.coli* ,*aureus43300*, *S.aureus25923* et *P.aeruginosa*).

D'après les résultats obtenu les quatre souches étudié sont sensible à l'AgNPs synthétisés à partir des feuilles de *Lavandula dentata* Le pouvoir antimicrobien est extrêmement sensible à partir de la concentration de 12,5 mg/ml.cette sensibilité augmente davantage avec l'augmentation de la concentration (50mg/ml).Dans ce cas on constate qu'il y a une corrélation entre l'activité antibactérienne et les concentrations respectives de l'AgNPs. Plus la concentration de l'AgNPs augmente, plus l'effet antibactérien augmente. La grande zone d'inhibition est marquée par la souche *E.coli*(16,66mm) cette souche est sensible a l'AgNPs suivi par *S.a 43300*(15,66mm) ,puis *S.a 25923*(14,33mm) , enfin *P.a A2*

avec un diamètre(13,66mm) . Ces résultats confirment que la plante *Lavandula dentata* présente des propriétés antimicrobiennes très importante.

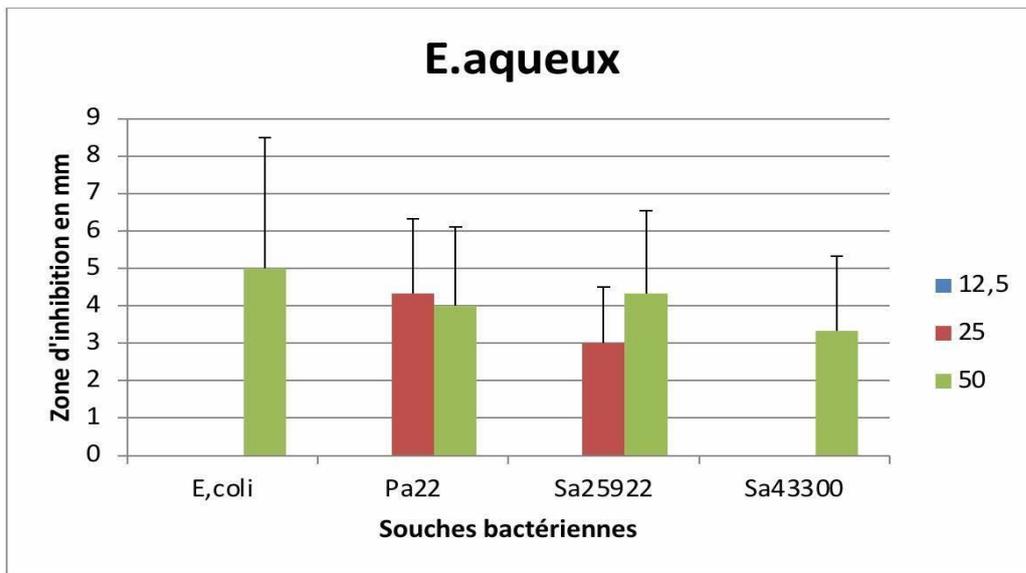


Figure n°28 : Représentation graphique de l'activité antimicrobienne d'extrait aqueux de la plante *lavandula dentata* réalisée par la méthode de diffusion sur disque.

