



REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOU-BEKR BELKAID - TLEMCCEN

THÈSE

Présentée à :

FACULTE DES SCIENCES – DEPARTEMENT DE CHIMIE

Pour l'obtention du diplôme de :

DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité: Chimie

Par :

BOUSALEM Nadjat

Sur le thème

**SYNTHESE VERTE, CARACTERISATION ET ACTIVITE
ANTIBACTERIENNE DE FILMS COMPOSITES ALGINATE –
NANOPARTICULES D'ARGENT-CHITOSANE**

Soutenue publiquement le 25/05 2017 à Tlemcen devant le jury composé de :

M ^{me} BEDJAOUI Lamia	Professeur	Université de Tlemcen	Président
Mr BENMANSOUR Kamel	Maitre de Conférences A	Université de Tlemcen	Directeur de thèse
Mr HARRATS Charef	Maitre de Conférences A	Université de Mostaganem	Examineur
M ^{me} KARASLIMANE Sofia	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur
Mr BELLAHCENE Miloud	Professeur	C.U d'Ain Temouchent	Examineur
Mr CHABANE SARI Sidi Mohamed	Professeur	Université de Tlemcen	Examineur

*Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules (LRM)
BP 119, 13000 Tlemcen - Algérie*

ملخص

تهدف هذه الأطروحة إلى تحضير افلام مركبة نانومترية باستخدام الالجينات، جسيمات الفضة النانومترية والكيروزان باستعمال طرق صديقة للبيئة. نقدم في هذا العمل طريقة تحضير جسيمات الفضة النانومترية في وسط مائي بواسطة الأشعة فوق البنفسجية و باستعمال بوليمير طبيعي : الألجينات كعامل مساعد على الاستقرار، بعد التفاعل، نقوم بدراسة أبعادها وأشكالها. فيما بعد تستعمل هذه الجسيمات المستقرة، لتكوين أفلام نانومركبة مع الكيتوزان، ودراسة مدى تأثيرها على العديد من أنواع البكتيريا الممرضة.

أظهرت الدراسة الأولية للطيف فوق البنفسجي لهذه المحاليل أن تحضير جسيمات الفضة النانومترية بهذه الطريقة يمكن إجراؤه و أن أشكالها كروية أو قريبة من الكروية، كما يشير عرض هذه الاطياف إلى أن أبعاد هذه الجسيمات كبيرة . وقد أثبتت دراسة تشتت الضوء الديناميكي أن أبعادها تتراوح بين النانومتر و تصل حتى الميكرون.

بعد ذلك أستعملت هذه الجسيمات النانومترية المستقرة بواسطة الالجينات في صنع شرائط مركبة مع الكيتوزان، وقد درس التفاعل بينها بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء. يشير التطور في أطياف الأشعة تحت الحمراء قبل وبعد التفاعل أن هناك فعلا تركيب متعدد الالكتروليت بين الالجينات و الكيتوزان كما يؤكد أيضا وجود جسيمات الفضة النانومترية في الشرائط. أما طيف الاشعة إكس فيؤكد وجود الامتصاصات المميزة للفضة في هذه الشرائط أخيرا أثبتنا بوضوح التأثير المضاد للجراثيم للخلايا البكتيرية غرام + و غرام -.

كلمات رئيسية

الألجينات، الفضة النانومترية، تفاعل أخضر، الكيتوزان، الأفلام المركبة.

Résumé:

Ce travail de thèse a pour objectif de formuler un film nanocomposite à base d'un mélange : d'alginate, de nanoparticules d'argent et de chitosane par procédé de chimie verte. Nous présentons dans ce travail la synthèse de nanoparticules d'argent par irradiation UV, et leur stabilisation en solution aqueuse avec un polysaccharide naturel : l'alginate.

Notre objectif est double : synthétiser ces nanoparticules dans les conditions suscitées, caractériser leur morphologie et leur taille et les utiliser pour former le film nanocomposite avec le chitosane par simple agitation.

À partir de mesures de spectrophotométrie UV-vis, nous avons montré que l'on pouvait synthétiser des nanoparticules d'argent de forme sphériques ou proches d'une sphère. L'allure des spectres de résonance des plasmons de surface élargis, suppose que les diamètres des nanoparticules sont élevés. Ces résultats ont été confirmés par mesure de diffusion dynamique de lumière : les diamètres varient de quelques nanomètres aux microns.

Nous avons ensuite élaborés des films nanocomposites avec le chitosane et on a étudié l'interaction de l'alginate agent stabilisant, avec le chitosane par spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier. L'évolution des spectres IR avant et après formation de polyélectrolyte complexe Alginate / chitosan confirme la réaction entre eux et confirme aussi l'existence de nanoparticules d'argent dans les films. Les diffractogrammes RX montrent des pics caractéristiques des plans cristallins de l'argent. Dans les films nanocomposites préparés, nous avons clairement mis en évidence l'effet antibactérien pour des cellules bactériennes à Gram⁺ et Gram⁻.

Mots clés

Alginate, nanoparticules d'argent, synthèse verte, chitosane, films nanocomposites.

Abstract

This work aims at the synthesis of a nanocomposite film using alginate, silver nanoparticles and chitosan by a green method. We present in this thesis the synthesis of silver nanoparticles by UV irradiation method, and their stabilization in aqueous solution by a natural polysaccharide: alginate.

Our objective dual to synthesize these nanoparticles in the above-mentioned conditions, characterize their morphology and size and to use them for elaboration of a nanocomposite film with chitosan by agitation.

From UV-vis spectrophotometry measurements, we have shown that the silver nanoparticles synthesized are of spherical shape or like a sphere . The appearance of the resonance spectra of the expanded surface plasmons, assumes that the diameters of the nanoparticles are high. These results have been confirmed by dynamic light scattering measurements: diameters vary from a few nanometers to a few microns.

We have developed nanocomposite films with chitosan from these prepared nanoparticles and we studied the interaction of the stabilizing agent alginate, with chitosan by Fourier transform Infrared Spectroscopy. The evolution of the IR spectra before and after formation of the polyelectrolyte complex alginate / chitosan confirms the reaction between them and also confirms the existence of silver nanoparticles in the films. The X-ray diffractograms show characteristic peaks of the crystalline planes of silver. Finally, we clearly demonstrated the antibacterial effect of the prepared nanocomposite films for Gram + and Gram – bacteria cells.

Key words

Alginate, silver nanoparticles , green synthesis, chitosan, nanocomposite films.

*A mon père,
Ne pouvant le remercier de vive voix,
je lui adresse ici une pensée particulière...*

A ma mère,

Remerciements

Avant de présenter les travaux de recherches effectués, je tiens à exprimer ma gratitude auprès de tous ceux grâce à qui cette thèse a aboutie.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés au laboratoire de Recherche sur les macromolécules (LRM) de l'université Abou-Bekr BELKAID à Tlemcen, dirigé successivement par M^r BENMOUNA Mustapha puis par M^{me} BEDJAOUI Lamia. Je tiens à les remercier tous les deux de m'avoir accueilli au laboratoire.

Je remercie profondément mon directeur de thèse, BENMANSOUR Kamel, pour m'avoir confié ce thème de recherche, pour ses encouragements continus, sa disponibilité et surtout sa patience. Merci pour tout le temps et l'énergie consacrés à me former et m'encadrer.

Je suis très sensible à l'honneur que me font :

M^{me} BEDJAOUI Lamia, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen, pour avoir accepté d'être président de mon jury de thèse.

M^{me} KARASLIMANE Sofia, Professeur à l'Université Aboubekr Belkaid de Tlemcen

M^r BELLAHCENE Miloud, Professeur au Centre universitaire Belhadj Bouchaib de Ain Temouchent.

M^r HARRATS Charef, Maître de Conférences A, à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem.

M^r CHABANE SARI sidi Mohamed, Professeur à l'université Aboubekr Belkaid de Tlemcen.

Je leur adresse mes sincères remerciements pour avoir accepté de consacrer une partie de leur temps à évaluer ces travaux en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier Monsieur Larid Mourad, Directeur du laboratoire de contrôle de qualité et répression des fraudes de la wilaya de Naama, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire, et pour son aide très précieuse.

Mes remerciements s'adressent aussi à Sanaa pour ses encouragements et son aide, je n'oublierai pas de remercier Amine Zenasni, Abdeladim Adjroum, Nadjat Sellam, Karima Laroui, sid Ahmed, Dinaoui mustapha et Ahmed Djebli.

Enfin, je tiens aussi à remercier ma mère, mes frères et sœurs, mon mari, mes enfants et mes amis, ... et bien d'autres...

Merci à vous tous.

Sommaire

Résumé en arabe

Résumé en français

Résumé en anglais

Dédicaces

Remerciements

Sommaire

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction générale	1
Chapitre I. Etude bibliographique:	5
Introduction	6
L'argent du métal aux nanoparticules	7
Introduction.....	7
<i>I.1. Propriétés physiques et chimiques de l'argent</i>	7
<i>I.2. Applications des nanoparticules d'argent</i>	8
<i>I.2.1. Applications dans l'industrie pharmaceutique et médicale</i>	9
I.2.1.1. Pansements.....	9
I.2.1.2. Produits pour comblement osseux.....	9
I.2.1.3. Dispositifs implantables.....	10
I.2.1.4. Dispositifs médicaux désinfectants.....	10
I.2.1.5. Biomédecine.....	11
<i>I.2.2. Emballage alimentaire antibactérien</i>	11
<i>I.2.3. désinfection et contrôle microbien de l'eau</i>	11
<i>I.3. Synthèse de composites antibactériens à base de nanoparticules d'argent</i>	12
<i>I.3.1. Synthèse de nanoparticules d'argent</i>	12
I.3.1.1. Méthodes physiques.....	13
I.3.1.2. Méthodes chimiques.....	13
I.3.1.3. Méthodes biologiques	14
<i>I.3.2. Mécanisme de formation des nanoparticules d'argent</i>	14
I.3.2.1. La nucléation.....	15
I.3.2.2. La croissance.....	15
I.3.2.3. Le murissement.....	15
<i>I.3.3. Stabilisation des nanoparticules d'argent</i>	15
<i>I.3.4. Les carbohydrates dans la stabilisation des nanoparticules d'argent</i>	17
<i>I.3.5. Elaboration de nanocomposites à partir de nanoparticules présynthétisées</i> ...	18
I.3.5.1. Méthode ex-situ.....	18
I.3.5.2. Méthode in situ.....	19

I.4.Contexte expérimental : présentation des systèmes.....	
I.4.1.L'alginate	21
I.4.1.1.Composition chimique.....	22
I.4.2.Le chitosane	24
I.4.2.1.Propriétés physico-chimiques.....	25
1) Solubilité.....	25
2) Caractérisation du chitosane.....	26
a) Masse moléculaire moyenne.....	26
b) Degré de déacétylation.....	27
3) Complexes électrostatiques.....	28
I.4.2.2. Applications du chitosane.....	28
Références bibliographiques	30
Chapitre II. Matériaux et méthodes	45
II.1. Matériaux.....	46
II.1.1.L'alginate.....	46
II.1.2.Le chitosane	46
II.1.3.Le nitrate d'argent.....	46
II.1.4.Autres produits.....	47
II.1.4.1.L'acide acétique.....	47
II.1.4.2. L'acétone.....	47
II.1.4.3.L'hydroxyde de sodium.....	47
II.1.4.4.Sels de phosphates sodiques.....	47
II.1.4.5.Gélose nutritive Mueller Hinton.....	47
II.1.4.6.Milieu TSE.....	48
II.1.4.7.Milieu de culture Sabouraud.....	48
II.2.Méthodes	48
II.2.1.Préparation des films.....	48
II.2.1.1.L'alginate.....	48
II.2.1.2.Le chitosane.....	48
II.2.2.Préparation des solutions.....	49
II.2.2.1.Solution tampon phosphate pH=7.4.....	49
II.2.2.2.Gélose Mueller Hinton.....	49
II.2.2.3.Préparation des cultures bactériennes.....	49
II.3.Techniques expérimentales d'analyse.....	49
Introduction.....	49
II.3.1.Spectroscopie UV-visible	50
II.3.1.1.Absorbance des nanoparticules.....	50
II.3.1.2.Caractérisation des AgNPs par spectroscopie UV-visible.....	51
II.3.2.La diffusion dynamique de la lumière (DDL).....	54
II.3.3.La microscopie optique (MOP).....	55
II.3.4.La microscopie électronique à balayage (MEB).....	55
II.3.5.La diffraction des rayons X (DRX).....	56
II.3.6. La spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier (FTIR).....	57
Références bibliographiques.....	60

Résultats et discussions	63
Chapitre III. Synthèse des nanoparticules d'argent dans l'alginate ...	64
Introduction	64
III.1. Préparation des nanoparticules d'argent	64
III.2. Suivi de la réduction des ions Ag⁺	64
III.3. Stabilité des AgNPs conservées à température ambiante	70
III.4. Analyse par diffusion dynamique de la lumière (DDL)	72
Conclusion	81
Références bibliographiques	82
Chapitre IV. Elaboration et caractérisation des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts	85
Introduction	86
IV.1. Détermination du degré de déacétylation du chitosane	87
IV.2. Elaboration des films nanocomposites	90
IV.3. Analyse morphologique	91
IV.3.1. Microstructure des films	91
IV.3.2. Analyse par microscopie électronique à balayage (MEB)	93
IV.4. Analyse structurale	97
IV.4.1. Analyse par diffraction des rayons X	97
IV.4.2. Analyse par spectrométrie FTIR	99
IV.5. Degré de gonflement en milieu physiologique	102
IV.6. Activité antibactérienne	103
Conclusion	108
Références bibliographiques	109
Conclusion générale	113
Publication : Synthesis and characterization of antibacterial silver-alginate - chitosan bionanocomposite films using UV irradiation method	116

Liste des figures

Figure.I.1 : a). Courbe montrant la relation entre le diamètre des nanoparticules et leur surface ; b). Changement dans la surface spécifique (S_w) d'un cube (solide, densité 1 g/cm ³) en changeant la longueur du côté.....	1
Figure.I.2 : Méthodes de préparation physique et chimique des nanoparticules métalliques...	12
Figure.I.3. Représentation schématique du mécanisme de formation de nanoparticules	15
Figure.I.4. Schéma de stabilisation stérique et électrostatique.....	16
Figure.I.5. Représentation d'une double couche électrochimique.....	17
Figure.I.6. Stabilisation de l'argent par l'amidon.....	18
Figure.I.7. Monomères de la chaîne Alginate.	22
Figure I.8. Conformation des monomères de l'alginate	23
Figure.I.9 : Interactions entre les unités M de l'alginate.....	23
Figure.I.10. Interactions entre les unités G de l'alginate.....	24
Figure.I.11. Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c).....	25
Figure II.1. Nanoparticule excitée par une onde électromagnétique.....	49
Figure.II.2. Spectre d'absorption de nanoparticules d'argent.....	50
Figure.II.3. Observations spectroscopiques du phénomène d'agrégation des nanoparticules colloïdales d'argent lors de leur stockage	51
Figure.II.4. Distribution de taille en DLS de nanoparticules d'Ag de 103nm de diamètre (étalon Malvern).....	53
Figure.II.5. schéma de principe du zetasize Nano ZS de Malvern.....	53
Figure.II.6. Photographie en microscopie électronique à balayage de nanoparticules d'argent dans une matrice polyuréthane.....	55
Figure. II.7. Diffractogrammes de nanoparticules et attribution des plans de diffraction selon les standards : Ag (JCPDS 04-0783), Cu (JCPDS 85-1326), Fe ₃ O ₄ (JCPDS 19-629), et TiO ₂ (JCPDS 89-4921).....	56
Figure. II.8. Spectre IR du Chitosane (Cts), Cts/gélatin, et gélatin.....	57

Figure. II. 9. Spectre IR du composite Ag/Cts (S1), Ag/Cts/gelatin (S2) et Ag/gelatin (S3).....	57
Figure.III.1. Photographies des nanoparticules d'argent synthétisées dans l'alginate à différents temps d'irradiation UV.....	64
Figure.III.2 Interaction entre les nanoparticules d'argent et l'alginate synthétisées à différents temps d'irradiation.....	65
Figure.III.3 Spectre d'absorption UV-Vis des solutions nitrate d'argent, alginate et mélange nitrate d'argent/alginate sans irradiation UV.	66
Figure.III.4. Spectres d'absorption UV-Vis des nanoparticules d'argent synthétisées à différents temps d'irradiation.....	67
Figure.III.5. Comparaison des spectres d'absorption UV-Vis des échantillons E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ et E ₅	68
Figure.III.6. Variation du maximum des bandes SPR des nanoparticules d'argent synthétisées en fonction du temps d'irradiation	68
Figure.III.7. Evolution des spectres d'absorption des solutions de nanoparticules d'argent synthétisés après 3 mois.....	70
Figure.III.8. Comparaison des spectres d'absorption des solutions de nanoparticules d'argent synthétisés après 3 mois.....	71
Figure.III.9 _a . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon: E ₁ (1h).....	74
Figure.III.9 _b . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon : E ₂ (3h).....	74
Figure.III.9 _c . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon : E ₃ (24h).....	75
Figure.III.9 _d . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon : E ₄ (48h).....	75
Figure.III.9 _e . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E ₅ (96h).	76
Figure.III.10 _a . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon : E ₁ (1h).....	76
Figure.III.10 _b . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon : E ₂ (3h).....	77

Figure.III.10 _c . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon : E ₃ (24h).....	77
Figure.III.10 _d . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon : E ₄ (48h).....	78
Figure.III.10 _e . Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon : E ₅ (96h).....	78
Figure.IV.1. Spectre IR caractéristique de la chitine indiquant les positions des bandes utiles ainsi que les lignes de base.....	88
Figure.IV.2. Spectre IR du chitosane.....	89
Figure .IV.3. Présentation schématique de la préparation du film nanocomposite à partir de AgNPs pré-synthétisées.....	90
Figure.IV.4. Image MOP des films : a) Cts, b) Alg-Cts et c) Alg-AgNPs-Cts.....	92
Figure.IV.5. Micrographe de surface du nanocomposite C _{E4}	93
Figure.IV.6.Micrographe de la section transversale du nanocomposite C _{E4}	94
Figure.IV.7. Image en MEB du film C _{E1}	95
Figure.IV.8. Image en MEB du film C _{E2}	96
Figure.IV.9. Image en MEB du film C _{E3}	96
Figure.IV.10. Image en MEB du film C _{E4}	96
Figure.IV.11. Image en MEB du film C _{E5}	98
Figure.IV. 12. Diffractogramme RX du chitosane.....	98
Figure.IV.13. Diffractogramme RX du film CE ₄	98
Figure.IV.14. Spectre IR de l'alginate, du chitosan et du film Alg-Cts (1:1).....	99
Figure.IV.15. Spectres IR des films composites : Alg-Cts (C _{E0}) et des films nanocomposites C _{E1} , C _{E2} , C _{E3} , C _{E4} et C _{E5}	101
Figure.IV.16. Degré de gonflement des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts dans une solution phosphate saline à pH=7.4 à 23°C.....	102
Figure.IV.17. Absence de zone d'inhibition du film Cts-Alg pour : (a) <i>E-Coli</i> , (b) <i>S-Aureus</i> , (c) <i>P-Aeruginosae</i> , (d) <i>Citrbacter Freundii</i> , (e) <i>Bacillus Cereus</i> et (f) <i>Acinetobacter Baumannii</i>	104
Figure.IV.18. Comparaison des zones d'inhibition du film C _{E1} entre : (a) <i>E-Coli</i> , (b) <i>S-Aureus</i> , (c) <i>P-Aeruginosae</i> , (d) <i>Citrbacter Freundii</i> , (e) <i>Bacillus Cereus</i> et (f) <i>Acinetobacter Baumannii</i>	106
Fig.IV.19. Comparaison des zones d'inhibition du film C _{E2} entre: (a) <i>Citrobacter Freundii</i> , (b) <i>P-Aeruginosae</i> , (c) <i>Acinetobacter Baumannii</i>	107

Liste des abréviations

Alg : alginate.

Cts : chitosane.

AgNPs : nanoparticules d'argent.

PTE : polytéréphtalate d'éthylène.

PET : polyéthylène.

E-coli : escherichia coli.

S-aureus : staphylococcus aureus.

LDPE : polyéthylène basse densité.

PMMA : polyméthacrylate de méthyle.

PSE : polyethersulfone.

PVP : polyvynile pyrrolydone.

CPEs : complexes polyélectrolytes.

DA : degré d'acétylation.

DDA : degré de déacétylation.

PE : polyélectrolyte.

DDL : diffusion dynamique de lumière.

MOP : microscopie optique.

FTIR : spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier.

MEB : microscopie électronique à balayage.

TEM : microscopie électronique à transmission.

DRX : diffraction des rayons X.

INTRODUCTION GENERALE

Les avancées technologiques de ces dernières années en matière de nanotechnologie ont conduit au développement de nouveaux matériaux qui trouvent des applications dans tous les domaines : en traitement des eaux, en catalyse, en détection chimique et plus particulièrement comme agents antibactériens dans divers domaines tels que l'industrie agro-alimentaire ou le domaine biomédical.

Depuis quelques temps les propriétés biocides des nanoparticules d'argent ont été prouvées [1]. Ces nanoparticules peuvent être incorporées dans des matériaux polymères et valorisées comme agents antibactériens.

Une nouvelle alternative qui a élargi les perspectives de leurs applications en répondant en même temps aux exigences de biocompatibilité, a été l'utilisation de biopolymères : ceci a ouvert la voie à un résultat prometteur pour la biotechnologie.

On distingue généralement deux voies de synthèse de nanoparticules dites *in situ* et *ex situ*. La voie *in situ* consiste à introduire le sel d'argent dans la solution de polymère. Après évaporation du solvant, les ions métalliques, sont réduits (par voie chimique, thermique ou physique) pour former les nanoparticules et on obtient ainsi le nanocomposite. Quand à la voie *ex situ*, elle consiste d'abord à réduire les ions argent en présence d'un agent stabilisant et les introduire par la suite dans une matrice polymère, on obtient après évaporation du solvant le nanocomposite.

La littérature comporte plusieurs articles qui traitent la synthèse de nanoparticules d'argent en solution aqueuse, mais très peu d'entre eux étudie leur redispersion dans une matrice polymère biodégradable pour l'élaboration *ex situ* de nanocomposites [2].

De même, très peu d'études, voire aucune, ne concerne la synthèse *in situ* des nanoparticules d'argent dans une matrice polyélectrolyte alginate par irradiation UV.

Ce travail de thèse a pour objectif de proposer un procédé d'élaboration de nanoparticules d'argent, propre vis-a-vis de l'environnement. Pour répondre à ce critère, nous avons choisi d'élaborer les nanoparticules en dispersion aqueuse, en utilisant l'irradiation UV comme agent réducteur et l'alginate comme agent stabilisant. Les nanoparticules sont par la suite utilisées pour l'élaboration d'un film nanocomposite avec le chitosane.

L'alginate et le chitosane ont donc suscité de l'intérêt pour leur biodégradabilité en environnement, et leur biocompatibilité. En plus le chitosane est très intéressant, pour ses activités bactériostatiques et fongistatiques et plus particulièrement pour ses propriétés filmogènes. On peut ainsi fabriquer des films bionanocomposites à base d'alginate de nanoparticules d'argent et de chitosane sans utiliser d'additifs.

Dans cette optique, un travail interdisciplinaire a été entrepris avec pour objectifs de :

- (i) Mettre au point un procédé de synthèse des nanoparticules d'argent en phase aqueuse, en utilisant l'alginate comme agent stabilisant, par irradiation UV à différents temps.
- (ii) Elaborer un film nanocomposite par coacervation complexe entre l'agent stabilisant renfermant les nanoparticules d'argent et le chitosane donc par voie ex-situ.
- (iii) Evaluer l'efficacité biocide des films élaborés sur des bactéries à gram positif et gram négatif.

Ce travail se compose de quatre chapitres. La première partie du premier chapitre est une étude bibliographique qui s'intéresse à la description des nanoparticules d'argent : leurs propriétés, leurs méthodes de synthèse, avec un regard particulier sur leurs applications dans le domaine de la biotechnologie. Ensuite, une deuxième partie qui s'intéressera à la description des travaux sur la synthèse de nanocomposites polymère-argent et les différents procédés existant à l'heure actuelle et enfin une description des polyélectrolytes naturels utilisés dans notre travail.

Le deuxième chapitre matériaux et méthodes, sera consacré à la description des matériaux utilisés et techniques d'analyses et de mesure utilisées pour la caractérisation des nanoparticules synthétisées et des films nanocomposites élaborés.

Les résultats et discussions feront l'objet des chapitre III et IV. Nous nous intéresserons à la description du procédé d'obtention des nanoparticules d'argent et l'étude de leurs spectres de résonance plasmon de surface et diffusion dynamique de lumière ; dans le chapitre III, et nous présenterons les procédé d'élaboration et les résultats d'analyses des nanocomposites alginate-nanoparticules d'argent- chitosane élaborés par voie ex-situ, qui consistera à introduire les dispersions aqueuses de nanoparticules d'argent synthétisées dans une matrice chitosane par simple agitation. Les propriétés physicochimiques et antibactériennes des différents matériaux seront étudiées.

[1] MTIMET M. Issam, ‘‘ Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent’’, thèse de doctorat de l'INSA de ROUEN, 2011,156.

[2] ANDRIEUX-LEDIER Amandine, ‘‘Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels metallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques, 2012,164.

CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Introduction

Les nanoparticules sont des particules de taille variant entre 1 et 100 nm [1]. Elles présentent des propriétés spécifiques par rapport au matériau massif, dues au rapport surface/volume très grand. On a conclu [2] qu'il existe une dimension critique, qui est considérablement inférieure à 100 nm, à laquelle les propriétés des particules changent. Cette dimension critique est identifiée entre 20-30 nm en reliant l'élévation exponentielle dans le nombre d'atomes localisés à la surface aux dimensions des nanoparticules (figure.I.1.a). Une simple présentation de ce phénomène est illustré dans la figure I.1.b [3].

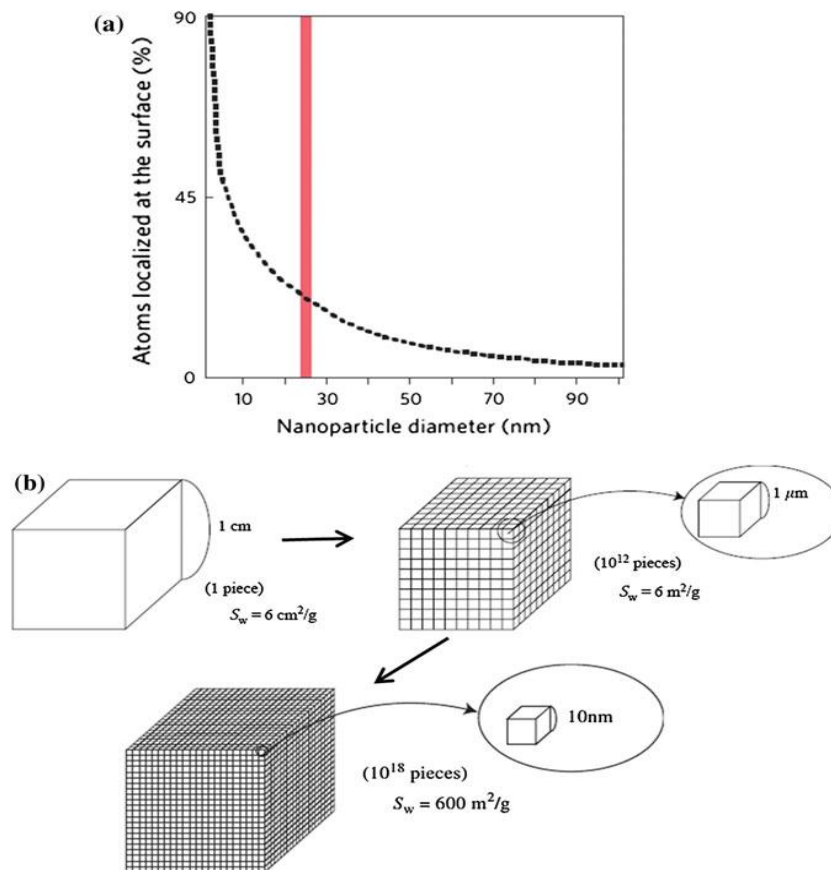


Fig I.1 : a). Courbe montrant la relation entre le diamètre des nanoparticules et leur surface; le trait rouge montre le changement de propriétés entre le matériau massif et les nanoparticules. b). Changement dans la surface spécifique (S_w) d'un cube (solide, densité 1 g/cm³) en changeant la longueur du côté. Adapté de la référence [4].

La synthèse des nanoparticules métalliques est devenue le centre d'intérêt dans la recherche et la technologie : elles présentent des propriétés chimiques et physiques qui permettent leur application dans plusieurs domaines : l'imagerie biologique des tumeurs et la thérapie photothermique du cancer [5-7], en catalyse [8], en photonique [9,10], en électronique [11] ...etc.

Leur préparation, nécessite l'utilisation d'agents stabilisants qui s'adsorbent à la surface des particules pour former une couche protectrice et limitent leur agrégation. Les polymères sont très souvent utilisés pour la stabilisation et/ou la synthèse des nanoparticules dans l'eau. Ils peuvent empêcher stériquement et/ou électrostériquement leur agrégation. En comparaison avec des polymères hydrosolubles : les polyélectrolytes peuvent mieux stabiliser les nanoparticules [12].

Les nanoparticules métalliques peuvent être introduites dans une matrice polymère pour former des nanocomposites présentant des propriétés optiques, catalytiques ou encore antimicrobiennes excellentes. De nombreuses méthodes ont été développées pour incorporer des nanoparticules métalliques dans un polymère [13,14,15].

Les efforts de recherche, se tournent actuellement vers l'amélioration des méthodes de synthèse : en particulier l'utilisation de produits naturels biodégradables, biocompatibles qui répondent aux procédés de chimie verte. C'est dans ce contexte que, nous souhaitons contribuer à l'état de l'art dans la préparation de nanoparticules métalliques, par :

- La préparation de nanoparticules d'argent en solution aqueuse par irradiation UV.
- L'utilisation d'agents stabilisants à base de polysaccharides naturels : l'alginate.
- L'introduction de ces nanoparticules dans une matrice polymère naturel : le chitosane : donc l'élaboration de films nanocomposites alginate-AgNPs-chitosan, et la détermination de leurs propriétés antibactériennes pour des bactéries à Gram+ et Gram-.

L'argent du métal aux nanoparticules

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. Il puise son nom d'un étymon indo-européen "arg" équivalent à l'ancienne langue de l'Inde-sanskrit "ar-jun" signifiant brillant.

L'argent limite la propagation des infections et améliore l'hygiène quotidienne : ceci est connue et utilisé depuis plus de 7000 ans [16,17]. Les Romains l'ont employé pour soigner les blessures, les brûlures et les ulcères [18]. 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 [16]. Ses qualités antimicrobiennes, ont été admises dès l'identification des bactéries comme agents responsables d'infections [19]. 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 utilisées jusqu'à la découverte des antibiotiques [20].

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 de nanoparticules d'argent [21].

En raison de leur très petite taille, les nanoparticules d'argent montrent des propriétés physicochimiques, et des activités biologiques très intéressantes [22].

I.1. 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 [23]. Le *Tableau I.1* montre les propriétés caractéristiques de l'argent.

Tableau.I.1: Propriétés physiques de l'argent [24].

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

I.2. Applications des nanoparticules d'argent

En raison de leur réactivité élevée et de leur capacité à libérer, de manière contrôlée et durable les ions Ag⁺, l'utilisation de nanoparticules d'argent connaît un essor très important depuis la fin des années 1990 [25]. Les nanoparticules d'argent sont largement utilisées dans de nombreux domaines : aujourd'hui, on assiste à une véritable explosion du marché des produits contenant des nanoparticules d'argent.

1.2.1. Application dans l'industrie pharmaceutique et médicale

1.2.1.1. Pansements

L'argent a été largement utilisé pour le traitement des brûlures, avec les ions Ag^+ ou avec des nanoparticules d'argent incorporées dans des bandages pour envelopper de larges plaies ouvertes [26]. Beaucoup de pansements revêtus ou contenant de l'argent sont maintenant disponibles pour le traitement de blessures [27].

Le sulfadiazine d'argent a été acceptée comme traitement standard pour les brûlures chez les animaux et les humains [28]. Il produit une meilleure guérison des brûlures en raison de sa réaction lente et régulière avec le sérum et les autres fluides corporels [29].

Les pansements d'argent nanocristallin, les crèmes et les gels, réduisent efficacement les infections bactériennes dans les plaies chroniques [30,31]. Par exemple, l'argent dans les fibres poly (alcool vinylique), présente des propriétés antimicrobiennes efficaces comme pansement [32,33]. Le composite argent / poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) a fonctionné comme un bactéricide appliquée dans les cas compliqués de brûlures infectées et de plaies purulentes.

1.2.1.2. Produits pour comblement osseux

Le ciment osseux est utilisé pour assurer la fixation de prothèses articulaires, par exemple : dans la chirurgie de remplacement du genou. Les nanoparticules d'argent ont été utilisées en tant qu'additif antimicrobien dans le ciment osseux poly (méthacrylate de méthyle) (PMMA). Ce dernier a été suggéré comme un moyen pour réduire l'incidence de la résistance à travers son mécanisme d'action multiple, et a encore montré une activité antimicrobienne impressionnante et une faible cytotoxicité [34].

Les hydroxyapatites contenant des nanoparticules d'argent ont été préparés avec succès [35]. Le revêtement composite Hydroxyapatite/Ag a été conçu en particulier pour réduire les infections bactériennes après placement d'implant [36].

La Bioactivité, la gamme de dissolution, et les propriétés de résorption, proches de celles des os naturels, se présentent dans l'hydroxyapatite [37]. Ce matériel et ses composites sont des excellents candidats pour de larges applications dans le revêtement des articulations artificielles et des racines dentaires.

Des nanopoudres d'argent-hydroxyapatite dopé ont été synthétisées [38], avec une cristallinité élevée et leurs activités antimicrobiennes ont été examinées. Des études de microscopie à force atomique, montrent que les échantillons d'hydroxyapatite-argent dopé causent des modifications morphologiques des cellules de micro-organismes qui pourraient être la cause de la mort cellulaire.

Les ratios d'hémolyse des échantillons d'hydroxyapatite-argent dopé ont été inférieurs à 3%, ce qui indique la bonne compatibilité sanguine et un biomatériau prometteur pour les tissus échafauds.

Un nouveau composite β -chitine / nanoargent a été développé [39] pour les applications de cicatrisation de plaies utilisant l'hydrogel β -chitine avec des nanoparticules d'argent. Les β -chitine / nanoargent composites préparés étaient bactéricide contre *Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* et ont également montré une bonne capacité de coagulation du sang.

I.2.1.3. Dispositifs implantables

Les dispositifs médicaux imprégnés d'argent comme les masques chirurgicaux et les dispositifs implantables montrent une efficacité antimicrobienne significative [37]. Par exemple, le poly (téréphtalate d'éthylène) (PTE) a été largement utilisé dans les implants cardiovasculaires en raison de ses excellentes propriétés mécaniques et biocompatibilité modérée. Fu et al. [38] ont préparé avec succès des films multicouches de polyélectrolytes naturels contenant des nanoparticules d'argent sur le PET. L'empilement de films AgNPs bien dispersée était efficace pour tuer *E. coli*, et avait une bonne activité anticoagulante et une faible toxicité cellulaire.

I.2.1.4. Dispositifs médicaux désinfectants

L'incidence élevée des infections causées par l'utilisation de dispositifs biomédicaux, a un impact important sur les coûts de soins. De nombreuses études suggèrent une forte activité antimicrobienne de dispositifs médicaux revêtues d'argent [42]. Ces dispositifs, tels que les pansements, les valves cardiaques, les cathéters veineux centraux et les cathéters urinaires, ont été prouvé pour réduire efficacement les infections [43]. Les cathéters de silicone revêtus de nanoparticules d'argent sont efficaces pour réduire l'incidence des infections urinaires associées aux cathéters et organismes résistants à une prise en charge aiguë dans l'hôpital.

L'utilisation d'un cathéter urinaire revêtu d'argent a été décrite [44] dans une étude non contrôlée de 102 patients, dans lesquels aucune prolifération de bactérie ne s'est produite.

I.2.1.5. Biomédecine

Les nanoparticules d'argent présentent une efficacité antimicrobienne contre les particules virales. L'émergence récente de la nanotechnologie a fourni une nouvelle modalité thérapeutique de nanoparticules d'argent pour une utilisation en médecine.

Les nanoparticules d'argent ont montré une activité cytoprotectrice prometteuse vers les cellules infectées par le VIH-1 [45]. Cependant, les effets de ces nanoparticules vers d'autres types de virus restent largement inexplorés.

La découverte d'un mécanisme anti-cancer serait une étape importante pour le traitement du cancer avec des nanoparticules d'argent. La clé du mécanisme est la liaison spécifique des nanoparticules d'argent vers les cellules cancéreuses seules à cause des différences morphologiques entre les cellules cancéreuses et les autres cellules du corps : la morphologie des cellules cancéreuses est plus favorable à l'activité anti-cancéreuse de nanoparticules d'argent [46].

I.2.2. Emballage alimentaire antibactérien

Les emballages antibactériens sont utilisés pour empêcher la contamination bactérienne dans les produits alimentaires [25]. Si des nanocomposites antimicrobiens à base d'argent sont incorporés dans des matériaux d'emballage, la contamination microbienne peut être contrôlée en réduisant le taux de croissance des micro-organismes.

Les 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). En outre, de nombreux matériaux biodégradables, tels que l'amidon, le chitosan, l'alginate ont été utilisés pour fabriquer des films composites à base de nanoparticules d'argent.

Récemment, certaines études se sont concentrées sur la fabrication du papier filtre biodégradable comme une alternative intéressante pour les matériaux d'emballage respectueux de l'environnement. On a développé des papiers filtres ordinaires [47] comme matériau d'emballage antimicrobiens par greffage de monomères vinyliques comme l'acrylamide sur les macromolécules de cellulose suivi par chargement de nanoparticules d'argent.

I.2.3. Désinfection et contrôle microbien de l'eau

Les nanoparticules d'argent ont été utilisées dans les stations d'épuration pour le traitement des eaux usées [48] et ont montré une activité antibactérienne intéressante.

On a préparé des membranes asymétriques polyéthersulfone chargée d'argent (PSE) [49]. Les nanoparticules d'argent étaient formées dans les membranes PES lorsque la polyvinylpyrrolidone (PVP) a été ajouté au cours de la préparation.

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%.

Les symptômes de maladies liées à l'eau telles que la diarrhée et la déshydratation peuvent être réduits par l'amélioration de la qualité de l'eau potable. Des composites céramiques poreux contenant des nanoparticules d'argent dans les parois intérieures des canaux de céramique poreux avec l'agent de couplage aminosilane *3-aminopropyltriéthoxysilane* (APTES), en tant que pont de liaison, ont été préparés [50].

Combiné à un faible coût et une bonne efficacité en interdisant la croissance d'*E. coli*, de tels matériaux devraient avoir de larges applications dans le traitement de l'eau potable.

I.3.Synthèse de composites antibactériens à base de nanoparticules d'argent

I.3.1. Synthèse de nanoparticules d'argent

L'application des nanoparticules varie avec leurs propriétés physiques, comme la densité apparente, la surface et la morphologie, qui sont fortement liés aux méthodes de préparation et aux produits utilisés. Par exemple, l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent est étroitement liée à leur taille et leur forme [51]. Ainsi, le contrôle de la taille, de la distribution de taille et de la forme des nanoparticules est un paramètre très important dans la synthèse de bionanocomposite antibactérien à base d'argent.

En règle générale, les nanoparticules d'argent peuvent être préparées par des méthodes physiques (évaporation-condensation et procédé d'ablation laser), chimiques (réduction), et biologiques, etc. [52-54]. (figure I.2)

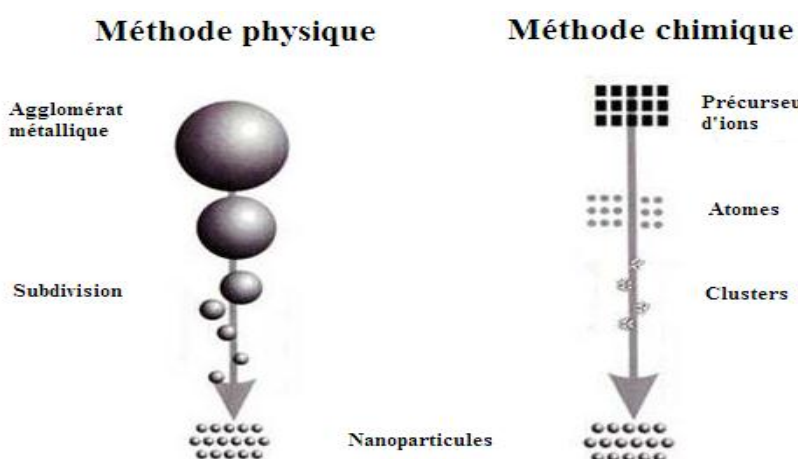


Fig.I.2 : Méthodes de préparation physique et chimique des nanoparticules métalliques

I.3.1.1. Méthodes physiques

Les méthodes mécaniques, telles que l'homogénéisation et le broyage ont été utilisées pour préparer des nanoparticules d'argent pour application antimicrobienne. Mais 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. Une conception de la synthèse de nanoparticules d'argent par un processus de condensation de gaz inerte a été présentée dans une recherche [55].

L'argent a été chauffé avec une régulation de température faible pour produire des vapeurs, qui ont été rapidement refroidi à la surface de réservoir d'azote liquide dans une atmosphère réduite de gaz d'argon. Ils ont constaté que la source de température, le taux d'évaporation, et la pression de l'argon ont affecté considérablement la taille moyenne et la forme des particules.

L'ablation laser dans les liquides a reçu beaucoup d'attention comme nouvelle technique de production de nanoparticules d'argent [56]. D'une manière générale, les nanoparticules d'argent sont obtenues en bombardant une solution contenant les ions Ag^+ . L'avantage de l'ablation laser par rapport à d'autres procédés classiques de la préparation des colloïdes métalliques est l'absence de réactifs chimiques dans la solution. Par conséquent, cette méthode produit des nanoparticules d'argent pures qui peuvent être utiles pour plusieurs applications.

1.3.1.2. Méthodes chimiques

Les méthodes chimiques de préparation de nanoparticules d'argent incluent la réduction chimique en solution aqueuse [57,58], ou organique [59], la réduction électrochimique [60], la voie micellaire inverse [61], la réduction biochimique [62] ...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 [63,64]. De plus, parmi toutes les techniques de synthèse, elle offre probablement le meilleur contrôle de taille, et de forme [65-67]. Elle repose principalement sur l'utilisation de trois composants, soit : un précurseur métallique, un agent réducteur et un agent stabilisant. L'agent réducteur fournit les électrons nécessaires à la transformation chimique des précurseurs métalliques ($M^{n+}X$) en atomes métalliques (M^0).

La réduction chimique permet d'obtenir des nanoparticules avec un rendement dépassant les 90 % en un temps relativement court (quelques secondes). En outre, des nanoparticules de différentes tailles et formes peuvent être facilement préparées en contrôlant les conditions de réaction. Ainsi, par exemple, des nanoparticules d'argent presque sphériques peuvent être préparées par réduction des ions Ag^+ en présence de citrate de sodium. Les cristallites ont un diamètre relativement important (50-100 nm) et présentent une distribution large en taille et en forme [55].

Parmi les agents réducteurs disponibles, on retrouve des gaz, comme l'hydrogène ou le monoxyde de carbone, des hydrures ou des sels, comme le borohydrure de sodium ou le citrate de sodium, des phosphores, des acides, ainsi que des solvants oxydants comme certains alcools [68]. Plus l'agent réducteur est fort, plus petites sont les nanoparticules.

La voie micellaire inverse de synthèse de nanoparticules métalliques est introduite pour obtenir des nanoparticules uniformes de taille contrôlée [69]. Les nanoparticules d'argent obtenues sont bien cristallisées [70], sphériques, de 4 à 6 nm de diamètre, avec une distribution de taille inférieure à 13% et habillées de chaînes d'alcanethiols de différentes longueurs (décane-thiol ou dodécane-thiol).

1.3.1.3. Méthodes biologiques

Les méthodes chimiques permettent la préparation de nanoparticules de taille uniforme et contrôlables ; cependant elles emploient des solvants organiques présentant des risques potentiels pour l'environnement il a donc été nécessaire de recourir aux méthodes biologiques pour développer une approche respectueuse de l'environnement pour la synthèse de nanoparticules d'argent peut être réaliser en utilisant des microorganismes [71], des enzymes [72], et des plantes ou des extraits de plantes [73].

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.

1.3.2. Mécanisme de formation de nanoparticules d'argent

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

1.3.2.1. La nucléation

Les précurseurs métalliques sont dissous puis réduits pour donner des atomes métalliques de valence zéro. La sursaturation élevée en atomes insolubles conduit à la formation de petits agrégats par collision. Cette seconde étape est appelée la nucléation. Elle correspond à la formation localisée d'une nouvelle phase solide thermodynamiquement stable au sein d'une phase liquide. La formation de nucléi entraîne après un certain temps, une diminution de la sursaturation. Par conséquent le taux de nucléation diminue et le nombre de particules dans le système devient constant.

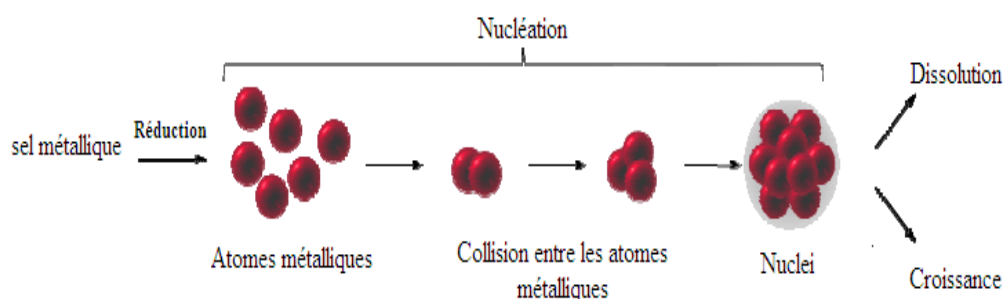


Fig.I.3. Représentation schématique du mécanisme de formation de nanoparticules [74].

1.3.2.2. La croissance

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

1.3.2.3. Le murissement

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.

1.3.3. Stabilisation des nanoparticules d'argent

Les agents stabilisants sont diversifiés et incluent les sels ioniques, les surfactants, les polymères, les dendrimères, les biomolécules ainsi qu'un ensemble de ligands comportant un groupe fonctionnel comme des phosphines, des thiols, des amines ou un acide carboxylique.

En plus de protéger les colloïdes de la coalescence et de l'agglomération, ces agents chimiques définissent la solubilité des nanoparticules et leur confèrent une fonction à la surface.

Dans la stabilisation des colloïdes comme les nanoparticules, deux mécanismes distincts sont normalement utilisés : la stabilisation stérique et la stabilisation électrostatique (figure I.4).

Les stabilisants stériques ont plusieurs origines. Les polymères naturels comme la gélatine, la caséine, la gomme arabique, le blanc d'oeuf et les huiles végétales sont utilisés depuis longtemps dans les peintures et les encres comme des dispersants de pigments.

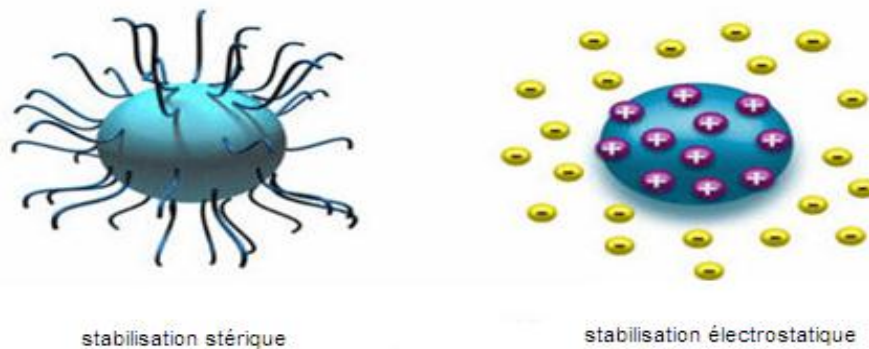


Fig.I.4. Schéma de stabilisation stérique et électrostatique.

Les dispersions stabilisées stériquement sont stables au cisaillement dans une large gamme de tailles de particules. Elles peuvent flocculer en changeant la solvabilité du milieu ou par la désorption du stabilisant [75-76].

Les particules peuvent aussi être stabilisées par des forces électrostatiques générées par l'ionisation de la surface de la particule entraînant l'apparition d'une charge de surface et la formation d'une double couche électrochimique. La double couche électrochimique est due à une répartition des ions près de la surface différente de celles du coeur de la solution (figure I.5).

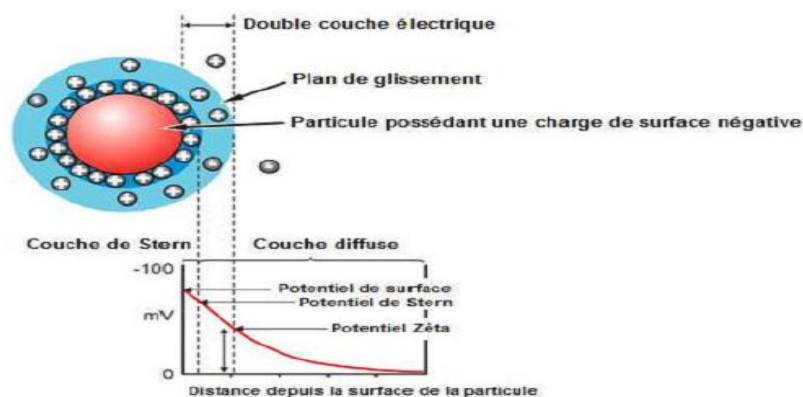


Fig. I.5. Représentation d'une double couche électrochimique

La combinaison des deux mécanismes stérique et électrostatique dans la stabilisation des nanoparticules est aussi bien utilisée. La stabilisation électrostatique est généralement achevée par l'utilisation de polyélectrolytes ou de surfactants ioniques.

1.3.4. Les carbohydrates dans la stabilisation des nanoparticules d'argent

Actuellement, on trouve les polysaccharides parmi les polymères les plus utilisés dans la stabilisation des nanoparticules. En effet, ces derniers sont des agents stabilisants de choix car ils présentent, en plus des hétéroatomes stabilisants [75], l'avantage de posséder un vaste réseau de liaisons hydrogène qui permet une passivation de surface et empêche l'agrégation des nanoparticules [76-80].

Parmi les polysaccharides les plus utilisés se trouvent le chitosane ainsi que l'amidon. Des études [81,82] ont montré que les nanoparticules d'argent sont bien différentes suivant l'agent stabilisant employé. Les auteurs concluent que les fonctions amines secondaires du chitosane modifié interagissent avec les nanoparticules d'argent et conduisent à un effet stabilisant plus efficace. Dans la même idée, le dextrane est également un agent stabilisant de choix [83]. Les liaisons hydrogène sont également impliquées dans la stabilisation de l'argent par le dextrane [84].

En ce qui concerne l'amidon les groupes hydroxyles favorisent l'absorption des ions argent par interaction électrostatique au niveau de la structure hélicoïdale du polysaccharide [85] (figure I.6). Il faut noter que les polysaccharides servent dans ce cas à la fois d'agent stabilisant et réducteur.

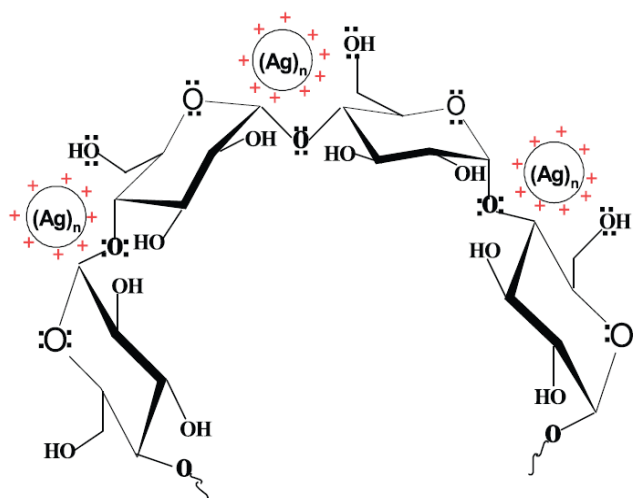


Fig .I.6. Stabilisation de l'argent par l'amidon

1.3.5. Elaboration de nanocomposite à partir de nanoparticules présynthétisées

L'utilisation de polymères comme phase de fixation de nanoparticules est très intéressante en raison de la grande variété de caractéristiques qu'ils peuvent avoir : ils peuvent être isolants ou conducteurs électriques et thermiques, avoir un caractère hydrophobe ou hydrophile, être mécaniquement durs ou mous.

Par ailleurs, l'incorporation des nanoparticules dans les polymères est le moyen le plus simple et le plus commode pour la stabilisation, la manipulation et l'application des métaux nanostructurés [86]. Le phénomène d'agglomération des nanoparticules dans la matrice polymère doit être évité, donc il faut optimiser la dispersion des nanoparticules colloïdales dans la matrice.

Les différentes techniques de préparation de nanocomposites polymère-argent, peuvent être classées en méthodes *ex situ* et *in situ* [87, 88].

1.3.5.1. Méthode *ex situ*

On définit la voie *ex situ* de préparation de nanocomposites par deux étapes : une synthèse préalable des nanoparticules puis leur introduction dans une matrice polymère.

Cela peut être fait par la réduction d'un sel métallique dissous dans un solvant approprié, contenant souvent un polymère stabilisant [89-92].

Ces particules doivent ensuite être incorporées par mélangeage avec une solution de polymère, ou de monomère, qui peut ensuite être moulé ou injecté.

Il est difficile d'obtenir des composites homogènes à cause des phénomènes d'agrégation. Un film PVA nanocomposite a été préparé [93] à partir d'une solution de PVA et d'une solution de nanoparticules d'argent de 5 nm de diamètre, élaborées sans agent stabilisant. Les auteurs ont montré que les nanoparticules se sont agrégées en objets de 20 nm de diamètre dans la matrice polymère.

D'un autre côté [94] on a incorporé des nanoparticules d'argent stabilisées par du polyéthylène glycol (PEG) dans une matrice chitosane. Les nanoparticules de 22 nm sont relativement bien dispersées mais sous forme d'agrégats visibles en microscopie optique. On a préparé des nanoparticules d'argent stabilisées par le chitosane [95], de 25 nm de diamètre et les a incorporé ensuite dans des matrices chitosane et amidon. Les propriétés antimicrobiennes de ces films *ex situ* ont été bien démontrées.

1.3.5.2. Méthodes *in situ*

Les méthodes *in situ*, utilisées pour la préparation de nanocomposites métal polymère sont très variées. Elles sont souvent moins simples que les méthodes *ex situ*, mais conduisent à des matériaux nanocomposites de qualité plus contrôlée.

Elles consistent à introduire des ions métalliques dans un polymère ou dans un monomère qui est ensuite polymérisé. Ces ions métalliques, qui se trouvent dans la matrice du polymère, sont réduits chimiquement, thermiquement ou par irradiation UV, pour former les nanoparticules.

Les avantages de la méthode d'irradiation UV sont nombreux. C'est notamment un processus vert évitant l'utilisation de solvants toxiques et nuisibles. Elle permet de contrôler la taille des nanoparticules et éviter leur agrégation pendant le traitement.

Des nanoparticules d'argent ont été préparées [96] dans une matrice polyamide imide. On a utilisé le méthanol pour gonfler le polymère tandis que le NaBH_4 en excès réduit les sels métalliques introduits à 15%. La taille des nanoparticules obtenues varie de (1 à 30 nm). Les auteurs ont montré que les conditions de préparation du film précurseur sont importantes : une agitation suffisante et un bon solvant du polymère sont nécessaires pour former le film précurseur et réduire ensuite la distribution des tailles et l'agrégation des nanoparticules obtenues par traitement chimique *in situ*.

On a préparé [97] des films PVA chargés de nanoparticules générées par voie *in situ* au cours d'une exposition UV (de 2 à 6 h à température ambiante, à 5 cm de la source avec $\lambda=254$ nm). La spectroscopie UV-Visible permet de deviner une augmentation de la taille même après 8h d'exposition.

Une étude [98] a montré l'influence de la température sur la réduction des ions Ag^+ , ainsi que sur la taille des nanoparticules formées *in situ* dans une matrice PVA. Les films sont traités thermiquement entre 50 et 110°C sur des temps inférieurs à 1h. Dans ces conditions, les nanoparticules cristallines ne sont formées que pour des températures supérieures ou égales à 90°C. Les nanoparticules d'argent sont globalement de petites tailles. Leur diamètre augmente avec le temps de traitement thermique de 2 à 4 nm pour 30 et 60 min à 110°C respectivement.

I.4. Contexte expérimental : présentation des systèmes

Nous allons aborder dans les paragraphes qui vont suivre la formation de complexes électrostatiques entre polyions et la présentation des systèmes alginate et chitosane objet de notre étude. Cette technologie a suscité, et continue encore, un grand intérêt dans la communauté scientifique et plusieurs revues ont été publiées sur l'association du chitosane avec l'alginate [99,100].

La formation de complexes polyélectrolytes (CPEs) résulte d'interactions électrostatiques attractives entre un polyanion et un polycation en solution aqueuse. Cela signifie que la réaction ne peut se produire qu'à des valeurs de pH au voisinage de l'intervalle pKa des deux polymères (pKa du chitosane est d'environ 6,5, pka de l'alginate de 3.8 à 4.0) [101,102].

Pendant la complexation, les polyélectrolytes peuvent coacerver ou former un hydrogel plus ou moins compact. Cependant, si les interactions ioniques sont trop fortes, des précipitations peuvent se produire, ce qui est assez courant et empêche la formation d'hydrogels.

La précipitation peut être évitée si l'attraction électrolytique est affaiblie par l'addition de sels tels que le NaCl. Leur présence réduit l'attraction entre les polyélectrolytes à charge opposée en contribuant à l'environnement contre-ion. Par conséquent, il n'y a pas de séparation de phase, et on obtient un mélange visqueux et macroscopiquement homogène.

D'autres interactions secondaires telles que les liaisons hydrogènes, les interactions hydrophobes et de Van der Waals complètent la formation des CPEs et participent au maintien de la stabilité du système.

Les complexes polyélectrolytes sont utilisés dans de nombreux domaines qui vont de l'industrie alimentaire aux applications biomédicales [103,104]. Parmi ces dernières, le relargage contrôlé de principes actifs constitue un axe de recherche en pleine expansion. En effet, les complexes hydrogels se sont avérés d'excellents hôtes de molécules actives et permettent un relargage contrôlé dans le temps [105,106]. Les systèmes issus de la complexation du chitosane et de divers polyanions de types polysaccharides sont utilisés comme « bioréacteurs » pour la culture cellulaire [107], ou encore dans le domaine de l'ingénierie tissulaire en tant que reconstituteurs de tissu [108] ou de la peau [109].

1.4.1. L'alginate

Les alginates sont des polymères naturels anioniques qui appartiennent au groupe de polysaccharides extraits d'algues brunes sous forme d'acide alginique. Ils offrent à l'algue sa rigidité et permettent d'éviter son dessèchement lors de l'exposition à marée basse. On les trouve dans le *mucilage* des algues brunes, sous forme d'un sel insoluble.

L'alginate trouve ses applications principales dans le domaine alimentaire. Il est utilisé pour ses propriétés colloïdales en tant qu'épaississant, agent filmogène, gélifiant, stabilisant, etc. Il existe bien d'autres applications comme le montre le tableau I.1, telles que les matériaux d'empreinte dentaire, impression sur textiles ...

Tableau I.2. Quelques utilisations des alginates [110]

<i>Application</i>	<i>Rôle</i>
Agroalimentaire	Agent texturant (épaississant ou gélifiant)
Industrie du papier	Amélioration de l'uniformité de surface
Production des céramiques	Réduction du dessèchement des surfaces, stabilisant
Pharmaceutique et biotechnologie	Immobilisation de cellules, diffusion contrôlée de principes actifs, dermatologie et guérison des plaies, empreintes dentaires
Crémage du latex	Concentration du latex naturel durant son extraction
Impression des textiles	Fixation, homogénéité de l'impression, bons contrastes et couleurs des motifs imprimés

I.4.1.1. Composition chimique de l'alginate

L'acide alginique est un polysaccharide constitué de deux unités acides uroniques : l'acide β -D-mannuronique (M) et son épimère en C5, l'acide α -L-guluronique (G) dont la séquence varie [111] (figure I.7).

En effectuant une hydrolyse acide partielle de l'alginate, il est possible de séparer celui-ci en trois fractions caractéristiques [112].