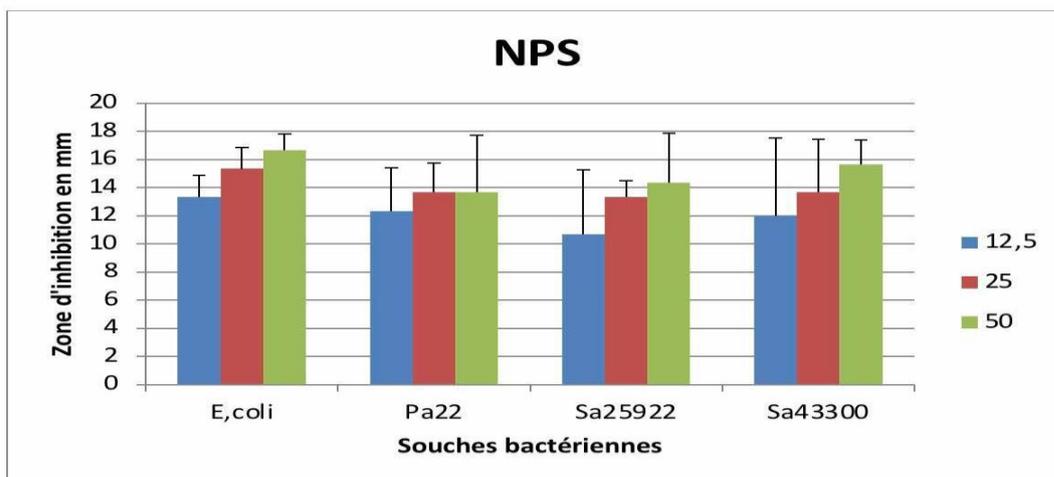


Figure n°29: Représentation graphique de l'activité antimicrobienne des nanoparticules réalisée par la méthode de diffusion sur disque.

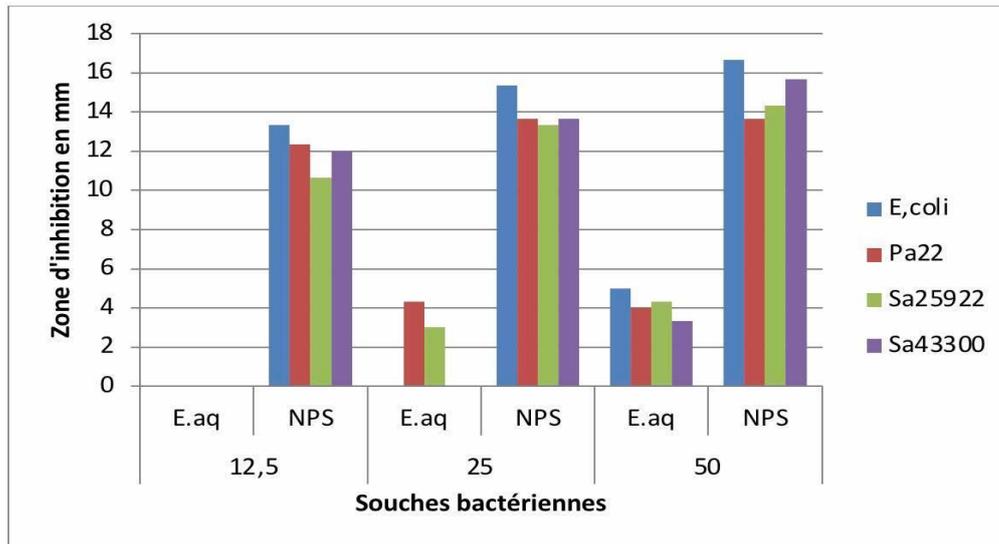


Figure n°30 : Représentation graphique montre la comparaison entre les résultats de l'activité antimicrobienne des nanoparticules et d'extrait aqueux de *L.dentata*

D'après les résultats obtenus sont illustrées dans la figure 29 on constaté que les nanoparticules d'argent synthétisées à partir de *Lavandula dentata* ont montré une forte inhibition de la croissance chez toutes les souches testées et les meilleurs résultats sont obtenus avec les souches d'*Echerichia coli* (*E.coli*) et celle *S. Aureus* 43300. Cette sensibilité est aussi importante chez *S.a25922* et d'un effet antibactérien moins important chez la *P.a A22* en la comparant avec les autres souches des bactéries. Ces résultats sont moins intéressants avec l'extrait aqueux de la plante *Lavandula dentata*, dont il n'y a aucune sensibilité bactérienne détectée chez toutes les bactéries et ce pour la concentration 12.5mg/ml et pour la concentration 25mg/ml on constate aucune sensibilité chez deux bactéries, à savoir *E.coli* et *S.a 43330*. Pour les bactéries *P.a A22* et *S.a25922* elles atteignent de 3 à 4 mm et ça pour la concentration 25mg/ml et 50mg/ml, respectivement et est qualifiée comme pas sensible. Tandis que pour *E.coli* et *S.a 43330* elles atteignent de 3 à 5 mm à 50mg/ml et donc qualifiées comme pas sensibles. En conséquence que l'extrait aqueux que nous avons préparé est non-sensible dans cette série des concentrations aux souches testées.