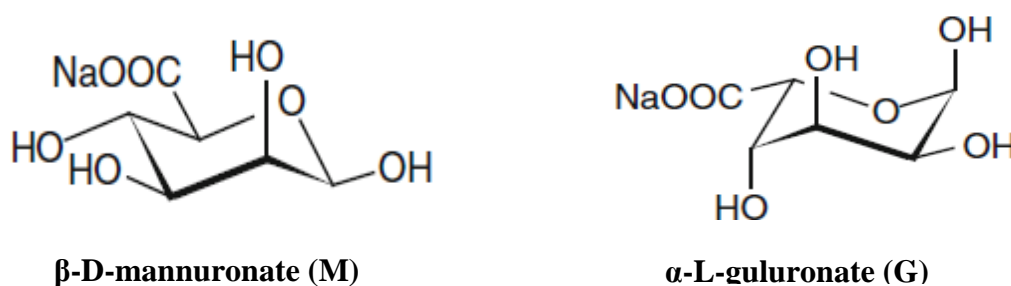


Figure.I.7. Monomères de la chaîne Alginate.

- Deux d'entre elles contiennent des ensembles homopolymères de motifs G et M respectivement.
- Une troisième possède des proportions presque égales des deux monomères sous la forme majoritaire de dimères MG.

Les alginates sont donc considérés comme des copolymères à blocs composés de régions homopolymères de M (blocs MM) et G (blocs GG) séparées par des zones aux structures alternées (blocs MG).

L'étude des alginates riches en mannuronate et en guluronate a montré que les blocs guluronates ont une conformation chaise 1C_4 (les carbones 1 et 4 sont respectivement au-dessus et en dessous du plan moyen de la molécule) alors que les blocs mannuronates ont une conformation chaise 4C_1 (figure I.8). De plus, les alginates possèdent les quatre types de liaisons glycosidiques possibles : diéquatorial (MM), diaxial (GG), équatorial-axial (MG) et axial-équatorial (GM) [113].

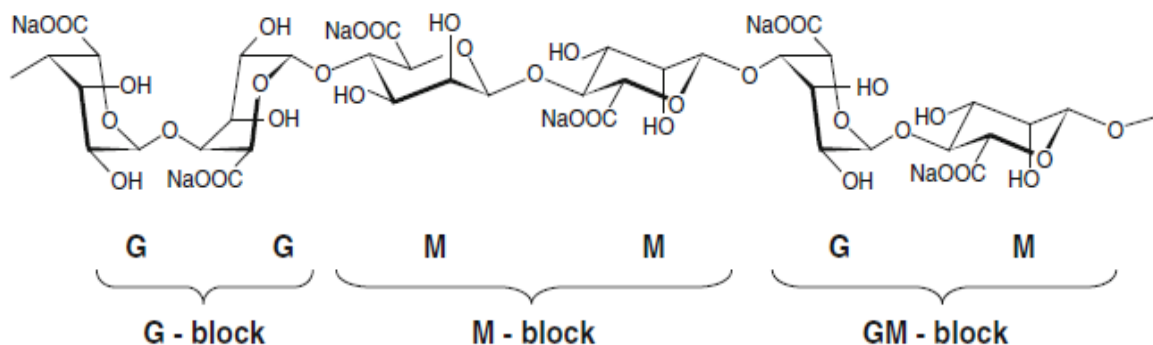


Figure I.8. Conformation des monomères de l'alginate.

La structure des segments polyacide mannuronique est très proche de celle de la cellulose. Les liaisons diéquatoriales entre unités M donnent à ces segments une structure aplatie, de type ruban. Cette structure est stabilisée grâce à des liaisons hydrogène (figure.I.9). Par exemple, le groupement hydroxyle en C₃ du monomère (M+1) interagit avec l'atome d'oxygène du cycle du monomère (M).

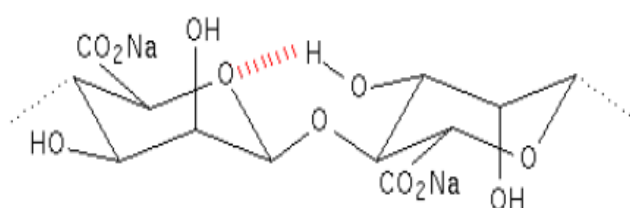


Fig.I.9 : Interactions entre les unités M de l'alginate.

La liaison diaxiale (GG) est très différente de la liaison (MM) car sa structure n'est pas plate et adopte l'arrangement plus rigide d'une boucle. Cette structure est aussi stabilisée par différentes liaisons hydrogène (figure I.10). Par exemple, le groupement hydroxyle en C₂ du monomère G et le groupement carboxyle du monomère (G+1) interagit par ce type de liaisons.

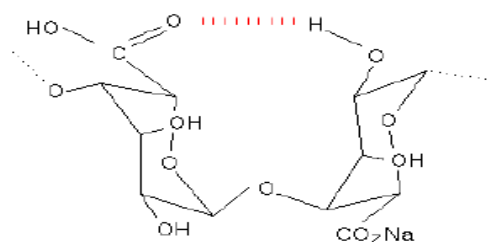


Fig.I.10. Interactions entre les unités G de l'alginate.

Les blocs MG sont caractérisés par une alternance entre des liaisons axiales-équatoriales et des liaisons équatoriales-axiales. De telles variations dans la tacticité de la chaîne sont responsables d'une plus grande flexibilité des blocs MG comparés aux autres blocs. La rigidité des blocs augmente dans l'ordre : $MG < MM < GG$.

1.4.2. Le chitosane

Le chitosane est un copolymère linéaire flexible de 2-acétamido-2-déoxy- β -D-glucopyranose et 2-amino-2-déoxy- β -D-glucopyranose. C'est un polysaccharide tel la cellulose. Il est obtenu par N-déacétylation d'un des polymères naturels les plus abondants, la chitine, extraite des carapaces de crustacés tels que les crabes et les crevettes [114,115].

La figure.I.11 représente les motifs de la cellulose, de la chitine et du chitosane. Leurs structures diffèrent au niveau des groupements en position C_2 ; hydroxyle pour la cellulose, acétamide pour la chitine et amine pour le chitosane.

La chitine étant insoluble dans l'eau et de nombreux autres solvants, on ne peut l'utiliser que sous forme de chitosane [114,117].

On définit le degré de déacétylation (DDA) du chitosane par le pourcentage d'unités déacétylées par rapport au nombre d'unités totales. Le terme chitosane s'applique à tout copolymère dont le degré de déacétylation (DDA) est supérieur à 50%.

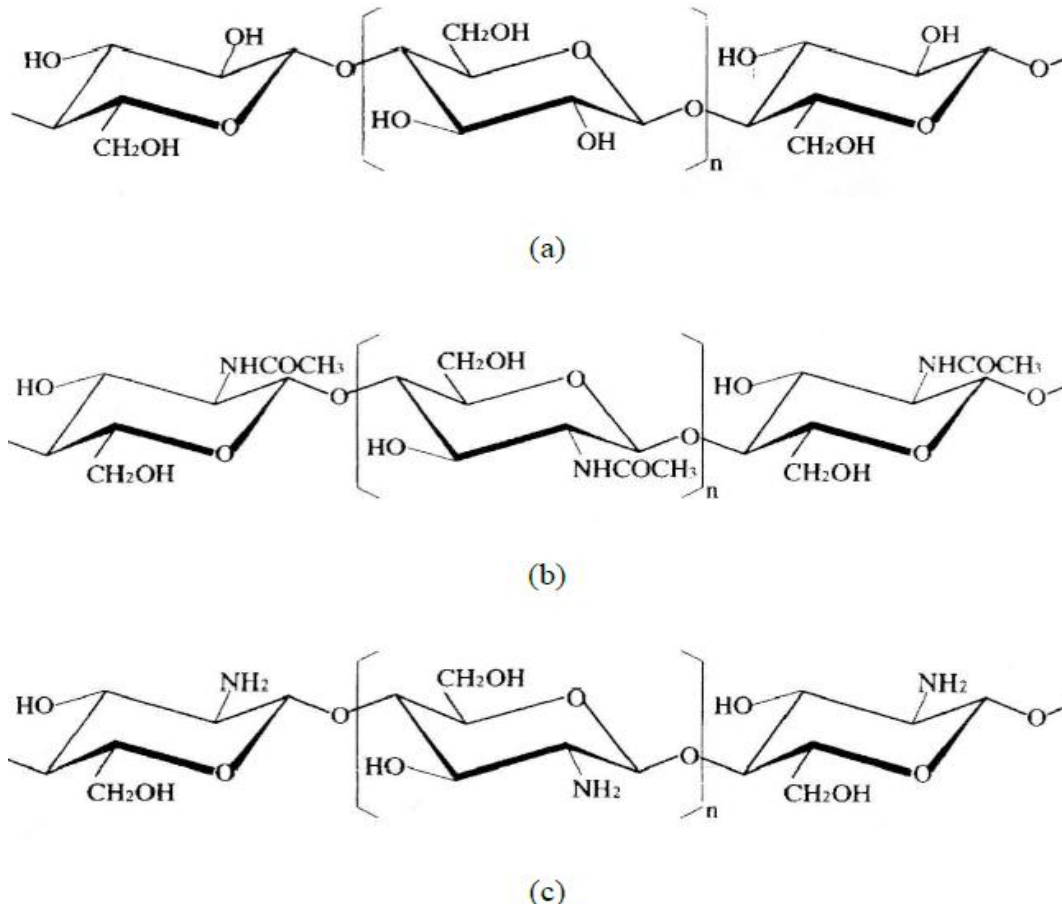


Fig.I.11. Molécules de la cellulose (a), de la chitine (b) et du chitosane (c). Adapté de la référence [116].

I.4.2.1. Propriétés physico-chimiques

1) Solubilité

Le chitosane montre une structure irrégulière semi-cristalline à l'état solide; lorsque celui-ci est de faible poids moléculaire et 100% déacétylé, sa structure est cristalline. Le chitosane sous forme -NH_2 est insoluble dans l'eau, dans les acides concentrés, les bases et les solvants organiques. Ce sont ses propriétés acido-basiques qui permettent une dissolution facile. En effet, il est soluble dans les acides dilués grâce à la protonation de ses groupes amines : le chitosane se comporte comme un polyélectrolyte cationique de forte densité de charge en solution acide dilué,



Comme pour tout polyélectrolyte, le pKa du chitosane dépend plus particulièrement du degré de neutralisation des groupes NH_3^+ . Le pKa va également dépendre du degré d'acétylation (DA). En effet, la densité de charges varie d'un DA à l'autre pour un même degré de neutralisation de groupements NH_3^+ . Toutefois, quelle que soit la valeur du DA (comprise entre 0 et 25 %), pour des masses moléculaires suffisamment élevées, la valeur limite du pKa obtenue à un degré de neutralisation égal à 1, est $\text{pK}_o = 6.5$, pK_o étant le pKa intrinsèque du chitosane. La solubilité du chitosane varie donc en fonction de la distribution et du pourcentage d'acétylation sur les chaînes [119,122,121].

2) *Caractérisation du chitosane*

La conformation des chaînes du polymère en solution dépend du pH et du degré de déacétylation (DDA). Lorsque la densité de charge sur la chaîne de polymère est élevée, la viscosité est importante. En revanche, lorsque le polymère est peu chargé, les chaînes sont sous forme de pelotes statistiques caractérisées par une faible viscosité. [119,122, 123].

a) Masse moléculaire moyenne

La masse moléculaire moyenne du chitosane peut être caractérisé par viscosimétrie, il est nécessaire de connaître les paramètres K et a de la relation de *Mark-Houwink et Sakurada* :

$$[\eta] = K M^a$$

Où: $[\eta]$: viscosité intrinsèque

M : Poids moléculaire moyen

a et K : constantes pour un système solvant/soluté donné.

Ces méthodes présentent certains problèmes. En effet, la présence possible de microgels ou d'agrégats favorisés par les liaisons hydrogènes, des variations dans la force ionique, l'influence du vieillissement des solutions et des effets électrostatiques (dus aux charges des groupes amines protonés) induisent des erreurs de calculs [124].

b) Degré de déacétylation

Plusieurs méthodes ont été développées pour déterminer le degré de déacétylation DDA du chitosane. Ces méthodes sont classées en trois catégories:

- Méthodes spectroscopiques : spectroscopie IR, RMN_H, RMN_{C13}, RMN_{N15} et UV.
- Méthodes classiques : divers types de titrage, conductométrie, potentiométrie...
- Méthodes destructives : analyse élémentaire, hydrolyse acide ou enzymatique de la chitine / chitosane et suivie de la mesure DA par colorimétrie ou chromatographie liquide haute performance, chromatographie pyrolyse-gaz et analyse thermique par calorimétrie différentielle.

Ces méthodes ont été comparées pour leurs performances et limitations ainsi que leurs avantages et inconvénients. L'utilisation de procédés de spectroscopie IR et RMN offre un certain nombre d'avantages. Ils n'ont pas besoin de procédures à long terme pour préparer des échantillons, et ils fournissent des informations sur la structure chimique.

La RMN_H et les techniques UV sont plus sensibles que la spectroscopie IR, RMN_{C13} et RMN_{N15}. La technique IR est surtout utilisée pour une évaluation qualitative et des études comparatives. Les méthodes conventionnelles ne sont pas applicables à la chitine hautement acétylée. Les résultats de ces derniers procédés sont affectés par la force ionique du solvant, le pH et la température de la solution. Dans les méthodes destructives, des temps plus longs sont nécessaires pour les mesures par rapport à la spectroscopie et les méthodes conventionnelles, mais ils s'appliquent à toute la gamme du DDA [125].

Il est évident que les laboratoires de recherche ne possèdent pas tous de spectromètre RMN. De plus, cette méthode, bien que probablement la plus précise, n'est pas adaptée aux mesures de routine de DDA en raison de coûts élevés (solvants deutérés, dépréciation des équipements) et la procédure de préparation des échantillons. La plupart des laboratoires doivent travailler sur des techniques moins avancées, plus simples et moins coûteuses : nous avons opté pour la détermination du DDA du chitosane par spectrométrie FTIR détaillée dans le chapitre IV.

3) Complexes électrostatiques

Le chitosane est connu pour posséder de bonnes propriétés chélatantes; les groupements amines $-NH_2$ retrouvés sur les chaînes saccharidiques montrent de fortes interactions avec les ions métalliques. La nature de l'ion métallique est importante car les mécanismes d'interactions varient.

Le chitosane a aussi la capacité de former des complexes électrostatiques dans des conditions acides. On reconnaît deux différents types de complexes électrostatiques : la complexation avec des surfactants de charges opposées et la complexation avec des polyélectrolytes de charges opposées (PE).

Plusieurs complexes sont répertoriés dans la littérature entre le chitosane et certains polymères d'origine naturelle ou synthétique. Les études se basent sur la relation qui existe entre la « stabilité » du système polymérique et la nature des groupements ioniques entrant en jeu. On retrouve divers complexes électrostatiques formés avec l'acide polyacrylique, le xanthane, certains carragénanes, l'alginate, la pectine, l'héparine, l'acide hyaluronique ou encore la chondroïtine [126,127,128].

Selon les conditions expérimentales, la complexation avec l'alginate ou l'acide hyaluronique montre l'interaction entre les groupements carboxylates ($-COO^-$) et les fonctions amines protonées ($-NH_3^+$) du chitosane [129].

I.4.2.2. Applications du chitosane

La nature et le nombre d'unités glycosidiques confèrent au chitosane des propriétés filmogènes. En outre, ces films présentent une perméabilité importante.

Le chitosane est biocompatible, biodégradable et non toxique. Il trouve donc des applications dans plusieurs domaines (agriculture, santé...) en mettant à profit ses diverses propriétés spécifiques. Son utilisation dans les secteurs économiquement porteurs comme les industries alimentaires, cosmétiques, pharmaceutiques ou agricoles -comme le montre le tableau I.2, a fait l'objet de nombreux brevets.

Tableau I.3. Quelques applications du chitosane (adapté de [130]):

Champs d'application	Application
Médecine	Accélération de la cicatrisation et guérison des blessures
Chirurgie plastique	Stimulation de la régénération des tissus
Ingénierie tissulaire	Reconstitution de la peau, régénération osseuse
Pharmacie	Matériel absorbable avec contrôle de libération de principes actifs
	Lentilles de contact
	Adjuvant de vaccination
Chirurgie dentaire	Implants dentaires
Dermatologie	Crèmes de soins
Traitement des eaux	Diminution de turbidité
Alimentaire	Agent de conservation
	Enrobage protecteur (fruits)
Agriculture	Libération de fertilisants et nutriments

Références bibliographiques

- [1] Sharma V K, Yngard R A, Lin Y, Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Adv. Colloid Interface Sci.* **145**, 83–96, (2009).
- [2] 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).
- [3] 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).
- [4] Aravind Dasari, Zhong-Zhen Yu, Yiu-Wing Mai, Polymer Nanocomposites: Towards Multi-Functionality, Engineering Materials and Processes, Editeur Brian Derby, Manchester, UK, Edition 2016.
- [5] Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2115–2120, (2006).
- [6] Li Z., Huang P., Zhang X., Lin J., Yang S., Liu B., Gao F., Xi P., Ren Q., RGD-conjugated dendrimer-modified gold nanorods for in vivo tumor targeting and photothermal therapy, *Mol. Phar.*, **7**, 94–104, (2010).
- [7] Lee S. E., Sasaki D. Y., Perroud T. D., Yoo D., Patel K. D., Lee L. P: Enhancement of *in vitro* Translation by Gold Nanoparticle – DNA Conjugates, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 14066–14074, (2009).
- [8] Bawendi, M. G., Steigerwald, M. L., and Brus, L. E. The Quantum Mechanics of Larger Semiconductor Clusters ("Quantum Dots"), *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **41**, 477–496, (1990).
- [9] Wang, W. and Asher, S. A. Photochemical Incorporation of Silver Quantum Dots in Monodisperse Silica Colloids for Photonic Crystal Applications, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 12528–12535, (2001).
- [10] Wang, Y. and Toshima, N. Preparation of Pd–Pt Bimetallic Colloids with Controllable Core/Shell Structures, *J. Phy. Chem. B*, **101**, 5301–5306 (1997).

- [11] Kumar V, Yadav S K, Plant-mediaed synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. *J Chem Technol Biotechnol* **84**, 151–157, (2009).
- [12] Rahmi Kamil. ‘stabilisation de nanoparticules dans l’eau par des copolymères a blocs’ Thèse de doctorat de l’université de Toulouse, 2008, 246.
- [13] Li HX; Rothberg LJ, “Label-free colorimetric detection of specific sequences in genomic DNA amplified by the polymerase chain reaction” *Journal of the American Chemical Society*, **126**, (35), 10958-10961, (2004).
- [14] Karim MR, Lim KT, Lee CJ, Bhuiyan MT, Kim HJ, Park LS and Lee MS, “Synthesis of coreshell silver-polyaniline nanocomposites by gamma radiolysis method”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **45** (24), 5741–5747, (2004).
- [15] Kong HY and Jang J, “Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles”, *Langmuir*, **24**, 2051–2056, (2004).
- [16] 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).
- [17] Lansdown ABG, “ Silver I: its antibacterial properties and mechanism of action”, *J. Wound Care*, **11** , 125, (2002).
- [18] 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).
- [19] Klasen HJ, “Historical review of the use of silver in the treatment of burns I”, *Early uses, Burns*, **26** , 117, (2000).
- [20] Fox CL, Modak SM,” Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections”, *Antimicro Agents Chemother*, **5** (6), 582–588, (1974).

- [21] Duran N, Marcarto 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).
- [22] Rai M, Yadav A, Gade A, "Silver nanoparticles: As a new generation of antimicrobials", *Biotechnol Adv*, **27**, 76–83, (2009).
- [23] Silver S, "Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds", *FEMS Microbiol. Rev.*, **27**, 341, (2003).
- [24] Djeghboub Widad, "Nanoparticules d'or et d'argent deposees sur oxide de cerium synthetisees sous irradiation", Thèse de Magister, 2010,99.
- [25] MTIMET Issam, "Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent", thèse de doctorat, INSA de Rouen, 2011, 156.
- [26] George N, Faoagali J and Muller M, "Silvazine (silver sulfadiazine and chlorhexidine) activity against 200 clinical isolates" *Burns*, **23**, 493–495, (1997).
- [27] Illingworth B, Bianco RW and Weisberg S, "In vivo efficacy of silver coated fabric against Staph. Epidermidis", *Journal of Heart Valve Disease*, **9**, 135–141, (2000).
- [28] Tsipouras N, Rix CJ and Brady PH, "Passage of silver ions through membrane-mimetic materials, and its relevance to treatment of burn wounds with silver sulfadiazine cream" *Clinical Chemistry*, **43(2)**, 290–301, (1997).
- [29] Fox CL and Modak SM, "Mechanism of silver sulfadiazine action on burn wound infections", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **5(6)**, 582–528, (1974).
- [30] Richard JW, Spencer BA, McCoy LF, Carina E, Washington J and Edgar P, "Acticoat versus silver ion: the truth", *Journal of Burns and Surgical Wound Care*, **1**, 11–20, (2002).
- [31] Ip M, Lui SL, Poon VKM, Lung I and Burd A, "Antimicrobial activities of silver dressings an in vitro comparison", *Journal of Medical Microbiology*, **55**, 59–63, (2006).

- [32] Jia J, Duan YY, Wang SH, Zhang SF and Wang ZY, "Preparation and characterization of antibacterial silver-containing nanofibers for wound dressing applications", *Journal of US-China Medical Science*, **4(2)**, 52–54, (2007).
- [33] Hong KH, "Preparation and properties of electrospun poly(vinyl alcohol)/silver fiber web as wound dressings", *Polymer Engineering & Science*, **47(1)**, 43–49, (2007).
- [34] Alt V, "An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement", *Biomaterials*, **25**, 4383–4391, (2004).
- [35] Liu JK, Yang XH and Tian XG, "Preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres", *Powder Technology*, **184**, 21–24, (2008).
- [36] Chen W, Liu Y, Courtney HS, Bettenga M, Agrawal CM, Bumgardner JD and Ong JL, "In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron cosputtered silver-containing hydroxyapatite coating", *Biomaterials*, **27**, 5512–5517, (2008).
- [37] Anne Cecile DERRIEU, "Synthèse et caractérisation physico-chimique de matériaux géo-polymères. Application: cinétique de minéralisation de géopolymères et du biomatériau CaCO_3 synthétique", Université de Rennes1, 2004,256.
- [38] Vojislav S, Djordje J, Suzana D, Sladjana BT, Miodrag M, Mirjana SP, Aleksandra K, Dragoljub J and Slavica R, "Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering", *Applied Surface Science*, **257**, 4510–4518, (2011).
- [39] Kumar PT, Abhilash S, Manzoor K, Nair SV, Tamura H and Jayakumar R. Preparation and characterization of novel chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, **80**: 761–767 (2010).
- [40] Wang J, Huang N, Yang P, Leng YX, Sun H, Liu ZY and Chu PK, "The effects of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion", *Biomaterials*, **25**, 3063–3070, (2011).

- [41] 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).
- [42] Ciresi DL, Albrecht RM, Volkers PA and Scholten DJ, "Failure of antiseptic bonding to prevent central venous catheter related infection and sepsis", *American Surgeon*, **62**, 641–645, (1996).
- [43] Shao W and Zhao Q, "Influence of reducers on nanostructure and surface energy of silver coatings and bacterial adhesion", *Surface & Coatings Technology*, **204**, 1288–1294, (2010).
- [44] Akyiama H and Okamoto S, "Prophylaxis of indwelling urethral catheter infection: clinical experience with a modified Foley catheter and drainage system", *Journal of Urology*, **121**, 40–48, (1979).
- [45] 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).
- [46] Vaidyanathan R, Kalishwaralal K, Gopalram S and Gurunathan S, "Nanosilver-The burgeoning therapeutic molecule and its green synthesis", *Biotechnology Advances*, **27**, 924–937, (2009).
- [47] Tankhiwale R and Bajpai SK, "Graft copolymerization onto cellulose-based filter paper and its further development as silver nanoparticles loaded antibacterial food-packaging material", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **69**, 164–168, (2009).
- [48] 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).
- [49] Basri H, Ismail AF, Aziz M, Nagai K, Matsuura T, Abdullah MS and Ng BC, "Silver-filled polyethersulfone membranes for antibacterial applications-Effect of PVP and TAP addition on silver dispersion", *Desalination*, **261**, 264–271, (2010).

- [50] Lva YH, Liu H, Wang Z, Liu SJ, Hao LJ, Sang YH, Liu D, Wang JY and Boughtone RI, “Silver nanoparticle-decorated porous ceramic composite for water treatment”, *Journal of Membrane Science*, **331**, 50–56, (2009).
- [51] Zahir MH, Suzuki T, Fujishiro Y and Awano M, “Perovskites with cotton-like morphology consisting of nanoparticles and nanorods: their synthesis by the combustion method and their NO_x adsorption”, *Applied Catalysis A*, **361**, 86–92, (2009).
- [52] Li QL, Mahendra S, Delina YL, Lena B, Michael VL, Li D and Pedro JJ, “Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications”, *Water Research*, **42**, 4591–4602, (2008).
- [53] Andersson M, Pedersen JS and Palmqvist Anders EC, “Silver nanoparticle formation in microemulsions acting both as template and reducing agent”, *Langmuir*, **21(24)**, 11387–11396, (2005).
- [54] Das MR, Sarma RK, Saikia R, Kale VS, Shelke Manjusha V and Sengupta P, “Synthesis of silver nanoparticles in an aqueous suspension of graphene oxide sheets and its antimicrobial activity”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **83(1)**, 16–22, 2011.
- [55] Simchi A, 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).
- [56] Phuoc TX, Soong Y and Chyu MK, “Synthesis of Ag-deionized water nanofluids using multibeam laser ablation in liquids”, *Optics and Lasers in Engineering*, **45 (12)**, 1099–1106, (2006).
- [57] Wang W and Gu BH, “Preparation and Characterization of Silver Nanoparticles at High Concentrations”, *ACS Symposium Series*, **878**, Chapter 1, 1–14.
- [58] 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).

- [59] Gibbons Vernett L and Getman FH, “The potential of silver in non aqueous solutions of silver nitrate”, *Journal of American Chemical Society*, **36(10)**, 2091–2095, (1914).
- [60] Cheng WL, Dong SJ and Wang EK, “Studies of electrochemical quantized capacitance charging of surface ensembles of silver nanoparticles”, *Electrochemistry Communications*, **4(5)**, 412–416, 2002.
- [61] Zhang WZ, Qiao XL and Chen JG, “Synthesis of silver nanoparticles-Effects of concerned parameters in water/oil microemulsion”, *Materials Science and Engineering B*, **142**, 1–15, (2007).
- [62] Narayanan KB and Sakthivel N, “Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes”, *Advances in Colloid and Interface Science*, **156(1–2)**, 1–13, (2010).
- [63] Bulgakova N M and Bulgakov A V, “Pulsed laser ablation of solids: transition from normal vaporization to phase explosion”, *Appl. Phys. A-Mater*, **73**, 199 (2001).
- [64] Shannon M A, “Laser Ablation Mass Removal versus Incident Power Density during Solid Sampling for Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy”, *Anal. Chem.* **67**, 4522 (1995).
- [65] Dupont A, Caminat P, Bournot P and Gauchon JP, “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).
- [66] Zhu S, Lu YF and Hong MH, “Strain-induced phase-matching and tunability of acoustic gratings in fibers “, *Appl. Phys. Lett*, **79**, 1396 (2001).
- [67] Vogel A, “Energy balance of optical breakdown in water at nanosecond at femtosecond time scales”, *Appl. Phys. B-Lasers O.* **68**, 271 (1999).
- [68] John D. Aiken III, Richard G. Finke, “A review of modern transition-metal nanoclusters their synthesis, characterization, and applications in catalysis”, *Journal of Molecular Catalysis A : Chemical*, **145**, 1-44, 1999.

- [69] Petit, C., Lixon P, "In-situ Synthesis of Silver Nanocluster in AOT Reverse Micelles." *Journal of Physical Chemistry*, 97(49), 1999.
- [70] Courty, A., Lisiecki I, "Vibration of self-organized silver nanocrystals", *Journal of Chemical Physics*, **116(18)**, 8074-8078, (2002).
- [71] Nair S, Sasidharan A, Nair S, and Raina S, "Role of size scale of ZnO nanoparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cells", *J.Mater.sci.*, **20**, S235-S241, (2008).
- [72] Willner I, Baron R and Willner B, "Growing metal nanoparticles by enzymes", *Advance Material*, **18**, 1109–1120, (2006).
- [73] Shankar SS, Rai A, Ankamwar B, Singh A, Ahmad A, Sastry M, *Nat. Mater.*, **3**, 482, (2004).
- [74] 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, 2012, 164.
- [75] Bajpai SK, Bajpai M, Gautam D, "In Situ Formation of Silver Nanoparticles in Regenerated Cellulose-Polyacrylic Acid (RC-PAAc) Hydrogels for Antibacterial Application", *J. Macromol. Sci. Part A*, **50**, 46–54, (2013).
- [76] Sharma VK; Yngard RA, Lin Y, "Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities", *Adv. Colloid Interface Sci*, **145**, 83–96, (2009).
- [77] Raveendran P, Fu J, Wallen S L, "A Simple and "green" Method for the Synthesis of Au, Ag, and Au–Ag Alloy Nanoparticles", *Green Chem*, **8**, 34, (2006).
- [78] Shervani Z, Ikushima Y, Sato M, Kawanami H, Hakuta Y, Yokoyama T, Nagase T, Kuneida H, Aramaki K, "Morphology and Size-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles in Aqueous Surfactant Polymer Solutions", *Colloid Polym. Sci*, **286**, 403–410, (2008).
- [79] Tian D, Hu W, Zheng Z, Liu H, Xie H-Q, "Study on in Situ Synthesis of Konjac Glucomannan/silver Nanocomposites via Photochemical Reduction", *J. Appl. Polym. Sci*, **100**, 1323–1327, (2006).

- [80] Raveendran P, Fu J, Wallen SL, “Completely “Green” Synthesis and Stabilization of Metal Nanoparticles”, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 13940–13941, (2003).
- [81] Daou TJ, « Synthèse et Fonctionnalisation de Nanoparticules D’oxydes de Fer Magnétiques », Thèse de Doctorat : Université Louis Pasteur, Strasbourg I: Strasbourg, 2007.
- [82] Travan A, Pelillo C, Donati I, Marsich E, Benincasa M, Scarpa T, Semeraro S, Turco G, Gennaro R, Paoletti S, “Non-Cytotoxic Silver Nanoparticle-Polysaccharide Nanocomposites with Antimicrobial Activity“, *Biomacromolecules*, **10**, 1429–1435, (2009).
- [83] Renato Eising, “ Preparation of Silver Nanoparticles Stabilized by Dextran and Oligosaccharides-Based Amphiphiles for Application in Catalysis and Sensors”, Thèse de doctorat, Université de Santa Catarina et Université de Grenoble, 2014.
- [84] Bankura, KP, Maity D, Mollick MMR, Mondal D, Bhowmick B, Bain MK, Chakraborty A, Sarkar J, Acharya K, Chattopadhyay D, “Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Dextran Stabilized Silver Nanoparticles in Aqueous Medium”, *Carbohydr. Polym.*, **89**, 1159–1165, (2012).
- [85] Khan Z, Hossein IJ, Obaid AY, Althabaiti HA, “Starch directed green synthesis, characterization and morphology of silver nanoparticles”, *Colloids Surf biointerfaces*, **102**, 578-584, (2013).
- [86] Perrine Cheviron, “Nanostructuration de films composite amidon/argent, et amidon/argent/montmorillonite par procédé de chimie vert : influence des voies de génération des nanoparticules métalliques sur la structure et la voie de transport“, thèse de doctorat, Université Claude bernard, Lyon-1, 2014, 249.
- [87] Gao X, Wei L, Yan H, Xu B, “Green Synthesis and Characteristic of Core-Shell Structure Silver/starch Nanoparticles”, *Mater. Lett.* **65**, 2963–2965, 2002.
- [88] Serebryakova NV, Uryupina OY and Roldughin VI, “Formation of the bimodal ensemble of silver nanoparticles in polymer solutions”, *Colloid Journal*, **67**, 79, (2005).

- [89] Tamai T, Watanabe M, Teramura T, Nishioka N, Matsukawa K, *Macromol. Symp*, **282**, 199, (2009).
- [90] Yagci Y, Sangermano M, Rizza G, “A visible light photochemical route to silver–epoxy nanocomposites by simultaneous polymerization–reduction approach”, *Polymer*, **49**, 5195, (2008).
- [91] Uygun M, Kahveci MU, Odaci D, Timur S, Yagci Y, “Antibacterial Acrylamide Hydrogels Containing Silver Nanoparticles by Simultaneous Photoinduced Free Radical Polymerization and Electron Transfer Processes”, *Macromol. Chem. Phys*, **210**, 1867, (2009).
- [92] Cocca M, D’Orazio L, “Novel silver/polyurethane nanocomposite by in situ reduction: Effects of the silver nanoparticles on phase and viscoelastic behavior”, *J. Polym. Sci. Part B*, **46**, 344, (2009).
- [94] Mbhele ZH, Salemane MG, Van Sittert C, Nedeljkovic JM, Djokovic V, Luyt A S, “Fabrication and Characterization of Silver-Polyvinyl Alcohol Nanocomposites”, *Chem. Mater.* **15**, 5019–5024, (2003).
- [94] Vimala K, Mohan YM, Sivudu KS, Varaprasad K, Ravindra S, Reddy NN, Padma Y, Sreedhar B, Mohana Raju K, “Fabrication of Porous Chitosan Films Impregnated with Silver Nanoparticles: A Facile Approach for Superior Antibacterial Application”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **76**, 248–258, (2010).
- [95] Yoksan R, Chirachanchai S, “Silver Nanoparticle-Loaded Chitosan–starch Based Films: Fabrication and Evaluation of Tensile, Barrier and Antimicrobial Properties”, *Mater. Sci. Eng. C*, **30**, 891–897, (2013).
- [96] Tröger L, Hünnefeld H, Nunes S, Oehring M, Fritsch D Structural Characterization of Catalytically Active Metal Nanoclusters in Poly (amide Imide) Films with High Metal Loading. *J. Phys. Chem. B*, **101**, 1279–1291, (1997).
- [97] Zidan HM, “Effect of AgNO₃ Filling and UV-Irradiation on the Structure and Morphology of PVA Films”, *Polym. Test.*, **18**, 449–461, (1999).

- [98] Clémenson S, David L, Espuche E, “Structure and Morphology of Nanocomposite Films Prepared from Polyvinyl Alcohol and Silver Nitrate: Influence of Thermal Treatment”, *J. Polym.Sci. Part Polym. Chem.* **45**, 2657–2672, (2007).
- [99] Elmotasem H, Chitosan–alginate blend films for the transdermal delivery of meloxicam, *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008, 3 (1): 12-29
- [100] Xin Meng, Feng Tian, Jian Yang, Chun-Nian He, Nan Xing, Fan Li, “Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application”, *J Mater Sci: Mater Med*, **21**,1751–1759, (2010).
- [101] Xiaoliang Yan, Eugene Khor , Lee Yong Lym, “Pec films prepared from chitosan-alginate coacervates”, *chem.. Pharm. Bull*, **48 (7)**, 941-946, (2000).
- [102] Shilpa sharma, Pallab Sanpui, Arun Chattopadhyay et Siddhartha Ghosh,” Fabrication of antibacterial silver nanoparticle- sodium alginate –chitosan composite films”, *RSC Advances*, **2**, 5837-5843, (2012).
- [103] Daly M & Knorr D, “Chitosan-alginate complex coacervate capsules: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability”, *Biotechnol.Prog.* **4**, 76–81 (1988).
- [104] Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R, “Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications”, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **57**, 19–34 (2004).
- [105] Sakiyama T, Takata H, Toga T & Nakanishi K, “pH-Sensitive Shrinking of a Dextran Sulfate / Chitosan Complex Gel and Its Promotion Effect on the Release”, *J.Appl. Polym. Sci.* **81**, 667–674, (2001).
- [106] Takka S & Acarturk F, “Calcium alginate microparticles for oral administration: I: effect of sodium alginate type on drug release and drug entrapment efficiency”, *J. Microencapsul*, **16**, 275–290, (1999).

- [107] Chupa JM, Foster AM, Sumner SR, Madihally SV & Matthew HW, "Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations", *Biomaterials*, **21**, 2315–22, (2000).
- [108] Kratz G, Back M, Arnander C & Larm O, "Immobilised heparin accelerates the healing of human wounds in vivo", *Scand. J. Plast .Reconstr. Surg. Hand. Surg.*, **32**, 381– 385 (1998).
- [109] Shahadeddin L, Damour O, Berthod F, Rouselle P, Saintigny G, "Reconstructed skin from co-cultured human keratinocytes and fibroblasts on a chitosane cross-linked collagen-GAG matrix" *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2**, 222–226 (1991).
- [110] Vincent Palluault, Thèse de doctorat, Nouveaux traitements de surface respectueux de l'environnement par des gels polymères réticulables Application à la préparation des surfaces d'usage dans le secteur aéronautique, Université De Bordeaux I, 2010.
- [111] TOUATI Souad, 'Elaboration d'aérogels d'hydroxydes doubles lamellaires et de bionanocomposite à base d'alginate'', université Blaise Pascal/université d'Oran, 2013, 184.
- [112] Haug A, Larsen B, Smidsrød O, "A study on the constitution of alginic acid by partial hydrolysis", *Acta Chem. Scand.*, **20** , 183-190.
- [113] Grasdalen H, Larsen B, Smidsrød O, "13C-NMR studies of alginate", *Carbohydr. Res.* **56** , C11-C15.
- [114] Pillai CKS, Willi Paul, Chandra P. Sharma, "Chitin and chitosan polymers : Chemistry, solubility and fiber formation", *Progress in Polymer Science*, 2009.
- [115] Hardy DJM, "Applications of Functionalized Chitosan in Catalysis", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**, 8499-8520, (2005).
- [116] Linda Payet, "Viscoélasticité et structure de gels à base de chitosane", Thèse de doctorat, Université Paris IIV, Denis Diderot, 2005, .
- [117] Broussignac P, "Haut Polymère Naturel Connue dans l'Industrie : Le Chitosane", *Chimie et Industrie-Génie Chimique*, **99**, 1241-1247, (1968).

- [118] Kumar MNVR, "A review of chitin and chitosan applications", *Reactive & Functional Polymers*, **46**, 1–27, (2000).
- [119] Rinaudo M, Pavlov G, Desbrières J, "Influence of acetic concentration on the solubilization of chitosan", *Polymer*, **40**, 7029-7032 (1999).
- [120] Aiba S, "Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans". *International Journal of Biological Macromolecules*, **13**, 40-44, (1991).
- [121] Domard A, "pH and c.d. measurements on a fully deacetylated chitosan: application to Cu (II)-polymer interactions". *International Journal of Biological Macromolecules*, **9**, 98-104, (1987).
- [122] Anthonsen MW, Varum KM, Smidsrod O, "Solution properties of chitosans : conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation", *Carbohydrate Polymers*, **22**, 193-201, (1993).
- [123] Pa JH, Yu TL, "Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions", *Macromolecular Chemistry and Physics*, **202**, 985-991, (2001).
- [124] Frantz le Devedec , 'séparation des oligomères du chitosane par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisés', thèse soutenue en Janvier 2008, Université Du Québec A Montréal.
- [125] Kassaai MR, " Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan", *J Agric Food Chem*. 57 (5):1667-76, 2009.
- [126] Vasiliu S, Popa M., Rinaudo M., "Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers". *European Polymer Journal*, **41**, 923-932, (2005).
- [127] Peniche C, Argüelles-Monal Waldo, "Chitosan based polyelectrolyte complexes". *Macromolecular Symposia*, **168**, 103-116, (2001).

[128] Goycoolea F, Arguelles-Monal W, Peniche C, Higuera-Ciapara L, "Chitin and chitosan. Novel macromolecules in food systems", *Developments in food science Elsevier*, Amsterdam, **41**, 265-308, (2000).

[129] Arguelles-Monal W, Cabrera, G, Peniche C, Rinaudo M, "Conductimetric study of the interpolyelectrolyte reaction between chitosan and polygalacturonic acid". *Polymer*, 41, 2373-2378, (2000).

[130] Grégorio Crini, Pierre-Marie Badot, Éric Guibal, "Chitine et chitosane: du biopolymère à l'application" livre, 2009.

CHAPITRE II : MATERIAUX ET METHODES

II. Matériaux et méthodes

II.1. Matériaux

II.1.1. L'alginate

Dans le cadre de la chimie verte pour la synthèse des nanoparticules d'argent, notre choix s'est porté sur l'utilisation de l'alginate comme agent stabilisant et réducteur à la fois.

Dans notre étude, nous allons utiliser l'alginate de sodium 800 G, qui sert de stabilisant lors de la synthèse des nanoparticules d'argent. Il se présente sous forme de poudre blanche jaunâtre très fine, obtenu auprès des laboratoires CEVA (France).

II.1.2. Le chitosane

Dans le cadre de notre travail de recherche, le chitosane a été utilisé pour former avec l'alginate des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts, par voie solvant-casting qui consiste à évaporer le polyélectrolyte complexe formé, sur un moule ou un plan horizontal afin d'obtenir, après évaporation complète du solvant, un résidu solide sous forme de film nanocomposite. Le chitosane est fourni par Sigma Aldrich, avec une pureté de 99 % et une masse moléculaire moyenne.

II.1.3. Le nitrate d'argent

On trouve parmi les sels les plus utilisés pour la préparation de nanoparticules d'argent : le nitrate d'argent. Malgré sa dégradation à la lumière nécessitant des précautions de conservation comme la plupart des sels d'argent, il est majoritairement utilisé dans la littérature, pour son accessibilité, sa facilité d'utilisation (une réduction facile et directe, sans préparation) et son prix. Le réactif de Tollens, le sulfate d'argent et le perchlorate d'argent présentent des inconvénients par rapport à un procédé de synthèse verte : le premier nécessite des traitements de purification, le second est peu soluble dans l'eau et le dernier est explosif.

Le nitrate d'argent, de formule AgNO_3 , se présente sous forme de cristaux blancs inodores, soluble dans l'eau à température ambiante de masse molaire 169,87 g/mol. L'argent représente 63.5% de la masse molaire. Le nitrate d'argent a été acheté chez Sigma Aldrich et a été conservé à l'abri de la lumière.

II.1.4. Autres produits

II.1.4.1. L'acide acétique

L'acide acétique glacial (Sigma-Aldrich) de pureté 99,9 % a permis de faciliter la solubilisation du chitosane.

II.1.4.2. L'acétone

L'acétone (Sigma-Aldrich) de pureté 100 % a été utilisée pour la préparation de la solution de chitosane, pour permettre l'écrantage des charges lors de la coacervation avec l'alginate.

II.1.4.3. L'hydroxyde de sodium (NaOH)

L'hydroxyde de sodium (Sigma-Aldrich) de pureté 100%, a été utilisé pour ajuster le pH de la solution du chitosane avant coacervation.

II.1.4.4. Sels de phosphate sodique

Les sels NaH_2PO_4 et Na_2HPO_4 (Sigma-Aldrich) de pureté 99.99 %, ont été utilisés pour la préparation de la solution tampon phosphate saline pH=7.4, pour l'étude du degré de gonflement des films bionanocomposites synthétisés.

II.1.4.5. Gélose nutritive Mueller Hinton

La gélose Mueller-Hinton (Sigma- Aldrich) permet de tester l'activité antibactérienne des films nanocomposites synthétisés sur les bactéries.

Elle porte les caractéristiques suivantes :

- infusion de viande de bœuf : 300,0 ml
- peptone de caséine : 17,5 g
- amidon de maïs : 1,5 g
- agar : 17,0 g
- pH = 7,4

II.1.4.6. Milieu TSE

La solution de TSE (triptone, eau, sel) stérile a été utilisée pour la revivification des bactéries, et achetée chez la SARL Sud Médical.

II.1.4.7. Milieu de culture Sabouraud

Le milieu Sabouraud (Sigma- Aldrich) a été utilisée pour la revivification et le test de l'activité antifongique des films nanocomposite synthétisés contre la levure *Candida albicans*.

II.2.Méthodes

II.2.1.Préparation des films

II.2.1.1.L'alginate

La solution à 0.2% (w/v) à base d'alginate pur a été préparée en dispersant 0.2 g de poudre d'alginate dans 100 mL d'eau distillée sous homogénéisation continue à 500 rpm. Après dispersion complète de l'alginate, un volume correspondant à une épaisseur de 4 mm de la solution a été coulé (casting) dans une boîte de pétri en polystyrène de 9 cm de diamètre. Le solvant (eau) a été évaporé par séchage durant 04 jours. Le film formé a ensuite été stocké dans le dessiccateur, pour l'analyse FTIR.

La même solution est utilisée pour la préparation des nanoparticules d'argent.

II.2.1.2. Le chitosane

La solution filmogène à 0.2% (w/v) à base de chitosane pur a été préparée en dispersant 0.2 g de poudre de chitosan dans 100 mL d'un mélange d'acide acétique (2% (v/v)) /acétone (1/1) sous homogénéisation continue à 300 rpm. Après dissolution complète du chitosan, Un volume correspondant à une épaisseur de 4 mm de la solution filmogène (pH=5) a été coulé (casting) dans une boîte de pétri en polystyrène (9 cm de diamètre). Le solvant (acétone /acide acétique) a été évaporé par séchage durant 04 jours. Le film formé a ensuite été stocké dans le dessiccateur.

La solution est utilisée aussi pour la préparation des films nanocomposites avec la suspension Alg-AgNPs.

II.2.2. Préparation des solutions

II.2.2.1. Solution tampon phosphate pH=7.4

Pour préparer la solution tampon phosphate pH=7.4, on dissout 0.84g de NaH_2PO_4 et 1.562g de Na_2HPO_4 dans l'eau distillée. Le volume est ajusté à 100 mL.

II.2.2.2. Gélose Mueller Hinton

Ce milieu est préparé en dissolvant 38g de poudre dans 1L d'eau. Il faut homogénéiser puis chauffer en agitant, ensuite porter à ébullition pendant environ une minute. La gélose est enfin stérilisée à l'autoclave durant 15 minutes à 121,1°C et conservée jusqu'à utilisation.

II.2.2.3. Gélose sabouraud

On dissout 1g de peptone, 4g de glucose et 1.5 g d'agar-agar dans 100 mL d'eau. L'homogénéisation est assurée par agitation jusqu'à dissolution. La solution est enfin stérilisée à l'autoclave pendant 15 mn à 121.1°C et conservée jusqu'à utilisation.

II.2.2.4. Préparation des cultures bactériennes

Les cultures bactériennes ont été préparées à partir de bactéries conservées à -20°C, un culot de chaque bactérie est prélevé à l'aide de l'anse de platine et introduit dans le tube contenant le PBS stérile et mis dans une étuve thermostatée à 37°C pendant 24h.

Les suspensions bactériennes sont récupérées, et leur concentration est ajustée à 10^6 UFC ($\text{DO}_{580}=0.5$).

Ces bactéries sont utilisées pour l'ensemencement des milieux de culture Mueller Hinton.

II.3. Techniques expérimentales d'analyse

Introduction

Ce paragraphe présente les principes et appareillages des différentes méthodes de caractérisation utilisées régulièrement dans ce travail de thèse. Sont présentées les techniques analytiques de microscopie, les techniques spectrométriques et structurales. La plupart des caractérisations ont été réalisées au LRM. Lorsque ce n'est pas le cas, l'organisme collaborateur sera cité.

II.3.1 Spectroscopie UV-visible

L'étude des propriétés optiques par spectroscopie d'absorption constitue une étape indispensable en vue de la caractérisation des nanoparticules d'argent synthétisées. En effet, les nanoparticules métalliques (argent, or, cuivre) présentent des propriétés optiques particulières liées à un effet classique d'exaltation du champ électrique, souvent appelé confinement diélectrique.

II.3.1.1. Absorbance des nanoparticules

Les nanoparticules disposent d'un plus grand nombre d'atomes, et donc d'électrons libres en surface par rapport à des objets macroscopique. L'excitation de la surface métallique par la lumière provoque la vibration collective des électrons en surface. L'excitation des électrons provoque une vibration, une résonance à une certaine longueur d'onde. Les électrons résonnent et la longueur d'onde concernée est ainsi absorbée : c'est ce que l'on observe en spectroscopie UV-Visible (figure II.1).

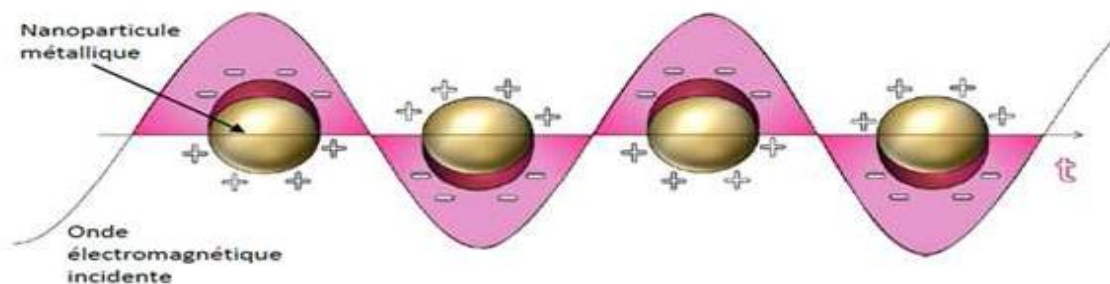


Fig II.1. Nanoparticule excitée par une onde électromagnétique,

La longueur d'onde est principalement dépendante de l'élément chimique (Ag, Au, Cu, ...). De plus, une nanoparticule plus petite aura une vibration de plus grande énergie, c'est-à-dire de longueur d'onde plus faible.

Les bandes d'absorbance dépendent de la forme et de la taille des nanoparticules [1,2], le changement de taille, ou de forme induit donc un changement dans l'absorbance et la longueur d'onde de la bande d'absorption [3,4,5].

II.3.1.2. Caractérisation des nanoparticules d'argent par spectroscopie UV-vis :

La spectroscopie ultraviolet-visible est une technique spectrale mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine des ultraviolets (200 nm-400 nm), du visible, et jusqu'au proche infrarouge (750 nm- 1400 nm). Les spectres dans cette région sont dus aux transitions électroniques, et correspondent à des spectres d'émission ou d'absorption.

L'absorption de rayonnement ultra-violet-visible par les nanoparticules d'argent dans l'alginate (échantillon) se traduit généralement par une bande d'absorption électronique caractéristique de ces nanoparticules.

De manière générale, les nanoparticules sphériques d'argent sont caractérisées par une bande d'absorbance autour de 400 nm [6] (figure II.2). La largeur et la symétrie de la bande est caractéristique de la distribution de taille des nanoparticules.

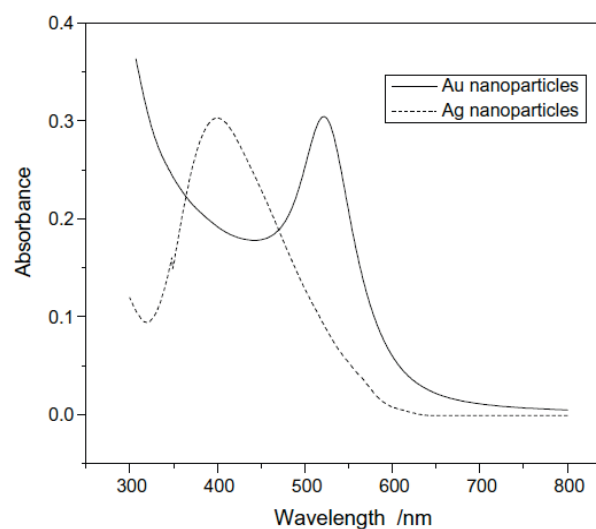


Fig II.2. Spectre d'absorption de nanoparticules d'argent [6]

En effet, une large distribution de taille des nanoparticules induit un élargissement de la bande d'absorbance vers les grandes longueurs d'onde.

Plus précisément, un maximum d'absorption observé entre 300 et 330 nm caractérise la présence de nanoprismes. 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 [7].

La spectroscopie UV-Vis permet aussi de vérifier la stabilité des dispersions de nanoparticules.

Dans la publication de Yusheng Liu et al. [8] (figure II.3), les nanoparticules préparées sont stables, la longueur d'onde au maximum d'absorbance ne se décalant que légèrement de 403 à 409 nm au bout de 6 mois, laissant supposer alors une agrégation négligeable dans le temps.

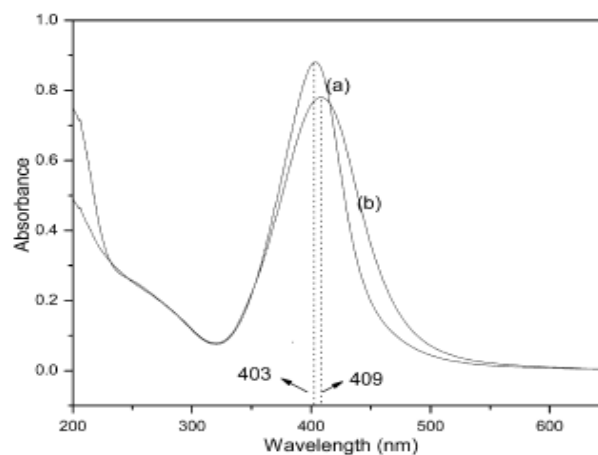


Fig II.3. Observations spectroscopiques du phénomène d'agrégation des nanoparticules colloïdales d'argent lors de leur stockage

Conditions et appareillage

Les mesures spectrophotométriques ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UV-visible Lambda 25 PERKIN ELMER en utilisant des cuves en quartz de 10 mm de trajet optique. L'enceinte du spectrophotomètre est thermostatée à 25°C. L'appareil est relié à un microordinateur. Le logiciel UV-Probe, commercialisé par PERKIN-ELMER, permet l'enregistrement et la visualisation des spectres des échantillons analysés.

II.3.2. La diffusion dynamique de la lumière (DDL)

Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, ainsi que la distribution de taille, peuvent être déterminés de deux manières.

La première méthode utilise des appareils de mesure commerciaux utilisant le principe de Diffusion Dynamique de la Lumière (ou DLS, Dynamic Light Scattering), encore appelée Spectroscopie de Corrélation de Photons (PCS).

C'est une méthode de choix pour déterminer la granulométrie de systèmes colloïdaux. Cette technique est fondée sur la mesure du mouvement brownien des particules (Le mouvement Brownien est défini comme : «le mouvement aléatoire des particules dans un liquide du au bombardement des molécules qui les entourent »). La fréquence et l'amplitude de ce mouvement brownien dépendent de la taille de la particule et de la viscosité du solvant.

Pour une viscosité donnée, plus la particule est petite et plus son mouvement brownien présente une fréquence et une amplitude relative importante. De même, plus la valeur de la viscosité du solvant est faible (par exemple à température élevée), plus ce mouvement brownien est rapide et ample pour une particule de taille donnée. Il est donc important de maîtriser la viscosité et la température du milieu [9, 10].

On peut analyser une grande quantité de particules avec cette technique et détecter donc l'éventuelle présence d'agrégats. Le diamètre hydrodynamique est défini comme le diamètre de la particule en suspension dans un milieu liquide, et se réfère à la façon dont la particule se déplace dans le fluide sous l'effet de l'agitation brownienne. Sa valeur est déduite de l'équation de Stokes-Einstein qui relie le diamètre hydrodynamique à l'inverse du coefficient de diffusion translationnel D_o estimé via la sommation de la lumière diffusée par l'échantillon :

$$D_o = \frac{k_B T}{6\pi\eta d_h}$$

Où k_B est la constante de Boltzmann ($1.3805 \times 10^{-23} \text{J.K}^{-1}$), T est la température (K), η est la viscosité de la phase de diffusion (cP), D_o est le coefficient de diffusion (cm^2s^{-1}) et d_h est le rayon hydrodynamique de la particule considérée (cm).

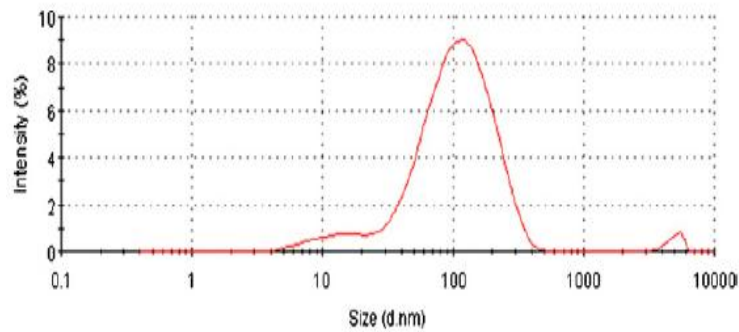


Fig.II.4. Distribution de taille en DLS de nanoparticules d'Ag de 103nm de diamètre (étalon Malvern)

Le coefficient de diffusion translationnel dépend de la structure de surface, ainsi que de la concentration et du type d'ions du milieu de diffusion. Cette méthode permet d'obtenir le diamètre hydrodynamique moyen des nanoparticules ainsi que la distribution en taille correspondante sous la forme de courbes [10] (figure II. 4).

Conditions et appareillage :

Les mesures DLS ont été effectuées sur un nanosizer nano ZS de marque Malvern permettant d'accéder à la distribution en taille des nanoparticules. Cet instrument est équipé d'un laser He-Ne émettant à 633 nm et la diffusion de la lumière est récoltée par un détecteur positionné à un angle de 173° (figure.II.5). Les suspensions de nanoparticules ont été introduites dans des cuves de spectroscopie en quartz, toutes les mesures sont répétées 3 fois.

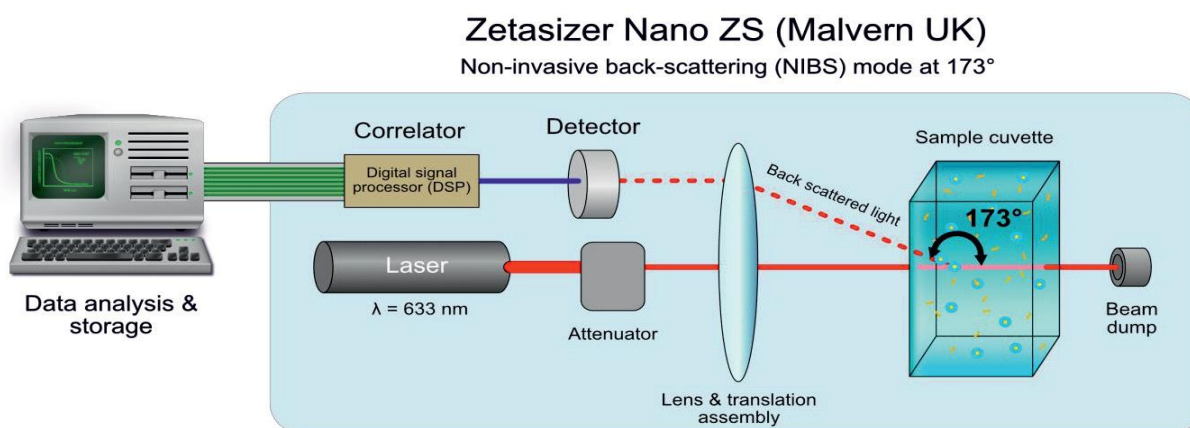


Fig.II.5. schéma de principe du zetasizer Nano ZS de Malvern.

II.3.3. La microscopie optique

La morphologie des films nanocomposites préparés a été examinée par microscopie optique. La microscopie optique implique normalement des longueurs d'onde de 300 à 800 nm, ce qui constitue une gamme un peu plus étendue que celle du spectre visible de l'œil humain (400 à 700 nm). Les microscopes optiques sont limités en résolution par la diffraction de la lumière.

En général, les microscopes optiques ont tous le même fonctionnement de base. Un échantillon est déposé sur une lame de verre et placé sur une platine amovible. Cette platine permet des déplacements précis de l'échantillon afin de faire la mise au point et de trouver une région d'intérêt. La lumière d'une source sera dirigée vers l'échantillon grâce à un condenseur. Cette lumière qui interagit avec l'échantillon sera récoltée par l'objectif du microscope. L'objectif est l'une des pièces les plus importantes du microscope. Il est composé de plusieurs groupes de lentilles permettant la magnification de l'échantillon. Le signal récolté par l'objectif peut être dirigé vers l'oculaire qui permet l'observation directe de l'échantillon, ou être envoyé vers des ports externes comme des caméras ou d'autres types de détecteur.

Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope optique Olympus SX 41 équipé d'une caméra numérique permettant l'acquisition des images obtenues.

L'examen au microscope permet de visualiser d'éventuelles hétérogénéités de la surface du film.

II.3.4. La microscopie électronique à balayage (MEB)

Une autre méthode pour déterminer le diamètre moyen des particules repose sur l'utilisation des techniques de microscopie électronique comme la microscopie électronique à balayage (SEM). Dans ce cas, les particules sont observées à l'état solide, la technique ne tient donc pas compte de l'éventuelle couche d'hydratation des particules, présente en solution. C'est pourquoi il est fréquent d'observer des différences de plusieurs dizaines de nanomètres entre les tailles mesurées en DLS et en microscopie électronique [11].

La microscopie électronique à balayage permet l'observation d'un échantillon à des grossissements qu'on ne peut pas atteindre en microscopie de lumière visible (de 35 à 100 000), avec une profondeur de champ importante ce qui permet l'observation d'échantillons rugueux.