D'après les résultats qui est illustré dans la figure n°30 montre que les AgNPs peuvent être plus efficaces que l'extrait aqueux.

Selon (Mollick et Nayak, 2015), les nanoparticules d'argent ont une excellente activité antibactérienne vis-à-vis *E. coli* et *P. aeruginosa*. Cependant aucun résultat n'a été présenté sur ce sujet. Actuellement, le mécanisme le plus raisonnable est que complète des cellules et l'élimination de la couche de LPS (uniquement chez les Gram négatifs).

En plus, les NPs d'Ag montrent une efficacité antimicrobienne plus élevée par rapport de l'extrait aqueux de *Lavandula dentata* 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'extrait aqueux.

Les observations menées révèlent qu'à l'aide d'extrait de la plante *Lavandula dentata*, les NPs d'Ag synthétisés confirment leur effet antibactérien sur les pathogènes courants dont *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*.

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est de proposer de nouvelles voies de biosynthèse des nanoparticules d'argent (Ag) en vue de remplacer l'utilisation des réducteurs chimiques. A cet effet, nous avons choisi une plante médicinales qui est *lavandula dentata* afin de mettre en œuvre la fabrication de nanoparticules biologiques.

La caractérisation des nanoparticules d'argent synthétisées a été réalisée en associant par la méthode de caractérisation de surface telles que l'UV-visible).

Les activités antioxydants et antibactériennes d'extrait aqueux et des nanoparticules élaborées ont été évaluées. L'activité anti-radical au DPPH• a révélé une grande activité chez nanoparticules par rapport à l'extrait aqueux.

Les nanoparticules était le plus active avec d'IC50 égale à 0,704mg/ml, et pour l'extrait des feuilles étaient les moins actives avec d' IC50 1,294 mg/ml.

D'autre part, la réalisation de leur effet antibactérien est évalué par la méthode de diffusion sur disque contre les quatre souches bactériennes (Deux à Gram négatif et deux à Gram positif). Les nanoparticules synthétisées ont montré un effet antibactérien très important par rapport l'extraits aqueux des feuilles. Ces résultats confirment que la plante *Lavandula dentata* présente des propriétés antimicrobiennes très importante.

Le pouvoir anti inflammatoire étudié en utilisant la méthode de la stabilisation membranaire et la toxicité des érythrocytes, a montré des propriétés anti inflammatoire assez important de nos nanoparticules semblable a celle de diclofénac.

D'après les expériences étudié on conclu que *lavandula dentata* possède des propriétés comme un puissant produit naturel antioxydant, anti-inflammatoire et antibactérien. Des expériences chimiques approfondies et pharmacologiques ainsi que des études in vitro devraient être envisagés pour l'évaluation réelle du potentiel thérapeutique de *L.dentata*, supposée être utilisé comme un alternatif thérapeutique. En revanche, on peut dire que ces expériences servent comme une base pour de futures recherches et restent seulement préliminaires sur l'application de cette plante médicinales

References

Références :

- **Aziza CHABIRA**, Z. D. La prédiction in silico des propriétés ADME des molécules d'huile essentielle de *Lavandula dentata*. -

Bachiri L., Echchegadda G., Ibjibjen J., Nassiri L. 2016. Etude Phytochimique Et Activité Antibactérienne De Deux Espèces De Lavande Autochtones Au Maroc : «*Lavandula stoechas* L. et *Lavandula dentata* L.». *European Scientific Journal* 12 : 313-333.

-**BRAND-WILLIAMS**, W.E. N.D.Y. (1996). "Activites antioxydante et antiradicalaire de composés phenoliques et d'extraits vegetaux en systemes modeles et en cuissonextrusion" (Doctoral dissertation, Massy, ENSIA).