La microscopie permet souvent de confirmer les conclusions faites en spectroscopie UV-Vis. L'argent étant un élément métallique, il est connu pour être directement observable à l'inverse des éléments organiques nécessitant parfois des agents de contraste comme dans le domaine de la biologie ou des mélanges de polymères.

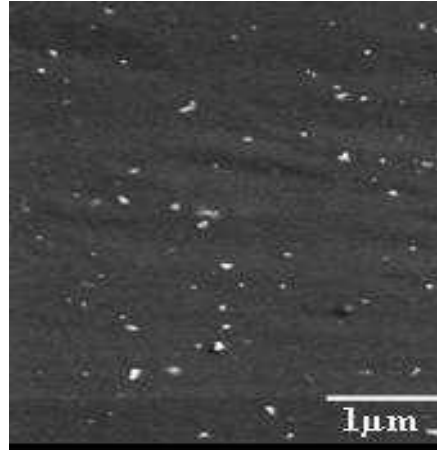


Fig.II.6. Photographie en microscopie électronique à balayage de nanoparticules d'argent dans une matrice polyuréthane ^[12]

Conditions et appareillage

Afin de visualiser l'état de surface des nanocomposites synthétisés, des photographies en Microscopie Electronique à Balayage ont été réalisées sur les matériaux synthétisés renfermant les nanoparticules d'argent, au sein du Service Commun de Microscopies Electroniques et de Microanalyses X, Université de Lorraine sur le microscope MEB Hitachi S-4800 FEG couplé à un spectromètre à dispersion d'énergie (EDS), et optimisé pour la haute résolution

II.3.5. La diffraction des rayons X (DRX)

La diffraction des rayons X est une technique d'analyse de l'organisation de la matière à grande distance. Elle permet d'identifier les composés cristallins par comparaison avec des spectres de composés référencés dans une base de données.

La structure des nanoparticules d'argent peut être étudiée par diffraction des rayons X (DRX). La technique permet en effet de caractériser l'argent métallique et ses plans de diffraction. Les raies de diffraction de l'argent métallique Ag^0 sont généralement observées à $2\theta = 38.0, 44.0, 64.7, \text{ et } 77.9^\circ$ (avec une cathode de cuivre) comme le montre la figure II.7 ci-dessous.

Ces pics sont attribués aux plans (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0) et (3 1 1) d'une structure cubique face centrée [13]. C'est généralement le pic de diffraction le plus intense à $2\theta = 38^\circ$ qui est recherché par les auteurs. Les pics de diffraction peuvent également fournir des indications sur la morphologie des nanoparticules. Un pic plus large et moins intense est signe d'une plus petite taille de nanoparticules et parfois également d'une distribution de taille plus large.

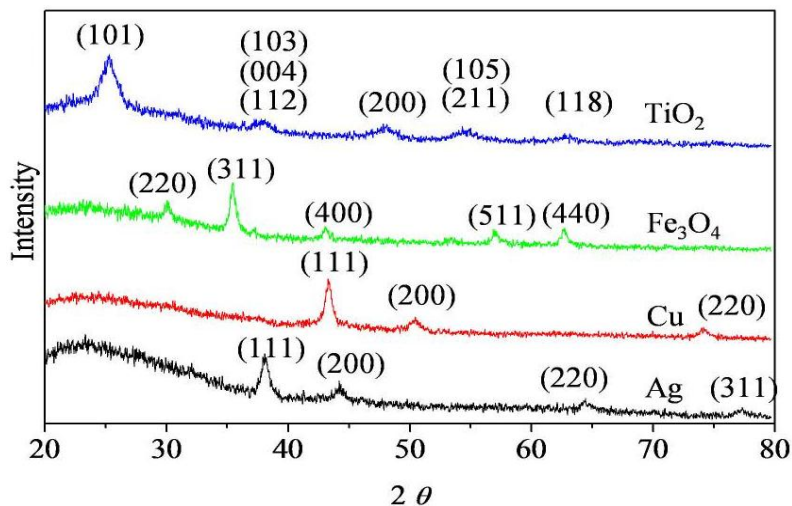


Fig. II.7. Diffractogrammes de nanoparticules et attribution des plans de diffraction selon les standards : Ag (JCPDS 04-0783), Cu (JCPDS 85-1326), Fe₃O₄ (JCPDS 19-629), et TiO₂ (JCPDS 89-4921)

Conditions et appareillage

Les diffractogrammes ont été enregistrés à l'aide d'un diffractomètre de type Philips (PW 1710) muni d'une cathode en cuivre Cu K α ($\lambda=1.5406 \text{ \AA}$), à l'université ES-Senia Oran.

II.3.5. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectrométrie infrarouge est utilisée pour confirmer l'interaction entre l'argent et le film composite alginate-chitosane. La réaction entre les nanoparticules d'argent, l'alginate et le chitosane peut être identifié par le déplacement des bandes caractéristiques attribuées aux différents groupes fonctionnels présents dans les réactifs [14], comme, les groupements carbonyles et amines.

La présence de nanoparticules d'argent dans le composite peut entraîner le déplacement de nombre d'ondes vers des valeurs plus basses. On parle alors de « blue-shift », et de « red-shift » dans le cas inverse.

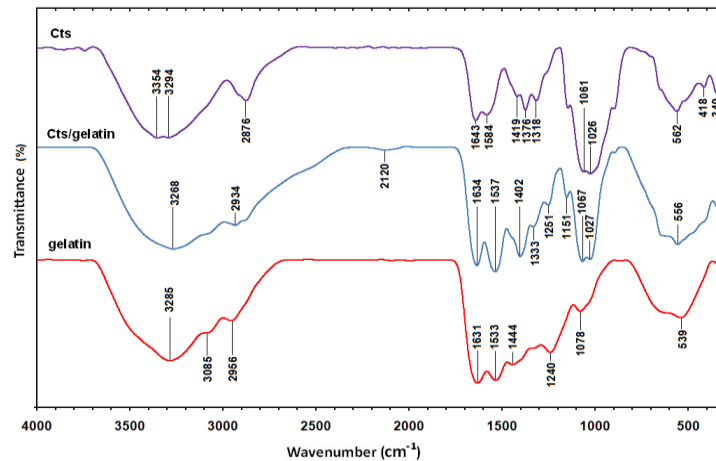


Fig. II.8. Spectre IR du Chitosane (Cts), Cts/gelatin, et gelatin.

Le spectre IR du nanocomposite Ag/chitosane/gelatin (figure II. 9) montre un blue shift pour les vibrations d'élongation de 1643 et 1584 cm^{-1} à 1635 et 1544 cm^{-1} respectivement. Les bandes de vibration du compsite Ag/Cts à 1397 cm^{-1} peut indiquer l'interaction entre les nanoparticules d'argent avec le chitosane.

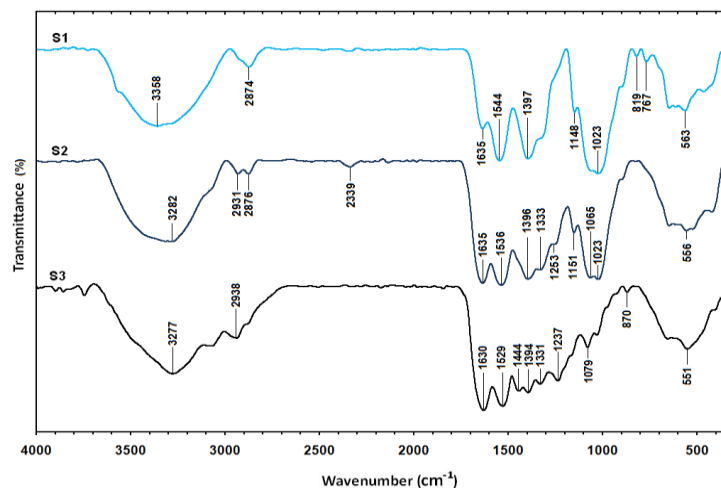


Fig. II. 9. Spectre IR du composite Ag/Cts (S1), Ag/Cts/gelatin (S2) et Ag/gelatin (S3)

Conditions et appareillage

Nous avons utilisé un Spectromètre Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) de type Agilent Cary 640 disponible au Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules (LRM). Il est piloté par un micro-ordinateur, Les spectres sont enregistrés dans l'intervalle 4000 à 400 cm^{-1} à température ambiante.

Références bibliographiques

- [1] Domingos JB, Fort S, “Preparation of Silver Nanoparticles Stabilized by Dextran and Oligosaccharides-Based Amphiphiles for Application in Catalysis and Sensors”.
- [2] Evanoff DD, Chumanov G, “Synthesis and Optical Properties of Silver Nanoparticles and Arrays”, *Chem Phys Chem* , **6**, 1221–1231, (2005).
- [3] Sharma VK, Yngard RA, Lin Y, “Silver Nanoparticles: Green Synthesis and Their Antimicrobial Activities”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **145**, 83–96, (2009).
- [4] Zhao X, Xia Y, Li Q, Ma X, Quan F, Geng C, Han Z, “Microwave-Assisted Synthesis of Silver Nanoparticles Using Sodium Alginate and Their Antibacterial Activity”, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.*, **444**, 180–188, (2014).
- [5] Jovanović Ž, Radosavljević A, Šiljegović M, Bibić N, Mišković-Stanković V, Kačarević-Popović Z, “Structural and Optical Characteristics of silver/poly (N-Vinyl-2-Pyrrolidone) Nanosystems Synthesized by Γ -Irradiation”, *Radiat. Phys. Chem.*, **81**, 1720–1728, (2012).
- [6] Huang H, Yang X, “Synthesis of Polysaccharide-Stabilized Gold and Silver Nanoparticles: A Green Method”, *Carbohydr. Res.* , **339**, 2627–2631, (2004).
- [7] Luo C, Zhang Y, Zeng X, Zeng Y, Wang Y, “The Role of Poly(ethylene glycol) in the Formation of Silver Nano-particles”. *J. Coll. and Inter. Science*, **288** , 444, (2005).
- [8] YushengLiu a,b, ShimouChen a, LeiZhong a, GuozhongWu a, 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).
- [9] Thomas Courant, « Nanoparticules incorporant des complexes inorganiques à visée diagnostique », thèse de doctorat, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2011, 324.
- [10] 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).

- [11] Song Yi Seo, Ga Hyun Lee, Se Guen Lee, So Yeon Jung, Jeong Ok Lim, Jin Hyun Choib, “Alginate-based composite sponge containing silver nanoparticles synthesized in situ”, *Carbohydrate Polymers*, **90**, 109– 115, (2012).
- [12] Zanetti-Ramos BG, Fritzen-Garcia MB, Schweitzer de Oliveira C, Avelino Pasa A, Soldi V, Borsali R, Creczynski-Pasa TB, “Dynamic light scattering and atomic force microscopy techniques for size determination of polyurethane nanoparticles”, *Mater. Sci. Eng.C*, **2**, 638-640, (2009).
- [13] Liu TM, Yu J, Chang CA, Chiou A, Chiang HK, Chuang YC, Wu CH, Hsu CH, Chen PA, Huang CC, “One-step shell polymerization of inorganic nanoparticles and their applications in SERS/nonlinear optical imaging, drug delivery, and catalysis”, doi: 10.1038/srep 05593.
- [14] Mansor Bin Ahmad , Jenn Jye Lim, Kamyar Shameli, Nor Azowa Ibrahim and Mei Yen Tay, “Synthesis of Silver Nanoparticles in Chitosan, Gelatin and Chitosan/Gelatin Bionanocomposites by a Chemical Reducing Agent and Their Characterization”, *Molecules* , **16**, 7237-7248, (2011).

**CHAPITRE III : SYNTHÈSE DES
NANOPARTICULES D'ARGENT DANS
L'ALGINATE**

INTRODUCTION

Une méthode de synthèse *originale* a été étudiée en vue de l'obtention de nanoparticules d'argent sous forme de dispersion aqueuse par irradiation UV, avec l'objectif de pouvoir les stabiliser par un polysaccharide naturel : l'alginate.

La simplicité et l'aspect écologique du procédé ont été des critères de choix.

Ce chapitre sera consacré à la description du procédé de synthèse des nanoparticules par irradiation UV et l'exploitation des résultats d'analyses pour les caractériser en solution aqueuse.

III.1. Préparation des nanoparticules d'argent

Les ions argent sont connus pour se réduire simplement en présence de photons. Cette propriété a été exploitée pour la préparation des AgNPs en présence de l'alginate comme agent stabilisant.

Dans cette étude, la concentration en nitrate d'argent préconisée par Shilpa Sharma et al. [1] a été conservée (10^{-2} mol/L).

Dans une solution de 50 mL d'alginate à 0.2%, 2 mL de nitrate d'argent AgNO_3 (10^{-2} M) fraîchement préparée est ajoutée sous irradiation UV ($\lambda=364$ nm) à 10 cm de la source d'irradiation, et sous agitation.

L'erenmeyer réactionnel est entièrement protégé de la lumière et la réaction est effectuée, à différents temps d'irradiation à savoir : 1h, 3h, 24h, 48h et 96h. Les dispersions colloïdales ainsi obtenues sont également conservées à l'abri de la lumière à température ambiante et notées respectivement E_1 , E_2 , E_3 , E_4 et E_5 .

III.2. Suivi de la réduction des ions Ag^+

Après 1h de réaction, la couleur du mélange réactionnel a changé graduellement de l'incolore (E_0) au marron clair (E_1), ensuite au marron foncé (E_2) et finalement au vert gris (E_3), (E_4), (E_5) indiquant la formation de nanoparticules d'argent (figure III.1).

L'étape initiale de la réduction des ions Ag^+ est réalisée essentiellement par des électrons solvatés (e_{aq}^-) issus de l'action de l'irradiation UV sur l'eau (solvant).

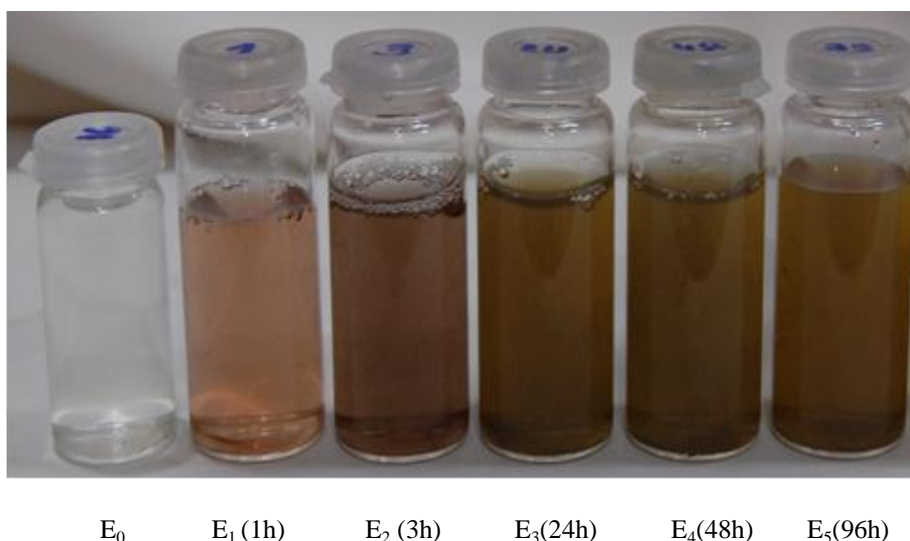
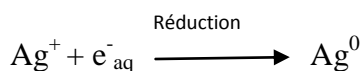
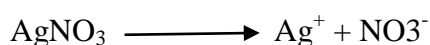
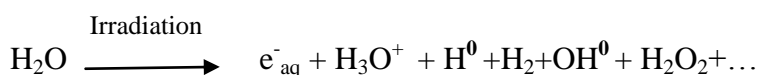
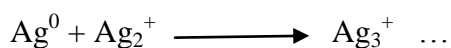


Fig.III.1. Photographies des nanoparticules d'argent synthétisées dans l'alginate à différents temps d'irradiation UV.

Il existe de nombreuses études sur l'irradiation des ions Ag^+ en phase aqueuse. Il a été démontré que les ions Ag^+ sont réduits par les électrons hydratés, produits pendant l'irradiation de la solution [2,3]. Le processus de réduction par irradiation peut s'écrire comme suit:



Généralement la réduction des ions Ag^+ en Ag^0 , avec les e_{aq}^- issus de l'irradiation du solvant, constitue la première étape de la réaction. Les atomes Ag^0 , ainsi formés adsorbent à leur surface les ions Ag^+ , en excès dans la solution [4].



La surface des ions est encore réduite, et par conséquent les atomes coalescent formant des clusters métalliques. De cette manière l'agrégation ne s'arrête pas et conduit à des particules de taille élevée. Cependant la présence d'alginate engendre la passivation des nanoparticules d'argent et agit comme agent stabilisant.

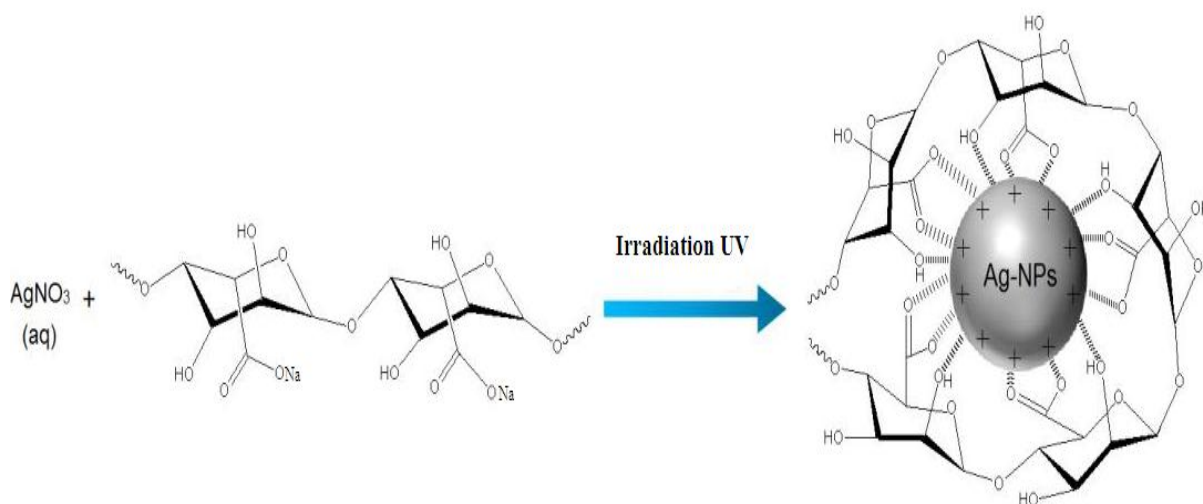


Fig.III.2 Interaction entre les nanoparticules d'argent et l'alginate [6].

L'alginate de sodium a une grande abondance de groupements carboxylates ($-\text{COO}^-$) et hydroxyles ($-\text{OH}$), ce qui l'aide à agir à la fois comme agent réducteur et stabilisant [4], Na-Alg peut ainsi former des liaisons avec la surface positivement chargée des Ag-NPs.

Nous supposons que la stabilisation des nanoparticules d'argent par l'alginate se produit à cause des forces de Van Der Waals entre les charges partielles négatives des groupements hydroxyles et acétyles de l'alginate, et les charges positives, à la surface des AgNPs. La figure III.2 illustre l'interaction entre l'alginate et les nanoparticules d'argent [6].

Nous avons commencé par étudier l'allure des spectres d'absorption des solutions d' AgNO_3 , de l'alginate et du mélange des solutions alginate et nitrate d'argent.

La figure III.3 illustre ces derniers : on peut voir clairement une bande d'absorption de la solution AgNO_3 qui apparaît vers 308 nm et disparaît après réduction preuve de la chélation des ions Ag^+ par l'alginate [1].

La progression dans la formation de nanoparticules d'argent après réduction a été suivie en mesurant la résonance des plasmons de surface des produits obtenues après réduction. La présence de nanoparticules d'argent se manifeste par un maximum d'absorption dans le domaine UV-vis.

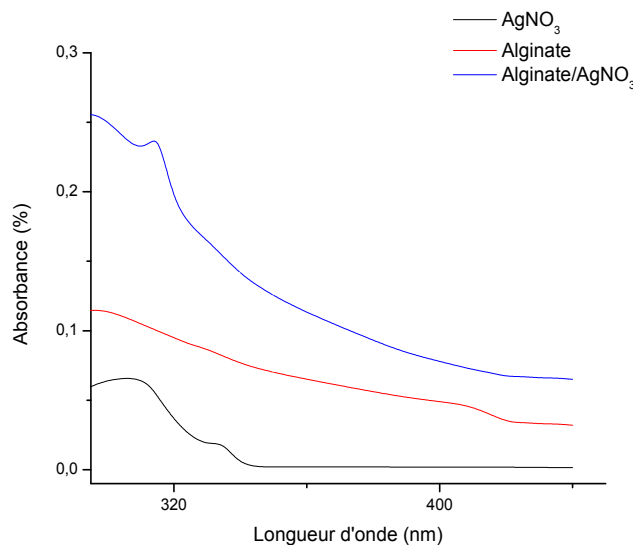


Fig.III.3 Spectre d'absorption UV-Vis des solutions nitrate d'argent, alginate et mélange nitrate d'argent/alginate sans irradiation UV.

La figure III.4 montre l'évolution de l'absorbance des solutions alginate/nitrate d'argent au cours du temps d'irradiation. On remarque l'apparition de maximums d'absorption pour toutes les solutions irradiées : E₁ (1h), E₂ (3h), E₃ (24h), E₄ (48h), et E₅ (96h), donc on peut confirmer la présence de nanoparticules d'argent dans tous les échantillons.

On peut remarquer que les spectres UV-vis des échantillons E₁, E₂ sont plus larges que ceux des échantillons E₃, E₄ et E₅, on peut donc supposer une agrégation plus importante des particules dans ces deux échantillons [7].

Les absorbances évoluent respectivement de 0,38, 0,63, 1,34 et 1,58 pour les échantillons E₁, E₂, E₃ et E₅ indiquant l'augmentation de la teneur en nanoparticules d'argent dans la solution avec l'évolution du temps d'irradiation.

Le maximum d'absorption est observé entre 410 et 430 nm ; les nanoparticules sont donc de géométrie sphérique ou proche d'une sphère.

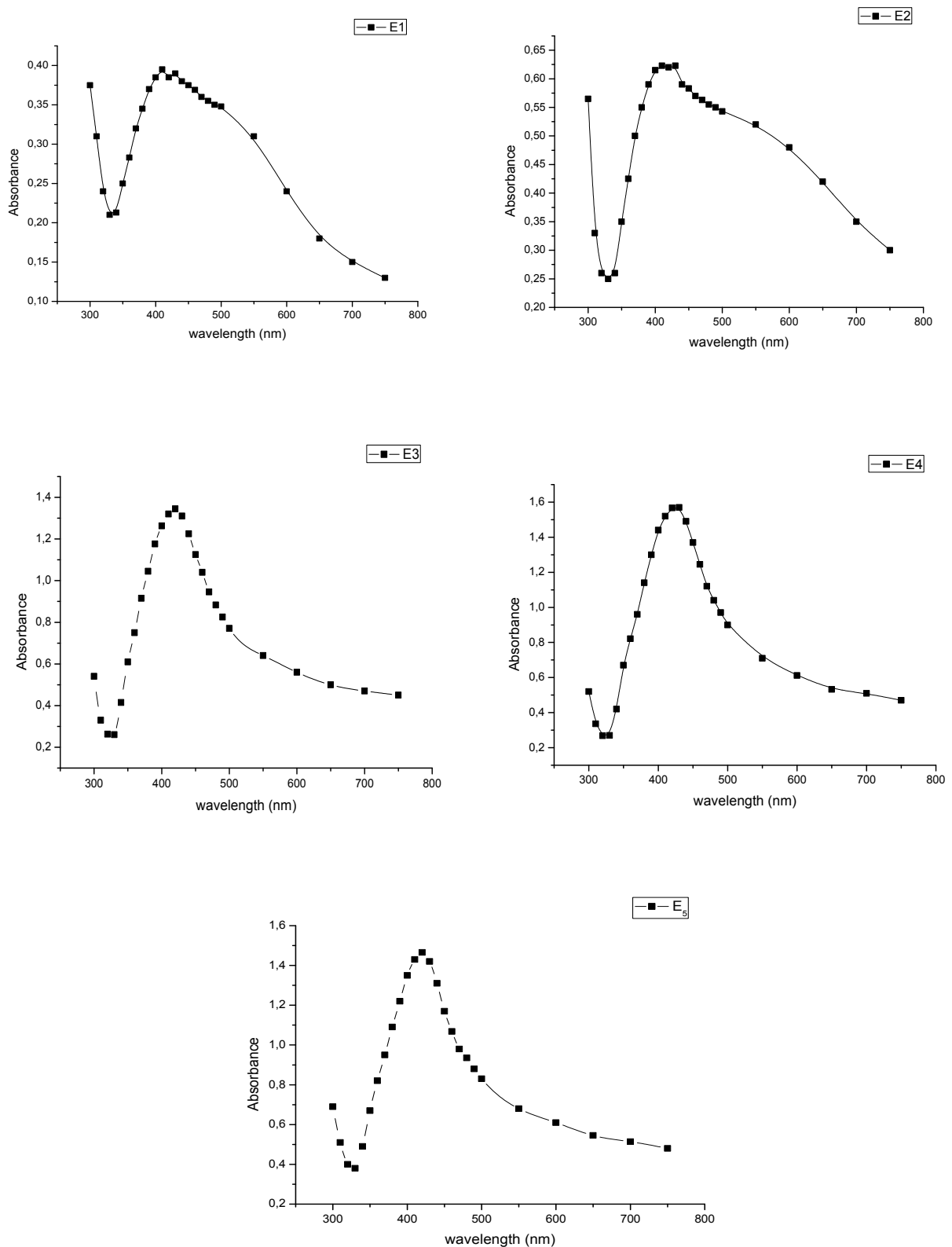


Fig.III.4. Spectres d'absorption UV-Vis des nanoparticules d'argent synthétisées à différents temps d'irradiation.

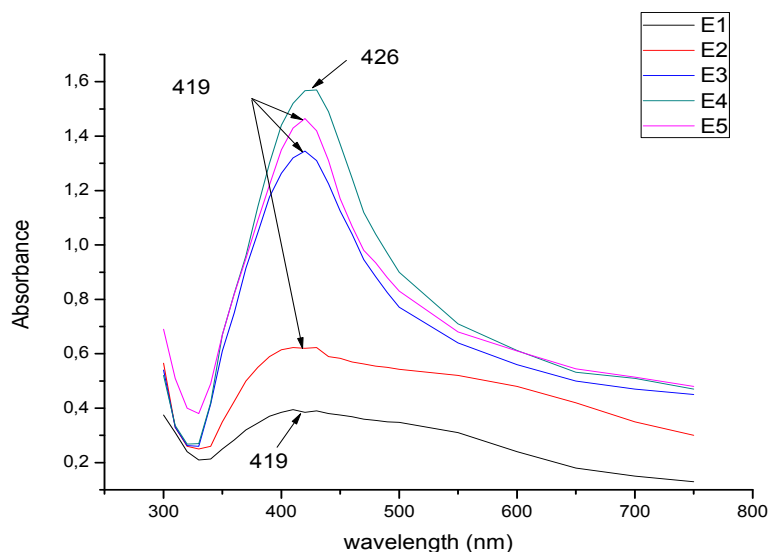


Fig.III.5. Comparaison des spectres d'absorption UV-Vis des échantillons E₁, E₂, E₃, E₄ et E₅.

A partir de 48 h d'irradiation on n'observe pas d'augmentation de la valeur de l'absorbance ($A = 1.47$), on peut donc déduire que les ions Ag^+ sont tous réduits à 48h d'irradiation (figure III.6).

On peut aussi observer le déplacement du maximum d'absorption de 419 nm pour les échantillons (E₁, E₂, E₃ et E₅) vers 426 nm pour l'échantillon E₄, caractéristique d'une croissance en taille des nanoparticules d'argent dans cet échantillon.

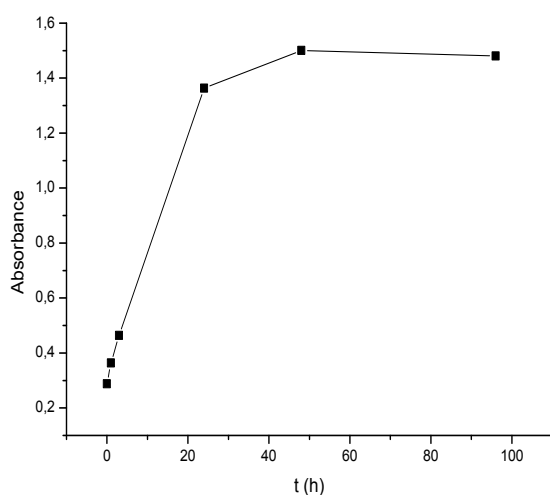


Fig.III.6. Variation du maximum des bandes SPR des nanoparticules d'argent synthétisées en fonction du temps d'irradiation

III.3. Stabilité des AgNPs conservées à température ambiante

L'agglomération en fonction du temps, des nanoparticules d'argent, se traduit par la diminution de l'intensité de leur pic d'absorbance caractéristique ainsi que l'augmentation de sa largeur [7].

Dans la figure III.7, apparaissent les spectres des échantillons préparés initialement, et après conservation à l'abri de la lumière pendant 3 mois. On a essayé par l'établissement de ces spectres de comparer la stabilité dans le temps des nanoparticules d'argent dans ces échantillons. On a remarqué que les bandes de résonance plasmon s'affaissent considérablement pour les échantillons E₁ et E₂ et légèrement pour les échantillons restants.

On peut déduire que la stabilité dans le temps est fonction de la taille des nanoparticules : plus leur taille est importante plus elles ont tendance à s'agglomérer.

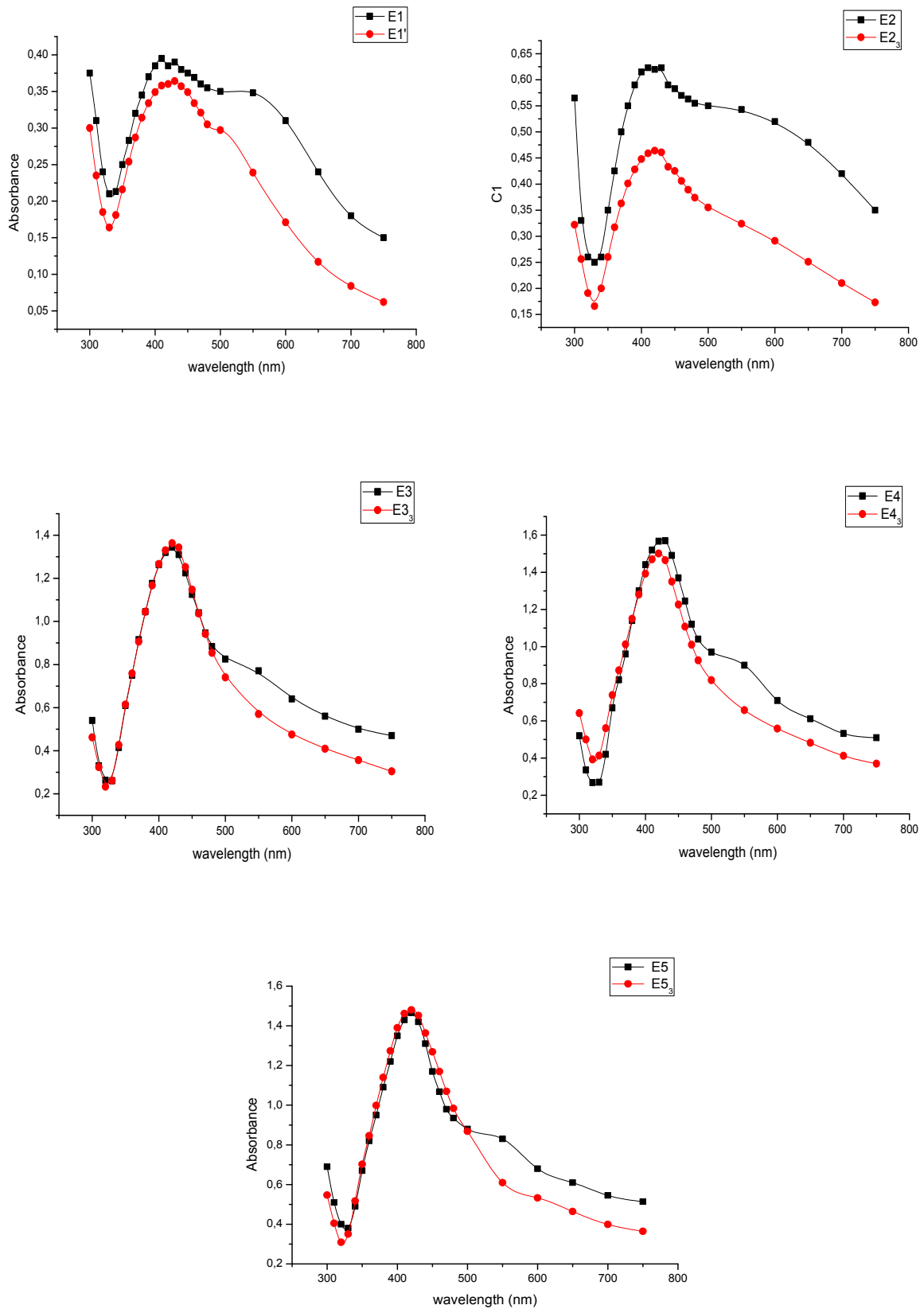


Fig.III.7. Evolution des spectres d'absorption des solutions de nanoparticules d'argent synthétisés après 3 mois.

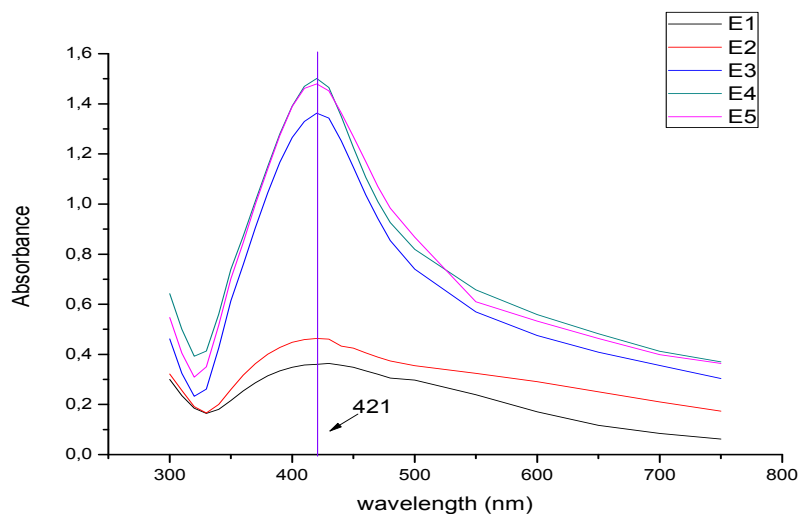


Fig.III.8. Comparaison des spectres d'absorption des solutions de nanoparticules d'argent synthétisées après 3 mois.

Le maximum d'absorption augmente légèrement à 421 nm après 3 mois, on peut conclure que les alginates stabilisent bien les AgNPs (figure.III.8).

Au bout de 24 mois, un précipité noir apparaît au fond des flacons de tous les échantillons, confirmant que la stabilisation des nanoparticules d'argent par l'alginate n'est pas conseillée pour des périodes de temps supérieures à 3 mois [8].

III.4. Analyse par diffusion dynamique de la lumière (DDL)

Les nanoparticules d'argent sont stabilisées par l'alginate : après réduction, on obtient des suspensions homogènes, et on remarque l'absence d'agrégation au fond des erlens.

La technique d'analyse par diffusion dynamique de lumière a été utilisée pour mesurer le diamètre hydrodynamique des nanoparticules d'argent stabilisées par l'alginate. Elle peut analyser une grande quantité de particules et permet donc de détecter l'éventuelle présence d'agrégats.

Nous allons commencer par l'étude de la distribution de taille des nanoparticules synthétisées par intensité : on va donc mettre l'accent sur les espèces ayant la plus grande intensité de diffusion contribuant au résultat global (donc les particules qui tendent à être les plus grandes).

Par conséquent, nous allons nous intéresser à étudier en premier lieu, l'éventuelle présence d'agrégation dans les échantillons.

Dans le graphique de distribution par intensité de lumière diffusée, on remarque qu'il y a différentes populations de nanoparticules pour tous les échantillons préparés.

Les résultats sont portés dans le tableau suivant :

Tableau .III. 1. Informations structurales des nanoparticules d'argent synthétisées.

<i>Echantillon</i>	<i>Diamètre hydrodynamique</i>	<i>Intensité de lumière diffusée (%)</i>	<i>Indice de polydispersité</i>	<i>Surface de pic %</i>
E₁	15.95	1.6	1	5.1
	78.43	5		19
	419	19		75.9
E₂	57.05	7	1	15.8
	556.4	32		84.2
E₃	2.4	0.4	0.591	-
	22.46	2		14
	101.8	4		25
	501.4	9.4		57.8
	5000	1.8		-
E₄	12.17	0.5	0.792	4
	488.2	3		80.8
	4710	5.5		15.2
E₅	32.81	1.4	0.781	-
	269.3	4		32.4
	1385	4		34.6
	4333	7		25.3

L'agrégation des nanoparticules d'argent est illustrée par les figures III.9, ainsi, le graphique de distribution de taille par intensité de lumière diffusée, pour les nanoparticules préparées à 1h d'irradiation (Fig.III.9_a) UV montre un étalement du diamètre des particules entre 10 et 25 nm pour la première population, de 40 à 130 nm pour la seconde et de 200 à 900 nm pour la dernière, l'indice de polydispersité est égal à 1 .

Pour l'échantillon irradié pendant 3h (Fig.III.9_b), le graphique traduit l'apparition de deux populations de nanoparticules la première s'étalant de 35 à 95 nm et la deuxième de 400 à 900 nm avec un indice de polydispersité égal à 1.

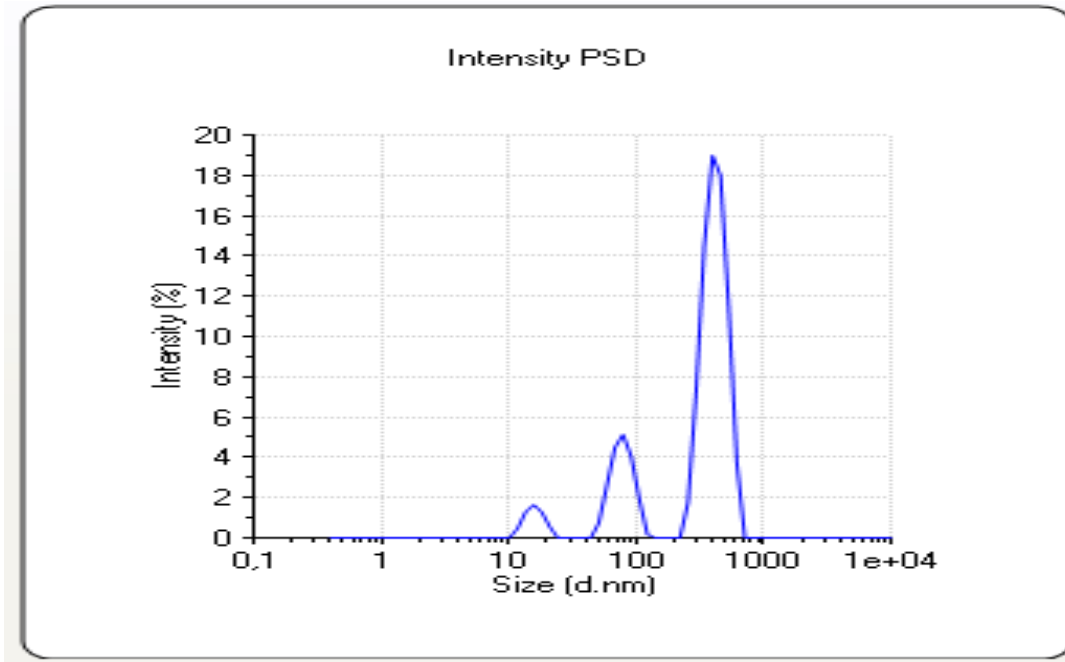


Fig.III.9_a. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E₁(1h).

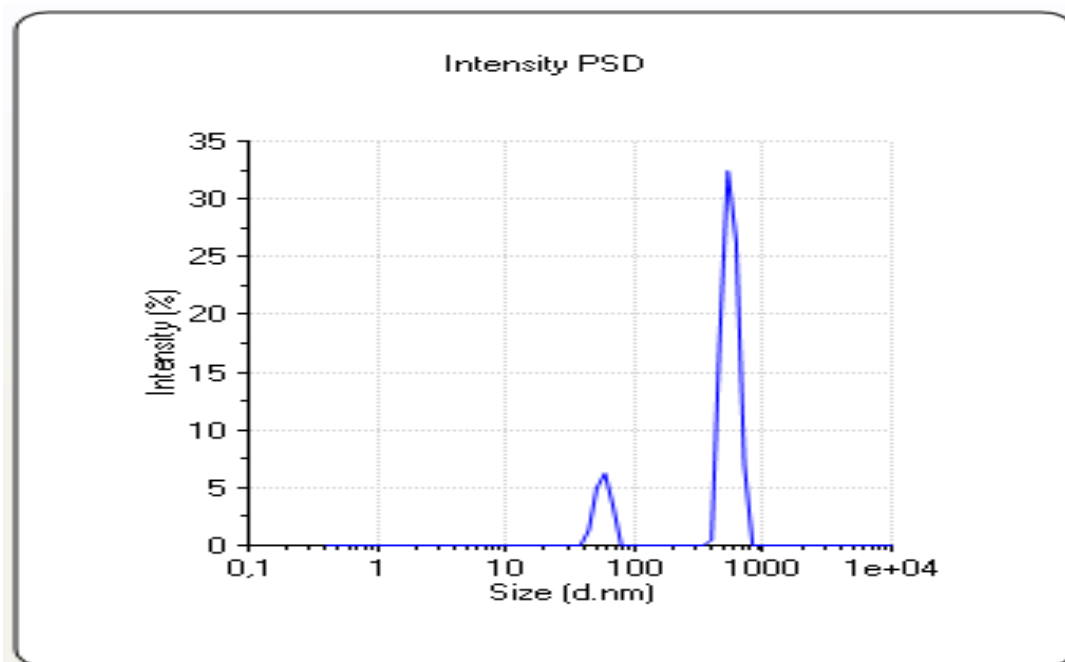


Fig.III.9_b. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E₂(3h).

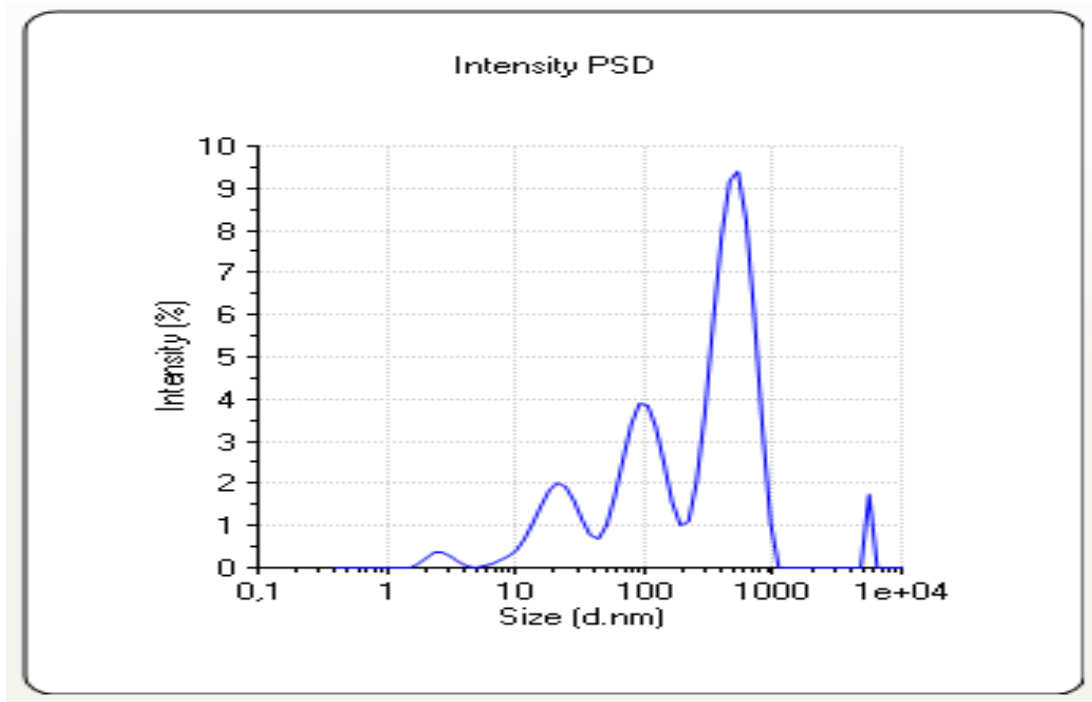


Fig.III.9c. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E₃(24h).

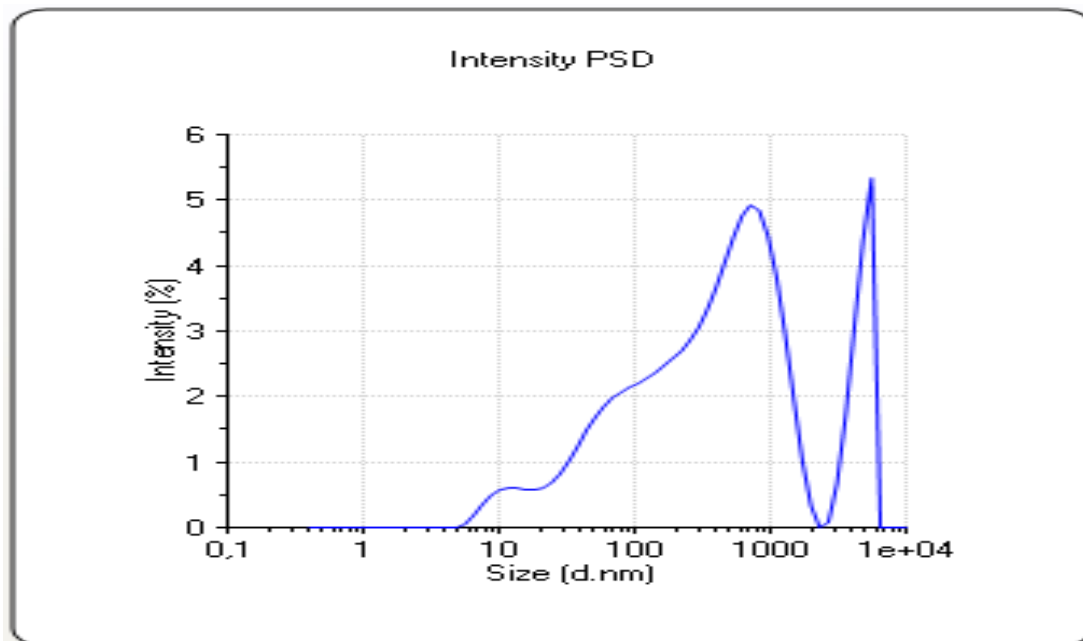


Fig.III.9a. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E₄(48h).

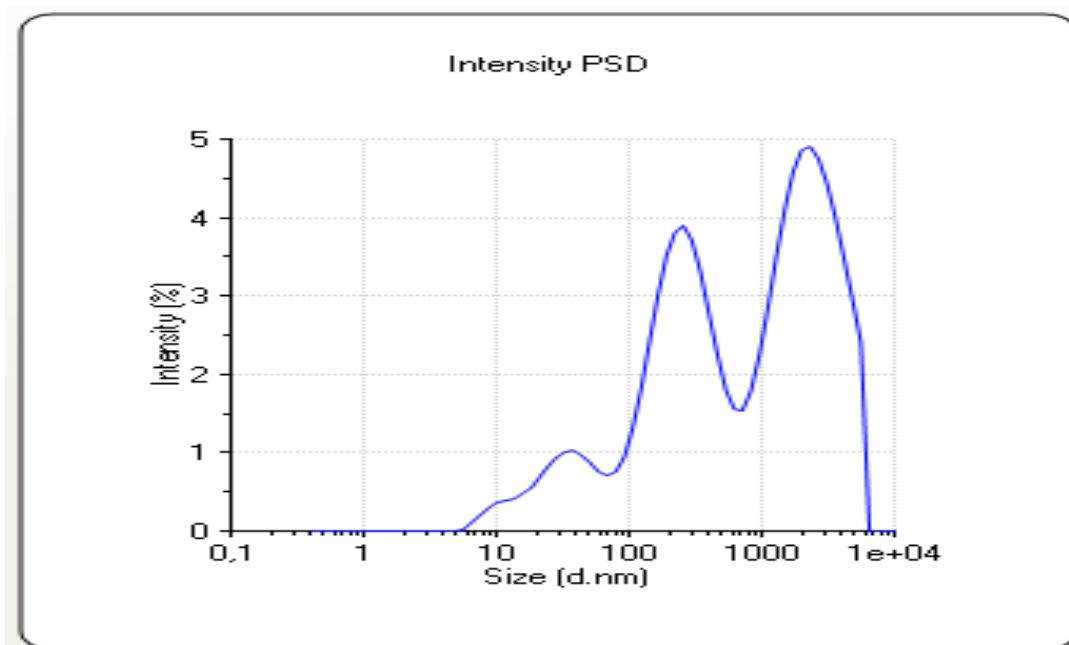


Fig.III.9.e. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par intensité de l'échantillon E₅(96h).

Concernant les échantillons restants : 24h, 48h et 96h, les figures III.9_c, III.9_d et III.9_e), montrent l'apparition de plusieurs populations de nanoparticules illustrant une agrégation remarquable avec le temps, avec des indices de polydispersité variant respectivement de 0.591, 0.792 et 0.781 : tous les indices de polydispersité sont supérieurs à 0.3, l'agrégation est donc confirmée.

Ceci a été expliqué par le fait que, l'irradiation UV en milieu aqueux produit continuellement les électrons solvatés qui réduisent les cations métalliques en atomes métalliques. Ces derniers coalescent pour former les agglomérats [9]. Cela confirme donc les résultats des analyses par spectrophotométrie UV-vis.

En plus, cette agrégation est poussée par la production d'un plus grand nombre de groupements hydroxyles par dégradation UV de l'alginate [10], la réductibilité de la solution contenant les ions Ag⁺ est donc plus élevée : la concentration initiale en atomes libres Ag⁰ (nucléus) est très importante, et donc l'agrégation de ces derniers ne peut être évitée.

On peut remarquer aussi, d'après les résultats présentés dans le tableau III.1 que les AgNPs préparées à 3h d'irradiation UV de diamètre élevé ont été obtenus. Une redistribution ou une désintégration de taille s'est produite lors d'une exposition prolongée à la lumière UV. Ce phénomène semble conforme à un mécanisme de fragmentation des AgNPs rapporté dans la littérature [11,12] et peut être résumé comme dans la réaction en cascade présentée ci-dessous.



Il semble que le contrôle de la taille des AgNPs peut être obtenu après une période d'irradiation définie.

On sait que la détection de nanoparticules de petites tailles dans un mélange polydisperse est difficile dans l'analyse par DLS ; pour cette raison, nous avons étudié, en plus de la distribution de taille par intensité de lumière diffusée, la distribution de taille par nombre de nanoparticules formées pour déterminer par la suite les diamètres des plus petites nanoparticules présentes dans les échantillons préparés. La distribution de taille par nombre est présentée dans les figures III.10 ci-après :

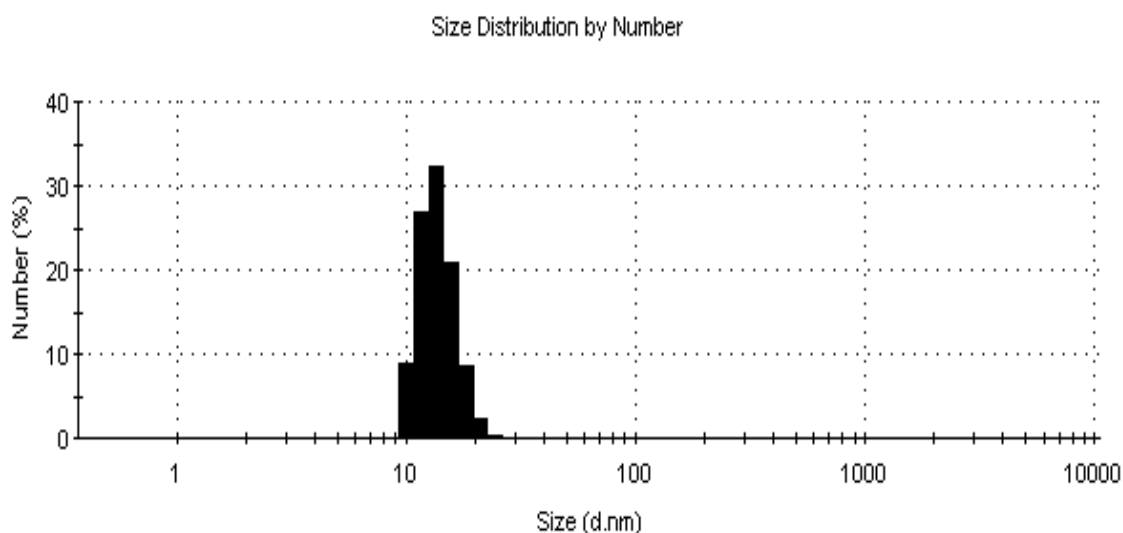


Fig.III.10. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon E₁(1h).

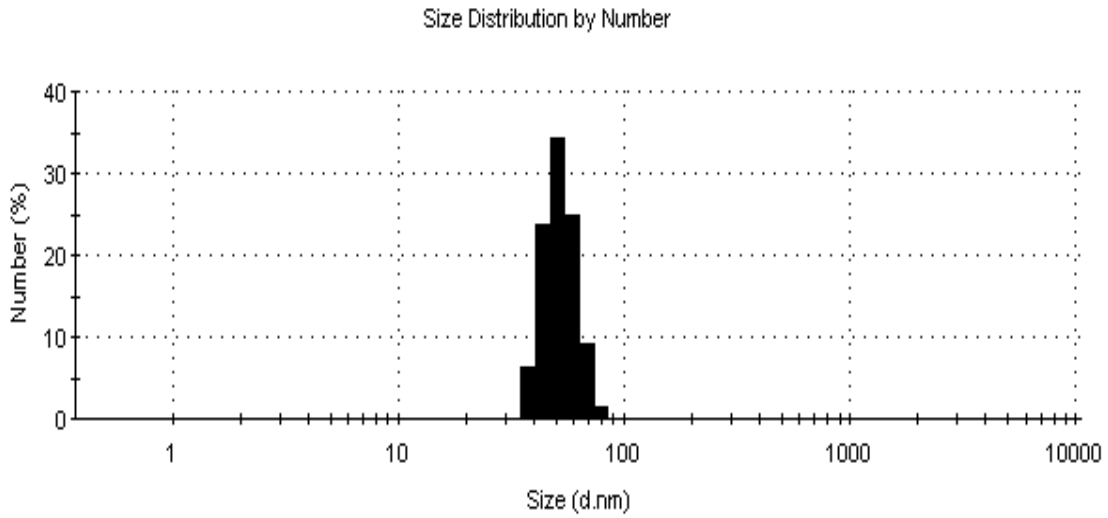


Fig.III.10_b. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon E₂(3h).

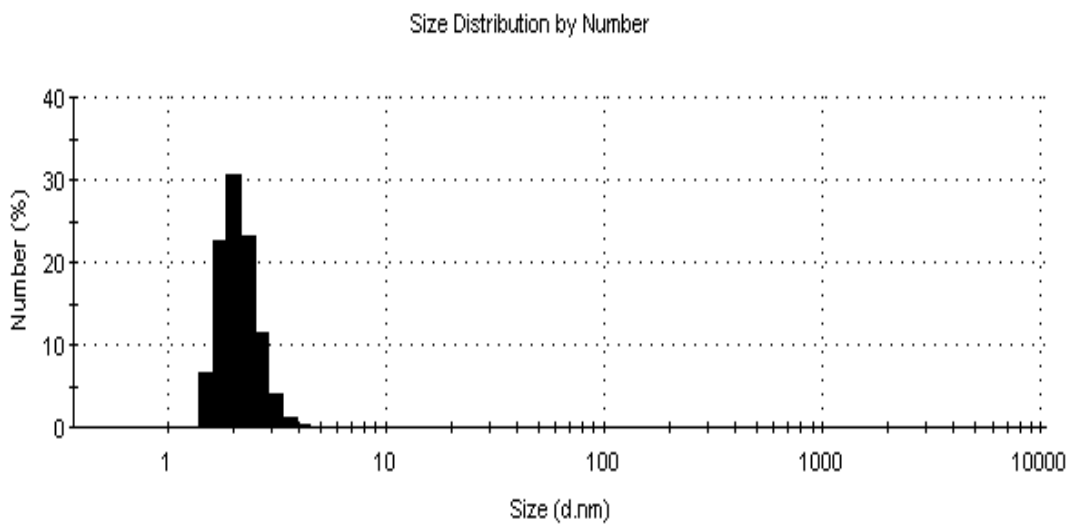


Fig.III.10_c. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon E₃(24h).

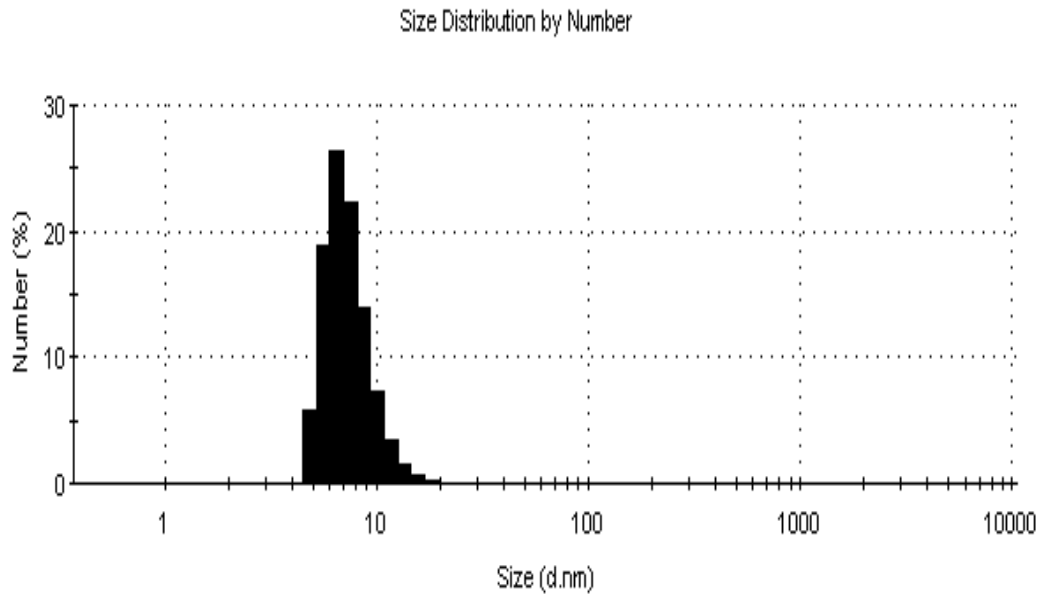


Fig.III.10a. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon E₄(48h).

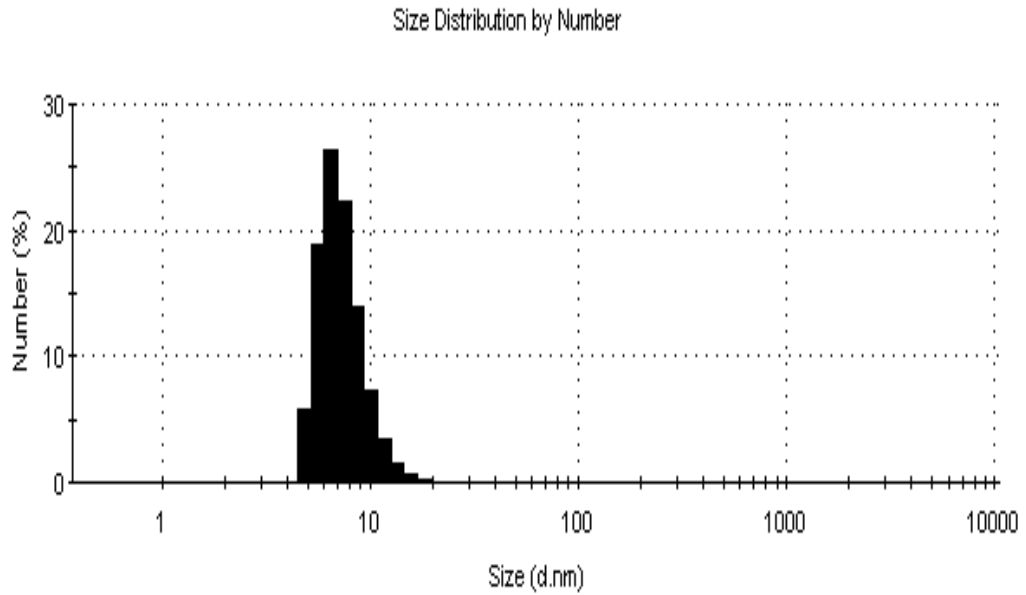


Fig.III.10b. Graphique obtenu par diffusion dynamique de la lumière montrant la distribution de taille par nombre de l'échantillon E₅(96h).