-**Bagora Bayala**. Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti prolifératives et antimigratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II; Université de Ouagadougou (Burkina-Faso), 2014. Français. NNT : 2014CLF22502. tel-01166321

-**Chu C. J.**, Kemper K. J. 2001. Lavender (*Lavandula* spp.). The Longwood Herbal Task Force (<http://www.mcp.edu/herbal/>) and The Center for Holistic Pediatric Education and Research (<http://www.childrenshospital.org/holistic/>). 32 p .

-**Djenadi, R.**, G. Micolau, et al. (2011). Fast extraction of extrinsic cells in a NVM array after retention under gate stress. 2011 International Semiconductor Device Research Symposium (ISDRS), IEEE.

-**Essawi, T.** and M. Srour (2000). "Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity." *Journal of ethnopharmacology* 70(3) : 343-349.

Firdhouse, M. J. and P. Lalitha (2015). "Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications." *Journal of Nanotechnology* 2015

-Giuliani C., Bottoni M., Ascrizzi R., Milani F., Papini A., Flamini G., Fico G. 2020. *Lavandula dentata* l. from Italy: analysis of trichomes and volatiles. *Biodiversity. Chemistry & Biodiversity*. 15 p.

Guitou, Marie-Anne. 23 juin 2014, *Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO₂*. s.l. : UNIVERSIT DE BORDEAUX, pp. 34-35

G Chuto, P Chaumet-Riffaud - Médecine Nucléaire, 2010 – Elsevier

-Hui L., Jingrui L., Hongtong B., Lei S., Huafang W. 2019. The complete chloroplast genome sequence of *Lavandula dentata* (Lamiaceae) and its phylogenetic analysis, *Mitochondrial DNA Part B* 4(2) : 2135-2136. Martins R de P., Gomes R.A da S., Malpass A. C. G., Okura M. H. 2019.

Klasen H.J.. Historical review of the use of silver in the treatment of burns I. Early uses, *Burns*, 26 (2000), 117.

Kang H, Buchman JT, Rodriguez RS, Ring HL, He J, Bantz KC, Haynes CL. *Stabilization of Silver and Gold Nanoparticles: Preservation and Improvement of Plasmonic Functionalities* (2019)

-Lim T.K. 2014. *Lavandula angustifolia*. In *Edible Medicinal and Non Medicinal plants* 8 : 156-185.

-Loukhaoukha Rahma et Saidi Fairouz. Evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory properties of *Lavandula stoechas* l. *ESSENTIAL OIL Laboratory of Biotechnologies, Environment and Health - University of Blida 1- Faculty of Nature and Life Sciences Department of Biology and Cellular Physiology, B.P.270, Soumaa road, Blida, Algeria*

Lansdown A.B.G.. Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action, *J. Wound Care*, 11 (2002 a), 125 .

- Marie-Anne Guitou. *Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO₂*. *Sciences pharmaceutiques*. 2014. dumas-01011269 UNIVERSIT DE BORDEAUX (page 24-25)

- **Madhumitha, G.,** & Roopan, S. M. (2013). Devastated crops: multifunctional efficacy for the production of nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2013

- **Nuru A.,** Al-Ghamdi A., Tena Y.T., Shenkut A.G., Ansari M.J., Al-Maktary A. 2015. Floral phenology, nectar secretion dynamics and honey production potentials of lavender species (*L. dentata* and *L. pubescence*) in south-western Saudi Arabia. *J. Apic. Sci* 59 : 135–144

Nabavi .,Kessels, H. W., Nguyen, L. N., , S., &Malinow, R. (2010). The prion protein as a receptor for amyloid- β . *Nature*, 466(7308), E3

- **Nair S,** Sasidharan A, Rani VD, Menon D, Nair S, Manzoor K, Raina S. (2009). Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 20(1):235

- **OULIDI, A. J.** PLANTES MÉDICINALES UTILISÉES DANS LA VILLE DE FÈS POUR LE TRAITEMENT DES PATHOLOGIES DIGESTIVES Karima MIKOU1, Saad RACHIQ2

- **Ostiguy,** Claude, et al.mai 2010,Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST. s.l. : l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), p. 10.

pierre Docteur de l'université et marie curie (19.10.2016) page «3/33 »

Ramsden Jeremy J, what is nanotechnology? *Nanotechnology Perceptions* 1, 3–17, 2005.