Nous pouvons voir sur la figure III.10_a, que le plus grand nombre de nanoparticules d'argent dans l'échantillon E₁ concerne les AgNPs de 10 à 11nm de diamètre hydrodynamique.

Dans l'échantillon E₂ (Fig.III.10_b), la population de nanoparticules la plus importante en nombre a un diamètre de 57.05 nm.

Pour les échantillons E₃, E₄ et E₅ (Fig.III.10_c, III.10_d et III.10_e), les nanoparticules les plus nombreuses ont respectivement les diamètres de : 2nm, 7nm et 7nm.

Ces résultats confirment l'hypothèse de désintégration des nanoparticules agrégées après une irradiation UV prolongée.

Conclusion

Ce chapitre expérimental 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'alginate comme agent stabilisant pour la réduction du nitrate d'argent a été validée.

Les nanoparticules d'argent ont été caractérisées en solution en mesurant leur résonance des plasmons de surface par spectrophotométrie UV-vis et diffusion dynamique de lumière (DDL).

Nous avons pu montrer que les échantillons E₁, E₂, E₃, E₄ et E₅ présentent tous des spectres de résonance plasmon de surface avec un maximum d'absorption qui varie avec le temps d'irradiation UV et une allure supposant la formation de nanoparticules de forme sphérique ou proche d'une sphère.

La distribution de taille des nanoparticules ainsi obtenues a été analysée par diffusion dynamique de lumière. Les graphiques de distribution par intensité indiquent la formation de nanoparticules agrégées pour tous les échantillons. Quand aux graphiques de distribution par nombre, ils montrent que les nanoparticules dans les échantillons suscités sont majoritairement de diamètre hydrodynamique de 10 à 11 nm, 57.05 nm, 2 nm, 7 nm et 7 nm respectivement.

Il est à noter que dans le cas de formation de nanoparticules polydisperses, l'analyse par diffusion dynamique de lumière ou la spectrométrie UV-Vis ne suffisent pas pour la caractérisation des nanoparticules formées. Il est nécessaire d'utiliser des techniques plus fiables comme la microscopie électronique à balayage (MEB) ou la microscopie électronique à transmission (TEM).

Références bibliographiques

- [1] Shilpa sharma, Pallab Sanpui, Arun Chattopadhyay et Siddhartha Ghosh, "Fabrication of antibacterial silver nanoparticle- sodium alginate -chitosan composite films", *RSC Advances*, **2**, 5837-5843, (2012).
- [2] Zhu YJ, Qian Y, Li X, et al. " γ -radiation synthesis and characterization of polyacrylamide-silver nanocomposites". *Chem Commun*, **10**, 1081–1082, (1997).
- [3] Bogle KA, Dhole SD, Bhoraskar VN, "Silver nanoparticle: Synthesis and size control by electron irradiation", *Nanotechnology*, **17**, 3204–3208, (2006).
- [4] Janata E, Henglein A, Ershovt BG, "First clusters of Ag⁺ ion reduction in aqueous solution", *J Phys Chem*, **98**, 10888–10890, (1994).
- [5] Janata E, "Structure of the trimer silver Ag₃²⁺", *J Phys Chem B*, **107**, 7334–7336, (2003).
- [6] Sepideh Keshan Balavandy, Kamyar Shameli, Zurina Zainal Abidin, " Rapid and Green Synthesis of Silver Nanoparticles via Sodium Alginate Media", *Int. J. Electrochem. Sci.*, **10** 486 – 497, (2015).
- [7] MTIMET Issam, "Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent", thèse de doctorat, INSA de Rouen, 2011, 156.
- [8] Luo C, Zhang Y, Zeng X, Zeng Y, Wang Y, " The Role of Poly(ethylene glycol) in the Formation of Silver Nano-particles", *J. Coll. and Inter. Science*, **288**, 444, (2005).
- [9] Torres E, Mata YN, Blázquez ML, Muñoz J, González F, Ballester A, " Gold and silver uptake and nanoprecipitation on calcium alginate beads", *Langmuir*, **21 (17)**, 7951–7958, (2005).
- [10] Jaroslaw M. Wasikiewicz, Fumio Yoshii, Naotsugu Nagasawa, Radoslaw A. Wach, Hiroshi Mitomo, "Degradation of chitosan and sodium alginate by gamma radiation, sonochemical and ultraviolet methods", *Radiation Physics and Chemistry*, **73(5)**, 287–29, (2005).

[11] Huang H, Yang X. "Synthesis of polysaccharide stabilized gold and silver nanoparticles: a green method", *Carbohydrate Research*, **339**, 2627–2631, (2004).

[12] Kamat PV, Flumiani M, Hartland GV, ` Picosecond dynamics of silver nanoclusters. photoejection of electrons and fragmentation`, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 3123–3128, (1998).

**CHAPITRE IV : ELABORATION ET
CARACTERISATION DES FILMS
NANOCOMPOSITE Alg-AgNPs-Cts**

Introduction

Comme énoncé au début de ce travail, nous nous intéressons à la conception d'un film nanocomposite à base de nanoparticules d'argent, d'alginate et de chitosane, afin d'envisager son application comme film antibactérien biocompatible et biodégradable.

Dans un premier temps notre stratégie de recherche consistait à former les nanoparticules d'argent stabilisées par l'alginate.

Maintenant, on s'intéresse à l'élaboration de films nanocomposites chitosan – nanoparticules d'argent selon un procédé ex-situ consistant à introduire les dispersions de nanoparticules d'argent précédemment synthétisées, dans la dispersion aqueuse de chitosane pour avoir enfin, le film bionanocomposite après évaporation du solvant.

Nous allons finir par la caractérisation de ces films et l'évaluation de leurs propriétés antibactériennes avec des bactéries à Gram⁺ et Gram⁻.

IV.1.Détermination du degré de déacétylation du chitosane

Comme les propriétés du chitosane dépendent principalement de la masse molaire et du degré de déacétylation (DDA), nous nous sommes intéressés à déterminer le DDA du chitosane de masse molaire moyenne, objet de cette étude.

Nous avons choisi la méthode d'analyse FTIR pour calculer le degré de désacétylation du chitosane. C'est une technique rapide qui permet d'évaluer qualitativement le DA en calculant les rapports des absorbances d'une bande caractéristique d'un groupement acétyle sur une bande commune aux unités acétylés et désacétylés.

L'analyse se fait sur un échantillon solide (poudre) mais les résultats sont toutefois plus précis si l'échantillon est sous forme de film [1,2]. Cette analyse a été faite par solubilisation de 0.2 g de chitosane dans 100 mL d'acide acétique à 1%. La solution est déposée sur une boîte de petri en plastique (avec une épaisseur de liquide de 4 mm). Après séchage du film et lavage, la fine pellicule est récupérée et caractérisée par FTIR à température ambiante.

Il est possible par cette méthode de déterminer le degré de déacétylation (DDA) par les formules suivantes [3].

$$DA \% = [(A_{1320}/A_{1420}) \times 31.92] - 12.20$$
$$DDA\% = 100 - DA \%$$

Avec A_{1320} , A_{1420} sont les absorbances des pics à 1320 et 1420 cm^{-1} .

Des lignes de base sont tracées comme indiqué dans la figure IV.1. La bande à 1320 cm^{-1} caractéristique d'un groupement amide (-OH, -NH₂, -CO) pour déterminer le degré d'acétylation (ligne de base 6) et la bande à 1420 cm^{-1} comme référence avec la ligne de base 9. On obtient une relation linéaire entre le rapport A_{1320} et A_{1420} et le degré d'acétylation [3].

L'analyse du spectre IR du chitosane présenté dans la figure IV.2, a permis de déduire le DDA du chitosane utilisé dans la préparation des films nanocomposites : Le degré de déacétylation du chitosane obtenu par FTIR est de **81.11 %**.

Un tel DDA donne au chitosane une forte densité de charge, donc une solubilité élevée, et une capacité de fixation de cations métalliques importante.

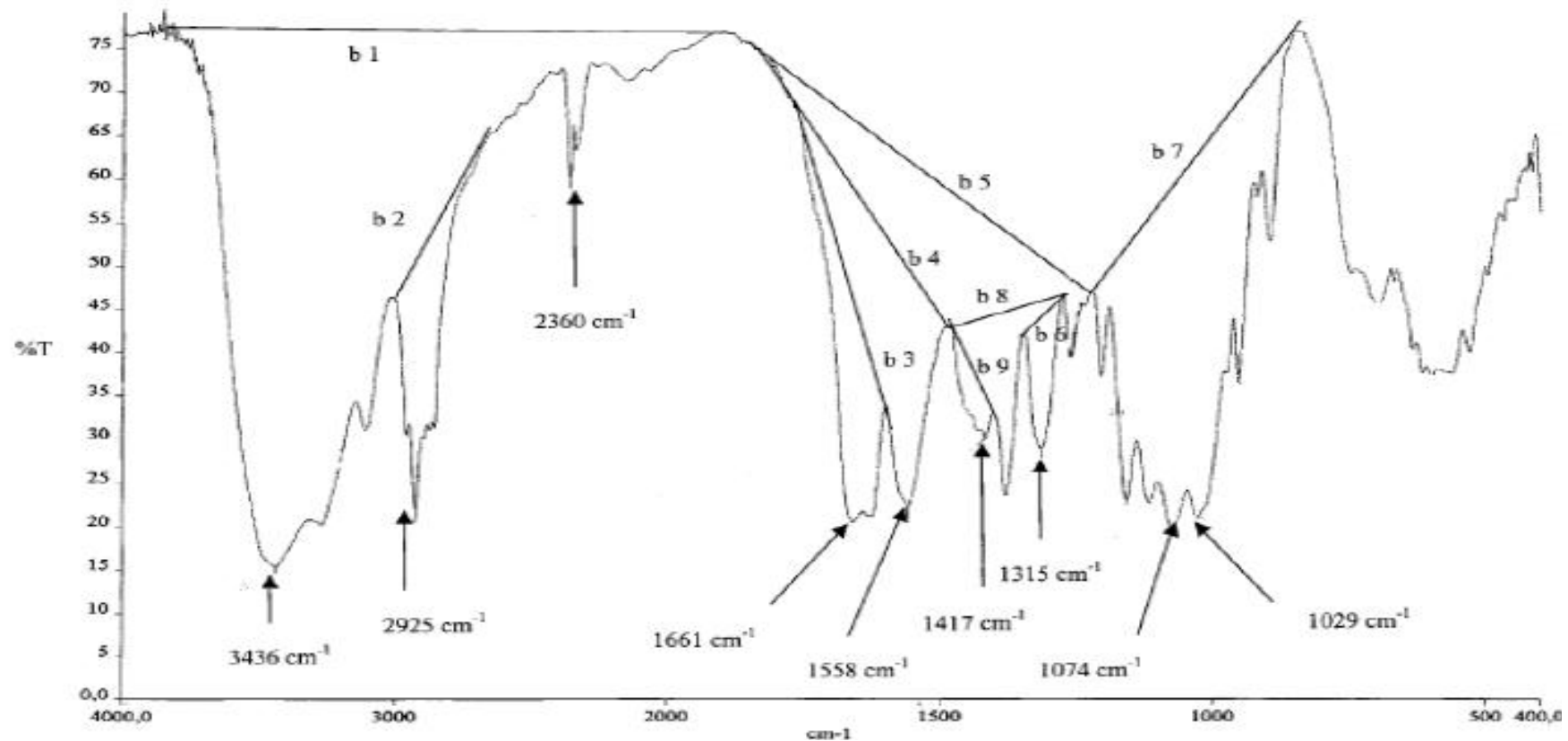


Fig.IV.1. Spectre IR caractéristique de la chitine indiquant les positions des bandes utiles ainsi que les lignes de base ^[3].

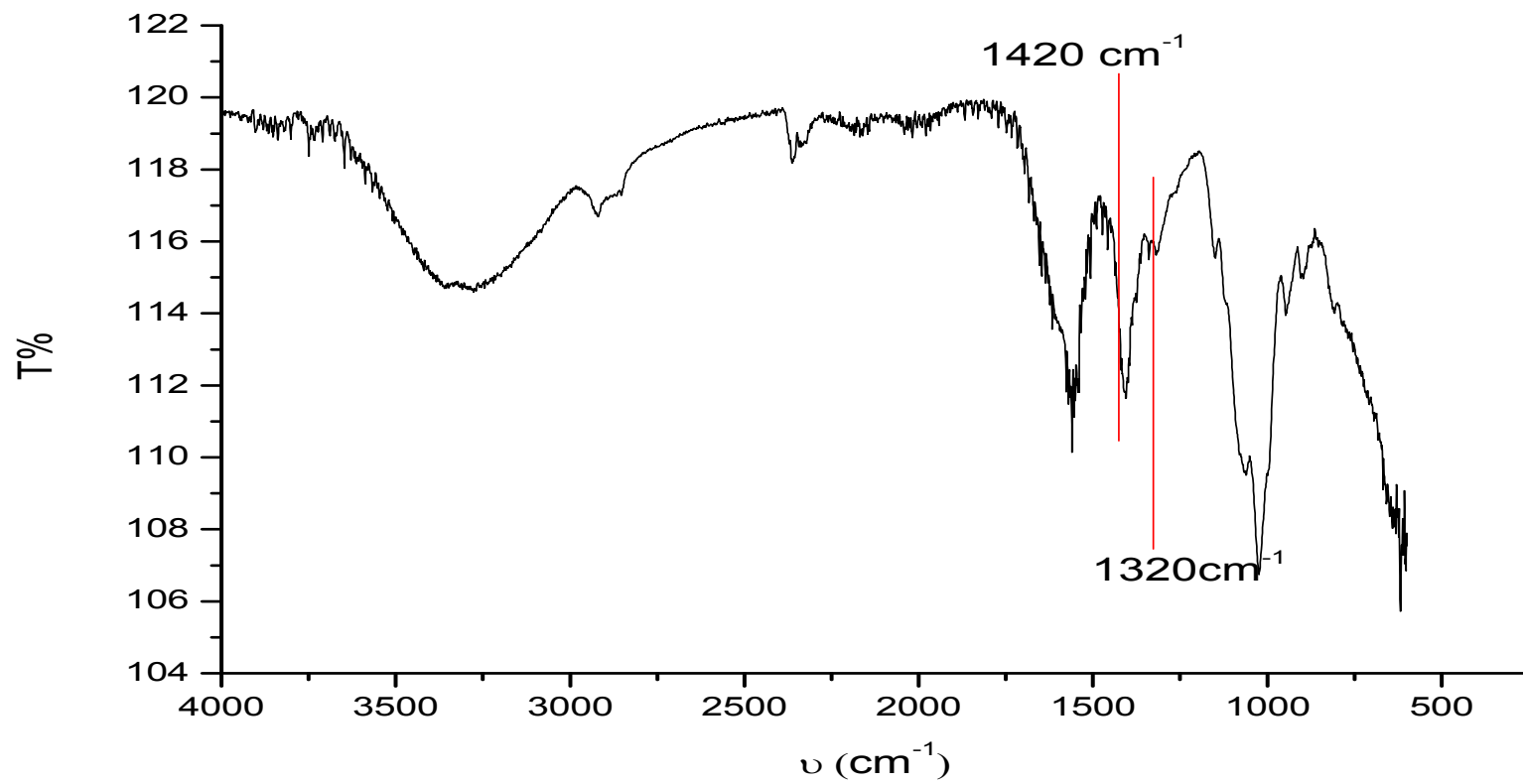


Fig.IV.2. Spectre IR du chitosane.

IV.2. Elaboration des films nanocomposites

La voie *ex situ* d'élaboration de films nanocomposite Alg-AgNPs-Cts, consiste en différentes étapes, schématisées dans la Figure IV-3 :

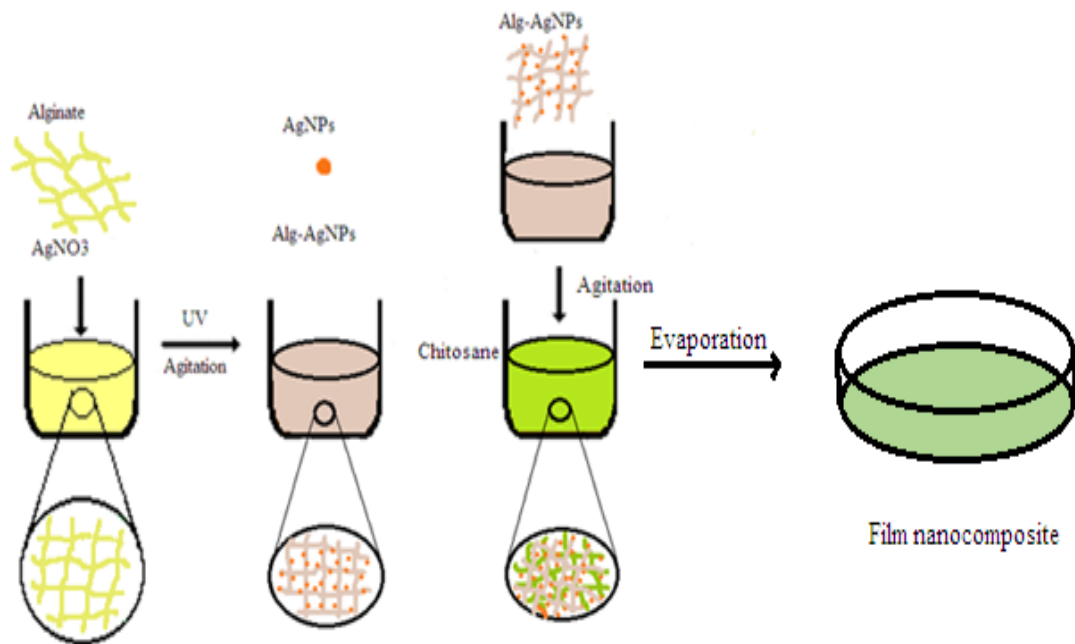


Fig .IV.3. Présentation schématique de la préparation du film nanocomposite à partir de AgNPs

- Synthétiser les nanoparticules d'argent en solution.
- Introduire les nanoparticules colloïdales dans la préparation de la matrice chitosane.
- Couler et évaporer la préparation pour enfin obtenir le film nanocomposite.

Dans une solution de 25 ml de chitosane 0.2% (CH₃COOH /Acétone, 1 : 1 (v/v), pH=5), est ajouté 25 ml de solution d'alginate-AgNps, goutte à goutte durant 30 min, sous une agitation de 3000 rpm. Le mélange réactionnel est récupéré dans des boites de petri en polystyrène de 90 mm de diamètre. L'évaporation de l'eau est menée dans ces boites de pétri, dans une étuve à 30°C. Les films sont récupérés et démoulés au bout de 4 jours et sont systématiquement stockés à l'abri de la lumière dans des dessiccateurs.

IV.3. Analyse morphologique

IV.3.1. Microstructure des films

Afin de visualiser l'état de surface des films nanocomposites synthétisés, des photographies en microscopie électronique à balayage ont été réalisées sur les films du chitosane seul, du film chitosane – alginate et des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts élaborés à différents temps d'irradiation (E_1 , E_2 , E_3 , E_4 , et E_5), la microscopie optique et la microscopie électronique à balayage ont été réalisées.

Les films préparés à partir de chitosane, d'alginate-chitosane et d'Alg-AgNPs-Cts ont été analysés par microscopie optique comme représenté sur les figures IV. (4a), (4b) et (4c) respectivement .

Sur la figure (4a), la photographie du film de chitosane révèle une surface lisse et homogène. En effet, la structure moléculaire et la nature des interactions entre les fragments de chitosane sont les principales raisons d'une forte cohésion, qui se traduit par une homogénéité et une finesse de surface au niveau de la microscopie optique [4].

De toute évidence, des interactions beaucoup plus complexes sont impliquées lorsque le chitosane et l'alginate sont mélangés ensemble, puisqu'ils sont essentiellement de nature électrostatique, aboutissant ainsi à une morphologie de surface et à une topographie différente.

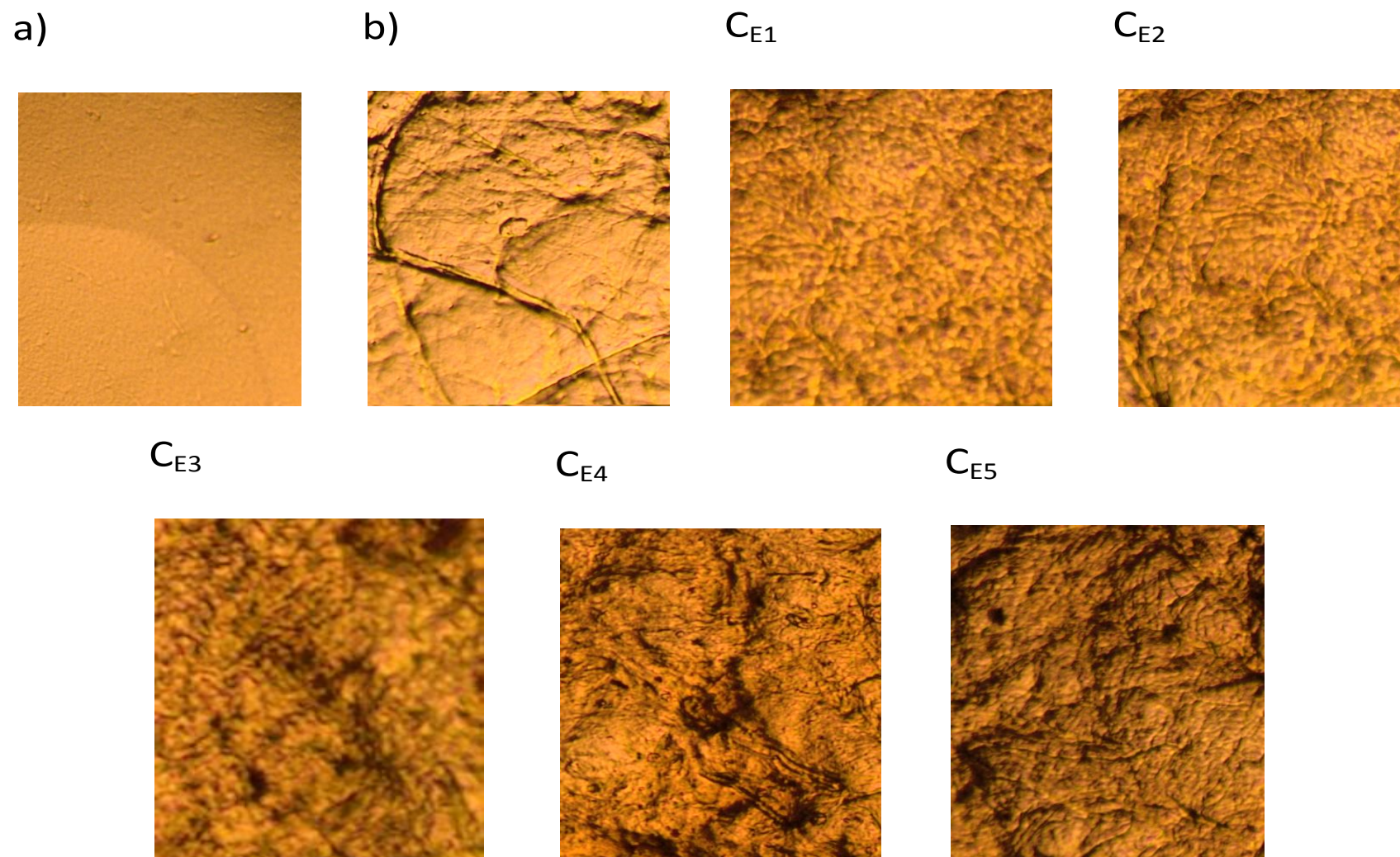


Fig.IV.4. Image MOP des films : a) Cts, b) Alg-Cts et c) Alg-AgNPs-Cts.

La figure (4b) représente la photographie du film du complexe chitosane-alginate, qui apparaît avec une rugosité de surface beaucoup plus proche de celle de l'agrégation des polyélectrolytes.

Les films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts, apparaissent également avec une rugosité élevée et des structures fibrilles. La microstructure observée dans les films Alg-AgNPs-Cts, 4c (E₁ - E₅) ressemble à celle du film alginate-chitosane et a été expliquée par les interactions électrostatiques formées entre les molécules d'alginate et de chitosane [4].

IV.3.2. Analyse par microscopie électronique à balayage

Les micrographies électroniques (MEB) de la surface des films de l'échantillon C_{E4} présente une structure compacte et homogène sans pores (figure.IV.5).



Fig.IV.5. Micrographe de surface du nanocomposite C_{E4}

La topographie en coupe transversale du film C_{E4} est visualisée dans la figure IV.6. La section, apparaît comme lisse mais présente des fissures distribuées le long de l'épaisseur du film. Ce comportement pourrait résulter de l'insuffisance d'interactions qui stabilisent la structure [5].

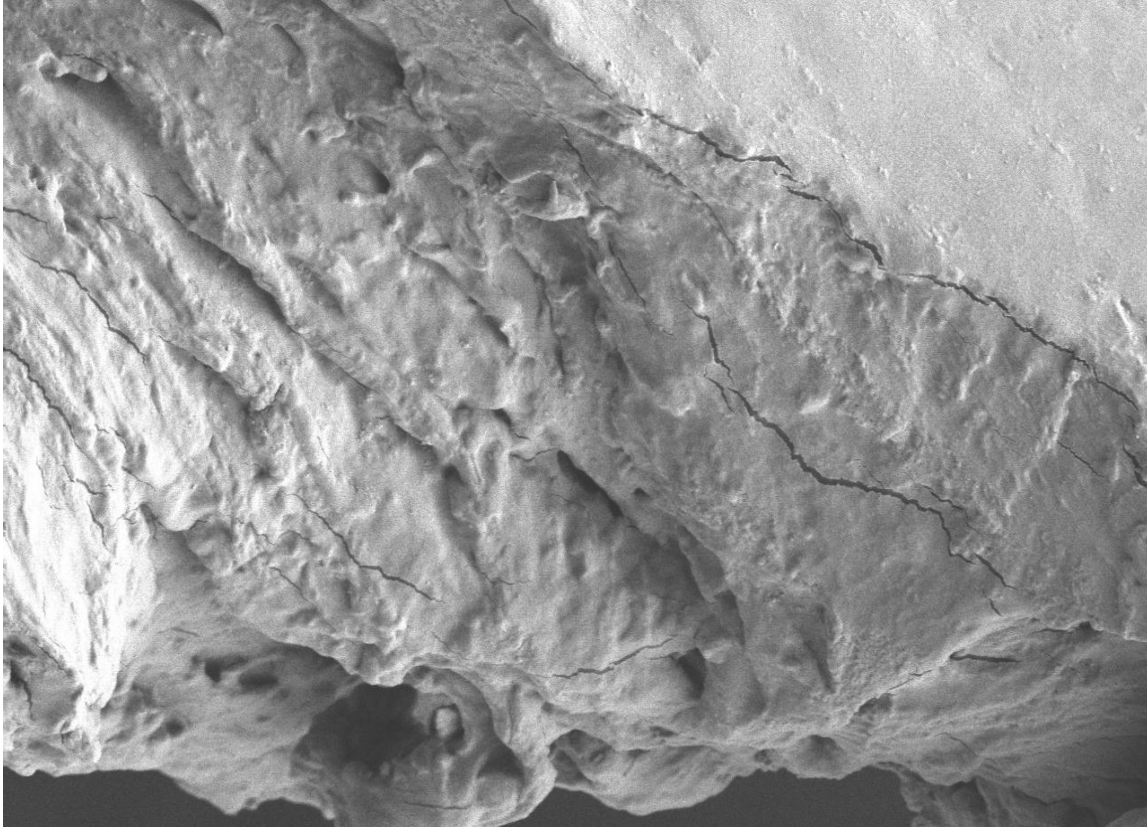


Fig.IV.6. Micrographie de la section transversale du nanocomposite C_{E4} .

Les figures IV.7, IV.8, IV.9, IV.10 et IV.11 présentent les images MEB des différents films obtenus après réaction du chitosane avec les solutions Alg-AgNPs préparées.

Le premier constat qu'il est possible de tirer des images MEB des échantillons est que la formation de nanoparticules d'argent semble efficace. Le deuxième constat est que la distribution de taille est large. En effet celles-ci tendent plutôt à se regrouper.

Les échantillons sont constitués de particules très polydisperses en taille. De très petites particules assimilables à un point illuminant apparaissent dans tous les échantillons, elles constituent normalement les nanoparticules d'argent à faible taille.

Deux types de particules sont également visibles. Certaines sont d'aspect irrégulier, basées sur l'agrégation de nanoparticules et d'autres sont de forme sphérique ou proche d'une sphère. Les dimensions des particules agrégées sont variables et peuvent atteindre 1 μm . Ceci confirme donc les résultats de DDL concernant l'agrégation.

On peut dire que les formes des nanoparticules synthétisées sont différentes et changent avec le changement du temps d'irradiation UV de la solution d'alginate/ AgNO_3 de 1h à 96 h. On peut voir sur ces figures de petites formes sphériques, des formes proches de sphères et des formes plates irrégulières ($\text{C}_{\text{E}5}$). Ceci peut être expliqué par l'élévation de la température de la solution lors du temps d'irradiation UV. Ce paramètre a un grand effet sur la modification des formes des nanoparticules formées, ce qui a été reporté par plusieurs chercheurs [6,7].