-**Rebey B.I.,** Bourgou S., Saidani Tounsi M., Fauconnier M.L., Ksouri R. 2017. Etude de la composition chimique et de l'activité antioxydante des différents extraits de la Lavande dentée (*Lavandula dentata*). *Journal of New Sciences Agriculture and Biotechnology* 39(2) : 2096-2105.

- **Rémy Tello,** Eric Marsden, Nicolas Treich FonCSI, 2011

- **R. D. Handy.** Owen, R. E. Valsami-Jones, 17 (2008) p 315-325

- **Shankar SS**, Rai A, Ahmad A, Sastry M. (2004a). Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core–Ag shell nanoparticles using Neem (*Azadirachta indica*) leaf broth. *Journal of colloid and Interface science* 275(2):496-502

-**Shinde, U.**, A. Phadke, A. Nair, A. Mungantiwar, V. Dikshit and M.Saraf(1999) "Membrane stabilizing activity—a possible mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *Cedrus deodara* wood oil."*Fitoterapia* 70(3): 251-257.

-**Shobana, S.** and R. Vidhya (2016) “Evaluation of in vitro hemolytic activity of different parts of *Abutilon indicum* (Linn.) ."*World J Pharm Pharm Sci* 5(5): 1182- 1196.

-- **Silver S., L.T.**

Phung, G. Silver. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 33 (2006), 627.

- **Saulou C.**, (2009). Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d’argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. Thèse de doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. L’Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, 313p

-**Tenfen, A.**, A. M. Boeder, et al. (2017). "Chemical composition, antibacterial and antimycoplasma activities of four *Eugenia* species growing in Brazil." *Journal of Medicinal Plants Research* 11(39): 596-602.

---- **T.M. El Badawy, A.M.**

Genaidy, A. Scheckel, K.G. Luxton, T.P. Suidan. *Science of the Total Environment* 408 (2010) p 999-1006

- <https://horomidis.gr/fr/produit/lavandula-dentata-allardi-levanta/>

<https://www.teline.fr/fr/photos/lamiaceae/lavandula-dentata#photo-1>

-**Yi, W.**, Ren, Z. A., Lu, W., Yang, J., Shen, X. L., Li, Z. C., ... & Zhao, Z. X. (2008). Superconductivity at 55 K in iron-based F-doped layered quaternary compound Sm [O_{1-x}F_x] FeAs. arXiv preprint arXiv:0804.2053.

- **Willner, I.**, Baron, R., & Willner, B. (2006). Growing metal nanoparticles by enzymes. *Advanced Materials*, 18(9), 1109-1120 .

-**Ziane N.** 2014. Contribution à l'étude de l'activité hypoglycémiant des extraits de Pistacia atlantica Desf. de la réserve nationale d'El-Mergueb (M'sila) –Algérie. Thèse de magistère, université Ferhat Abbas, Algérie, 79 p.

<https://www.novethic.fr/lexique/detail/nanoparticules.html>

<http://www.physique-et-matiere.com/argent.php>

- **Zhang L.**, Wu L., Youbin S., et al., (2018). Size-dependent cytotoxicity of silver nanoparticles to *Azotobacter vinelandii*: Growth inhibition, cell injury, oxidative stress and internalization. *PLOS ONE* journal. ; doi.org/10.1371/journal.pone.0209020.

<http://www.nanosmile.org/index.php/fr/precautions/nano-materiaux/a-quoi-ca-sert-/293-par-type-de-nanoparticules>

-**Zargar M.**, Hamid AA, Bakar FA, Shamsudin MN, Shameli K, Jahanshiri F, Farahani F. (2011). Green synthesis and antibacterial effect of silver nanoparticles using *Vitex negundo* L. *Molecules* 16(8):6667-6676.