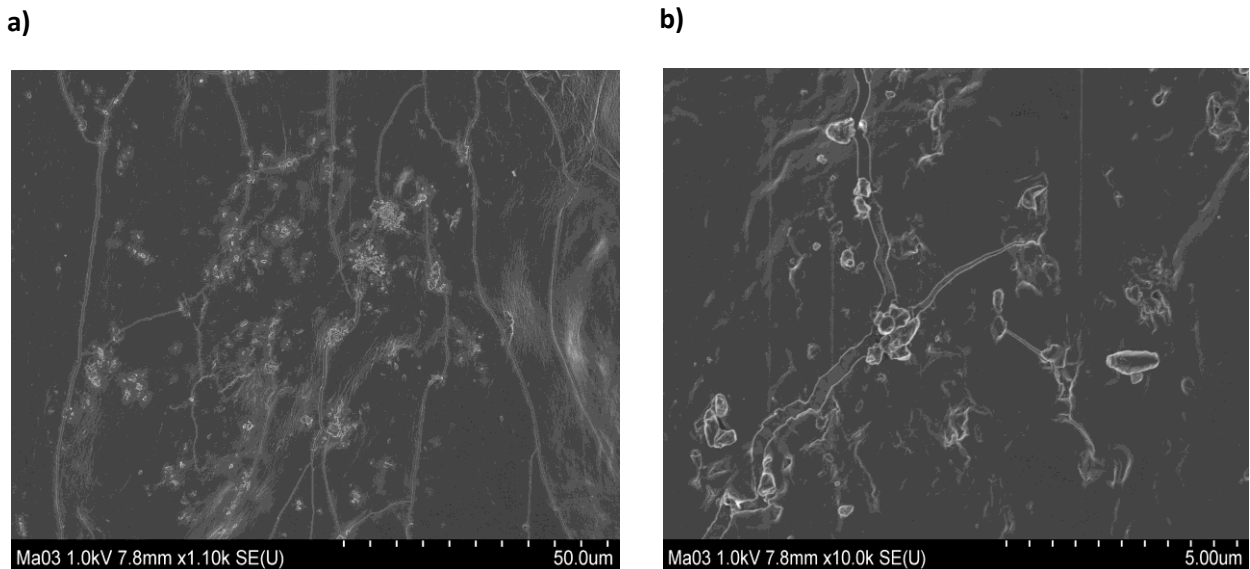


Fig.IV.7. Image en MEB du film $\text{C}_{\text{E}1}$. La barre d'échelle représente a) 50 μm b) 5 μm

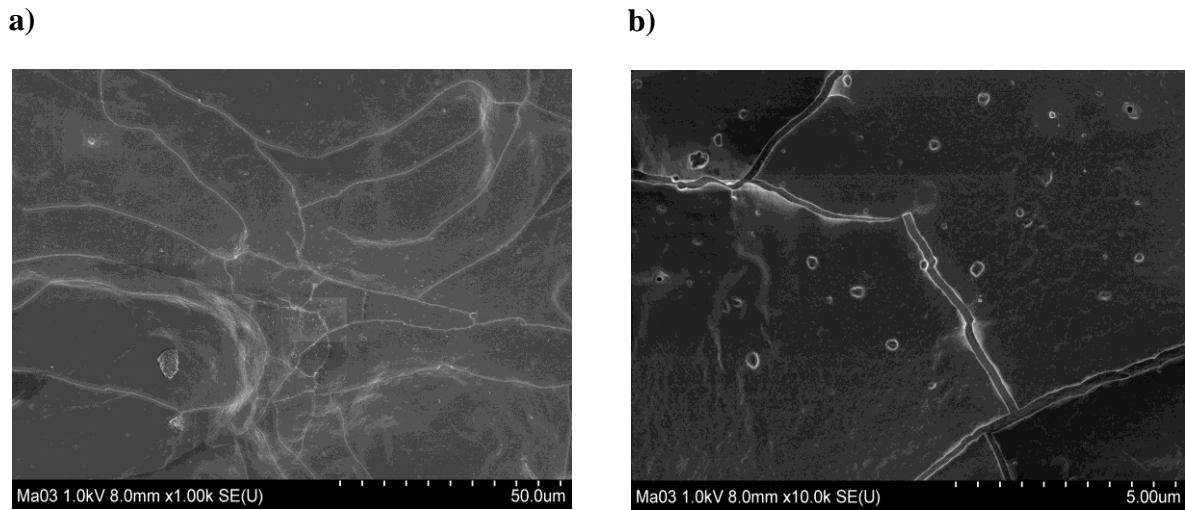


Fig.IV.8. Image en MEB du film C_{E2}. La barre d'échelle représente a) 50μm b) 5μm

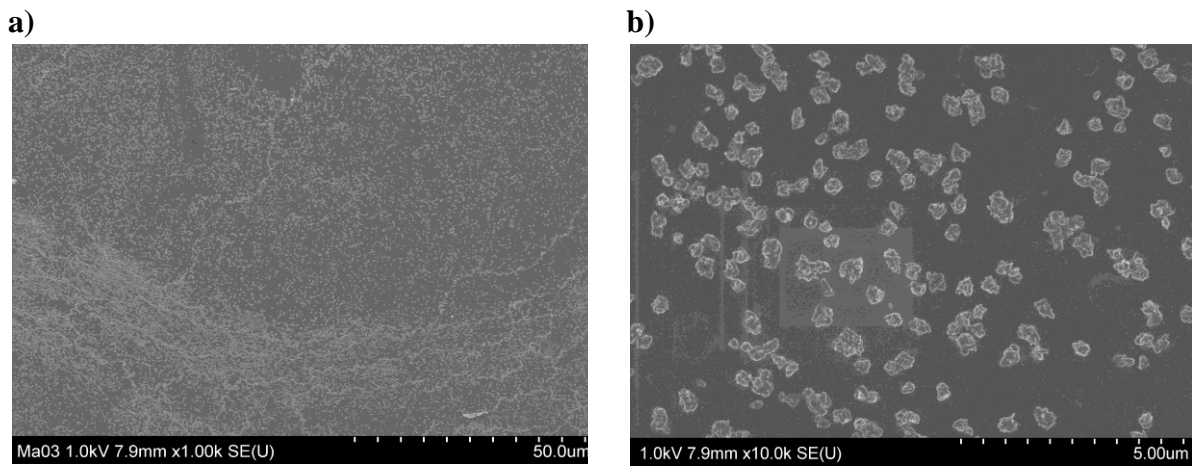


Fig.IV.9. Image en MEB du film C_{E3}. La barre d'échelle représente a) 50μm b) 5μm

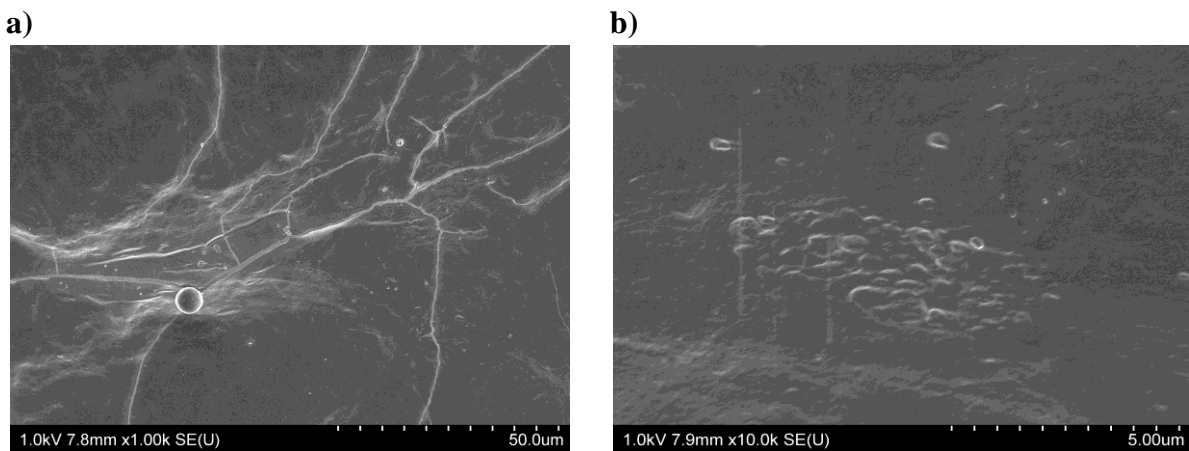


Fig.IV.10. Image en MEB du film C_{E4}. La barre d'échelle représente a) 50μm b) 5μm

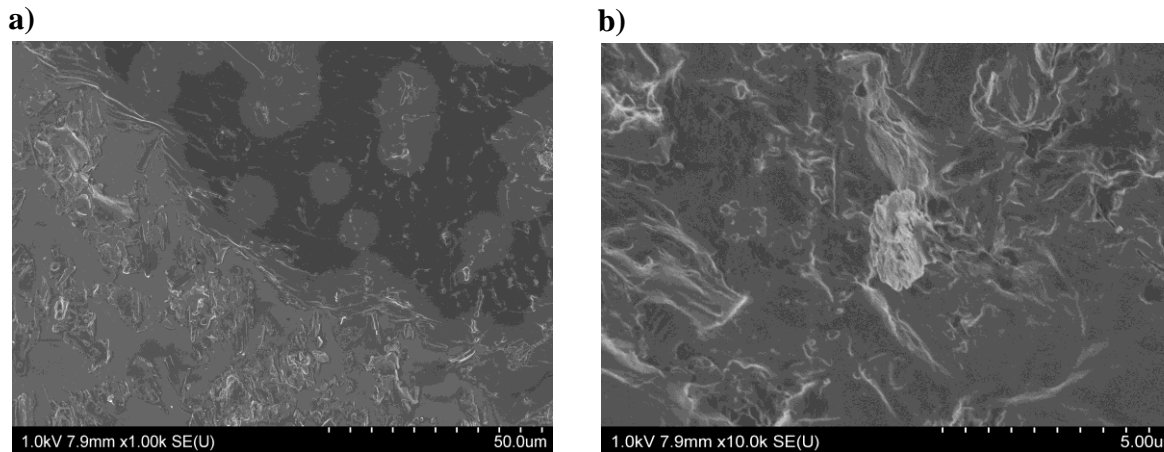


Fig.IV.11. Image en MEB du film C_{E4}. La barre d'échelle représente

a) 50µm b) 5µm

Nous avons donc confirmé par microscopie électronique à balayage (MEB) que la variation dans le temps d'irradiation UV lors de la préparation des nanoparticules d'argent dans l'alginate, entraîne le changement des formes et morphologies des AgNPs synthétisées. Il est à noter que des particules quasi sphériques sont toujours plus ou moins présentes dans tous les échantillons, ce qui est à l'origine de l'apparition des bandes de résonance plasmon de surface de ces particules à 419 nm.

IV.4. Analyse structurale

IV.4.1. Analyse par diffraction des rayons X

Suite à l'observation de cristaux en MEB, les échantillons ont été analysés par DRX : des informations précieuses peuvent être obtenues à partir de la technique DRX en chimie des solides et en sciences des matériaux.

Les données ont été prises pour des angles 2θ allant de 5 à 80 degrés avec un incrément de 0,02 °. Des pics significatifs de 2θ ont été attribués et leurs données ont été analysées.

La Figure. IV.12 est relative au diffractogramme du film de chitosane et présente deux pics à 2θ de 9,8 ° et 19,5 °, correspondant respectivement aux cristaux du chitosane hydratés et anhydres. La figure IV.13 représente le diagramme XRD du film Alg-AgNPs-Cts obtenu après 48 h d'irradiation UV.

Les pics correspondant à la région cristalline du chitosane ont pratiquement disparu, révélant une morphologie amorphe du complexe alginate-chitosane.

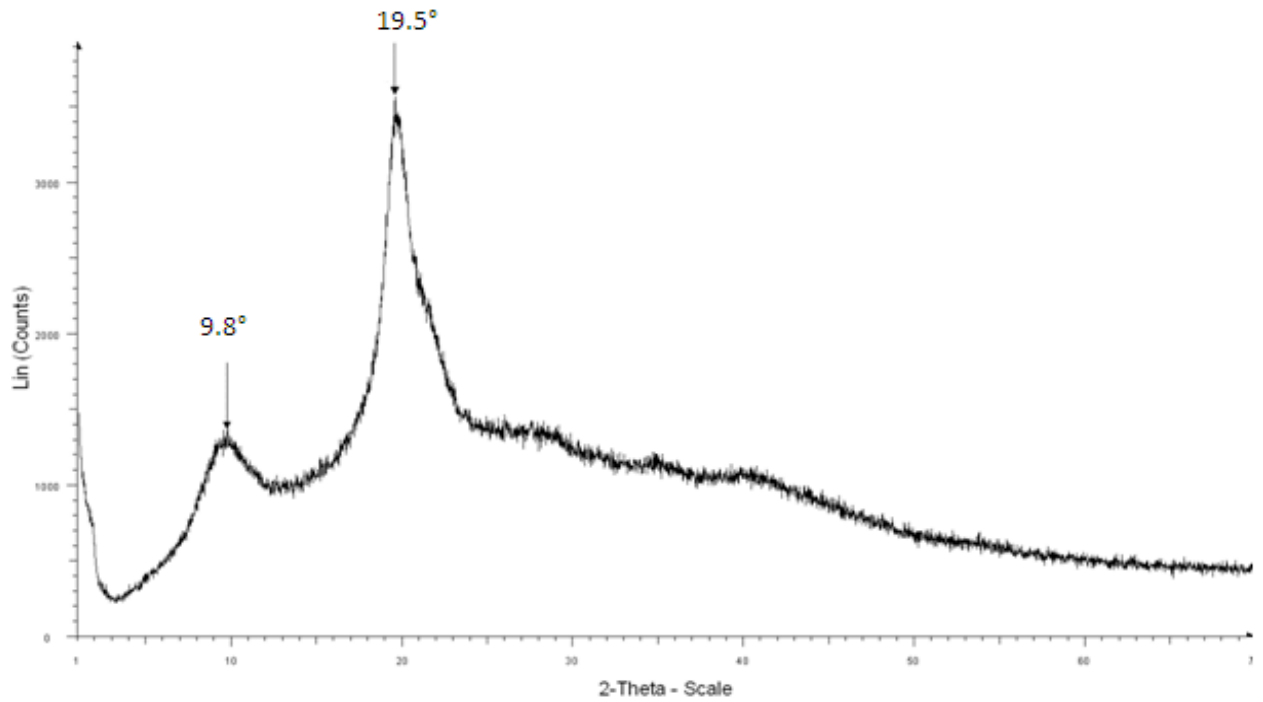


Fig.IV. 12. Diffractogramme RX du chitosan

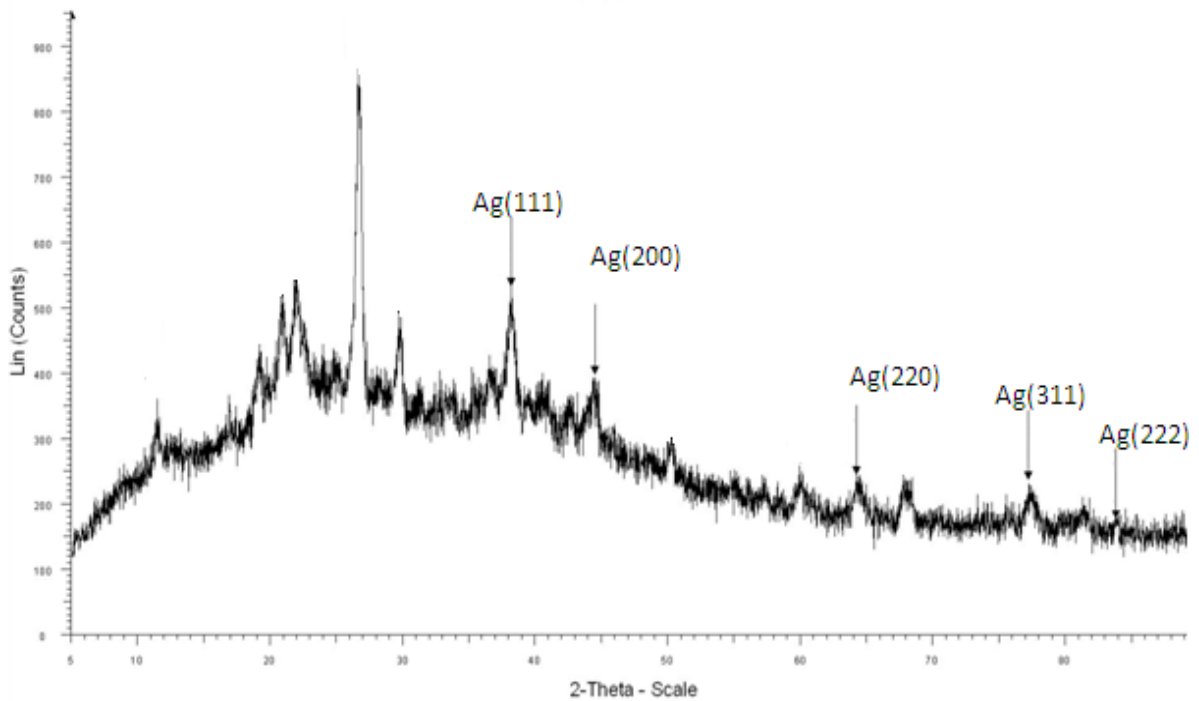


Fig.IV.13. Diffractogramme RX du film CE₄

Sur le diffractogramme du film nanocomposite, cinq valeurs de 2θ sont observées : à $38,28^\circ$, $44,60^\circ$, $64,21^\circ$, $77,28^\circ$ et $83,98^\circ$. Ces valeurs correspondent aux plans cristallins caractéristiques de d'argent (111), (200), (220), (311) et (222) respectivement, par comparaison avec le diagramme standard de diffraction des poudres de JCPDS, dossier argent N ° 04-0783. Un pic fort communément associé à la réflexion (111) dans les matériaux cubiques, est observé sur la figure.IV.13, ce qui confirme que les particules dans le film composite Alg-AgNPs-Cts sont des nanoparticules d'argent (CFC) [8].

IV.4.2. Analyse par spectrométrie FTIR

Le mélange d'alginate-chitosane et les matériaux composites Alg-AgNPs-Cts ont été analysés par spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (FTIR).

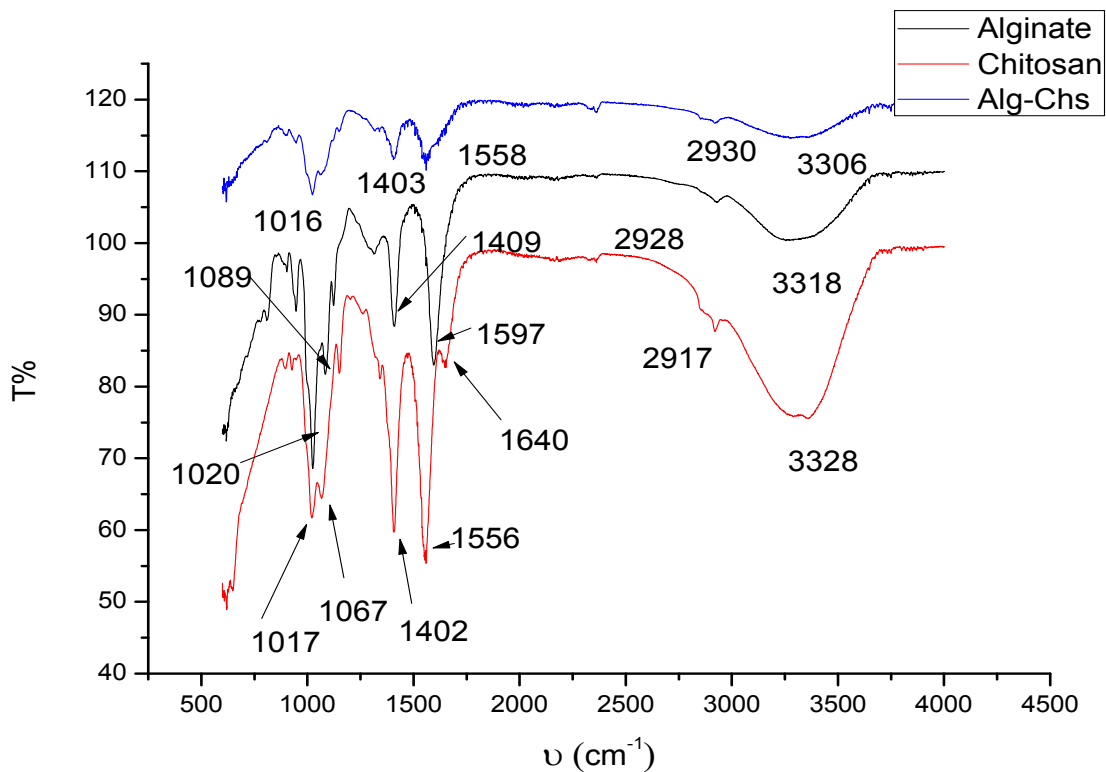


Fig.IV.14. Spectre IR de l'alginate, du chitosan et du film Alg-Cts (1:1).

La spectroscopie FTIR permet de caractériser les groupements fonctionnels dans l'alginate et le chitosane, en identifiant leurs bandes d'absorption caractéristiques. Elle peut aussi vérifier le déplacement de leurs valeurs une fois mélangés. Cette variation peut être due à des modifications chimiques ou physiques induites par les interactions entre ces polymères. La figure.IV.14, montre les spectres enregistrés, à température ambiante, des polymères alginate et chitosane, pris séparément, et du complexe polyélectrolyte alginate-chitosane.

En ce qui concerne l'alginate, les bandes caractéristiques d'absorption à 1597 et 1409 cm^{-1} représentent respectivement les vibrations d'élongation asymétriques et symétriques des anions carboxylate [9]. La large bande à 3318 cm^{-1} est attribuée à l'élongation des groupements hydroxyles présents dans le squelette de l'alginate de sodium et à la liaison hydrogène (O ... H + ... O), tandis que la bande à 2928 cm^{-1} est affecté à l'élongation $-\text{CH}_2$.

Le spectre infrarouge du chitosane solubilisé dans l'acide acétique/acétone, fait apparaître la bande d'absorption à 3328 cm^{-1} attribuée aux vibrations d'élongation des $-\text{NH}_2$ et $-\text{OH}$. Le pic à 2917 cm^{-1} , est due aux vibrations d'élongation de la liaison C-H aliphatique [10,11]. Il apparait également sur le spectre deux pics d'absorption d'intensité moyenne à 1640 cm^{-1} et 1556 cm^{-1} qui correspondent à l'élongation de la double liaison C=O des amides et à la déformation angulaire (cisaillement) de la liaison N-H des amines, respectivement [12]. Selon Serrero *et al.*[13], ces pics à 1640 et 1556 cm^{-1} sont les plus caractéristiques du chitosane. Ils sont aussi attribués aux vibrations de déformation NH_3^+ . Les deux absorptions autour 1160 cm^{-1} et 1027 cm^{-1} correspondent à la vibration d'élongation des groupements latéraux et à la bande glucosidique C-O-C du chitosane [14]. La bande de vibration de déformation angulaire du lien N-H apparait à 893 cm^{-1} [15].

Le spectre FTIR du film (chitosane / alginate (1/1)) montre des changements dans l'emplacement de certaines bandes d'absorption, et l'apparition ou la disparition de nouveaux pics en comparaison à l'alginate ou au chitosane seuls.

On peut voir la fusion de l'absorption amide I avec la bande d'absorption caractéristique de l'amide II, qui apparait avec une large absorption à 1558 cm^{-1} . Lors du mélange, l'interaction de l'alginate avec les groupements amine $-\text{NH}_2$ du chitosane se fait principalement par liaison hydrogène, la bande d'absorption à 1597 cm^{-1} est décalée à 1558 cm^{-1} (anions carboxylate), et la bande à 1409 cm^{-1} est décalée à 1403 cm^{-1} (Flexion) tandis que la bande de 1020 cm^{-1} apparait à 1016 cm^{-1} (déformation $-\text{CH}$).

D'autre part, le chitosane, l'alginate et leur mélange présentent la bande d'absorption caractéristique dans la région 3300-3400 cm^{-1} . La large bande du mélange à 3306 cm^{-1} révèle la présence d'un étirement $-\text{OH}$, d'une association polymère et également d'une liaison hydrogène intermoléculaire dans le mélange binaire d'alginate-chitosane (1: 1) [16].

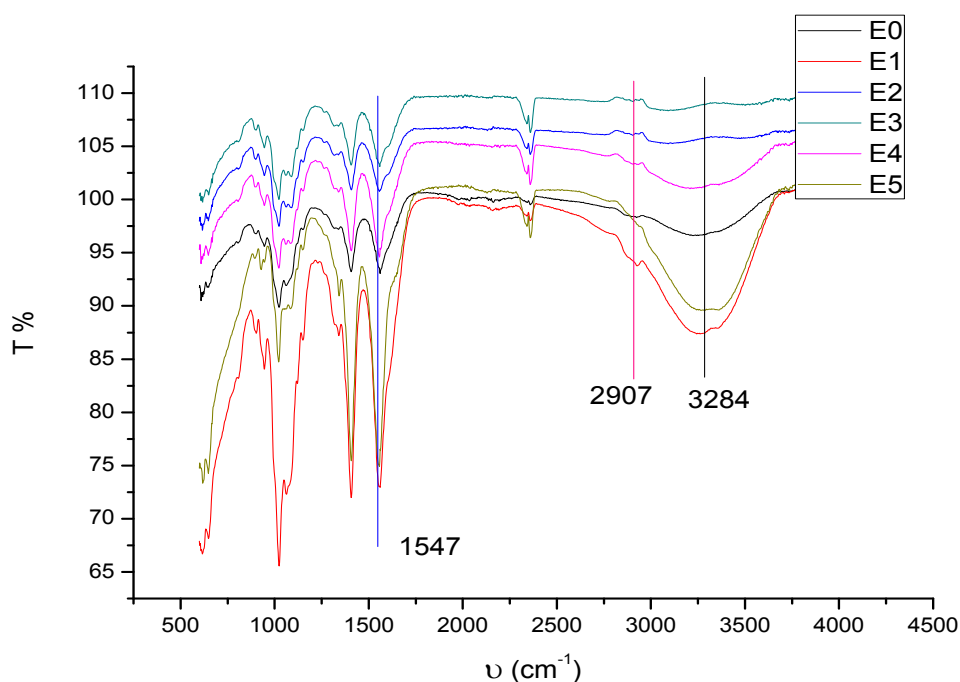


Fig.IV.15. Spectres IR des films composites : Alg-Cts (C_{E0}) et des films nanocomposites C_{E1} , C_{E2} , C_{E3} , C_{E4} et C_{E5}

Le graphique des spectres FTIR des films purs d'alginate-chitosane (E_0) et des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts préparés C_{E1} , C_{E2} , C_{E3} , C_{E4} et C_{E5} est représenté sur la figure.IV.15. On observe un changement intéressant dans la modification structurale du matériau composite lors de l'exposition au rayonnement UV : La réduction de certains pics est l'indication claire de la perte de certains groupes

Les vibrations d'élongation des groupes -OH à 3306 cm^{-1} dans le film d'alginate-chitosane pur ont été décalées à 3284 cm^{-1} , avec une perte importante dans l'intensité de la bande.

L'absorption d'élongation -CH à 2930 cm^{-1} est décalée à 2907 cm^{-1} , et les absorptions à 1558 cm^{-1} sont décalées vers 1547 cm^{-1} .

Sur la base de ces variations structurales, la formation d'une liaison chimique entre l'argent et les atomes d'oxygène de l'alginate a été suggérée. En conséquence, les groupes hydroxyles et carboxyles de l'alginate peuvent être impliqués dans la synthèse et la stabilisation des nanoparticules d'argent [17]

IV.5. Degré de gonflement en milieu physiologique

Le gonflement d'un film antibactérien représente un critère fondamental pour son application biomédicale envisagée. Le transport de l'eau à travers des films dépend non seulement de la rigidité intrinsèque de la macromolécule mais aussi du degré de réticulation de la matrice polymère. Les films à base de chitosane ; alginate ; et chitosane/alginate ainsi que les films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts ont été caractérisés par leur capacité au gonflement en solution tampon phosphate pH=7.4, étant donné que cette caractéristique influence significativement le processus de libération par diffusion des nanoparticules inclus.

Le degré de gonflement des films a été déterminé comme suit: une masse initiale (m_0) d'une pièce du film séché, est immergée dans 50 ml d'une solution tampon phosphate (PBS, pH=7.4, 25 c°) et laissée sous agitation. A différentes périodes de temps. L'échantillon humide a été tamponné avec précaution entre deux feuilles de papier filtre pour éliminer l'excès d'eau, et immédiatement pesé. Le degré de gonflement (SD) a été calculé en termes de quantité d'eau absorbée par rapport à la masse initiale. $SD = (m_w - m_0) / m_0$, m_w est la masse du film gonflé. Pour les mesures, on a utilisé une microbalance.

Aucun changement visuel n'a été observé lorsque les films préparés ont été immergés dans la solution. Le degré de gonflement (SD) des films par rapport au temps d'irradiation UV est illustré dans la figure IV.16.

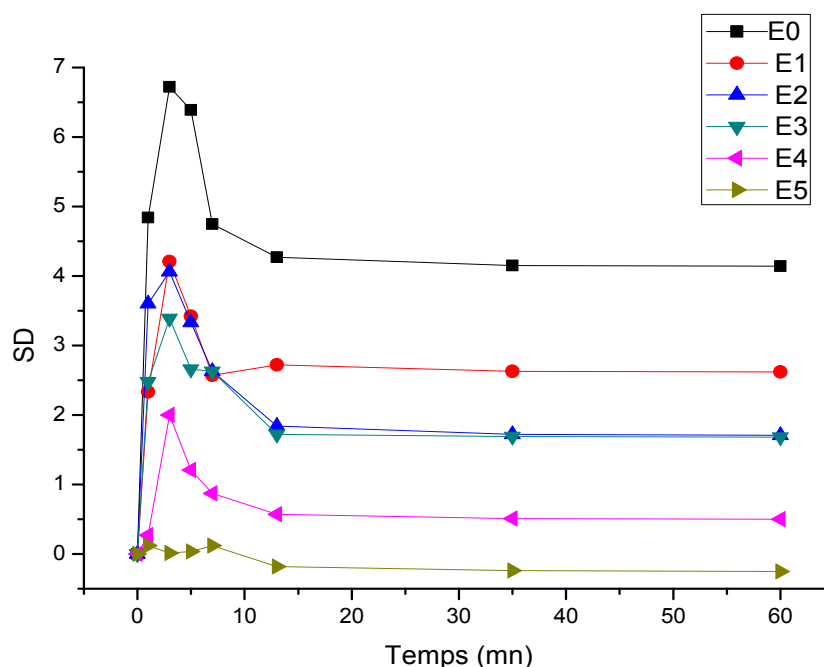


Fig.IV.16. Degré de gonflement des films nanocomposites Alg-AgNPs-Cts dans une solution phosphate saline à pH=7.4 à 23°C

L'équilibre du gonflement a été atteint au bout de 13 minutes. L'absorption d'eau augmente lorsque le temps d'irradiation UV des solutions d'alginate / AgNO₃ diminue et inversement.

Ce comportement peut s'expliquer par la disponibilité de groupes hydrophiles dans l'alginate (-OH et -COOH). Lors de l'irradiation UV, on insère plus de particules d'argent qui se lient aux groupements hydroxyles (-OH) ou carboxyles (-COOH), abaissant ainsi le nombre de sites hydrophiles disponibles, et par conséquent, le film devient moins sensible à l'hydratation.

En effet, le film composite d'alginate-chitosane (E₀) a montré un degré de gonflement plus élevé que n'importe quel film nanocomposite (C_{E1}, C_{E2}, C_{E3}, C_{E4} et C_{E5}). Cette diminution du degré de gonflement peut être attribuée à la liaison des AgNPs avec les atomes d'oxygène «O» et d'azote «N» des groupes hydroxyles et amines présents dans les chaînes d'alginate et de chitosane, produisant ainsi des réticulations supplémentaires dans les réseaux de chaîne [18].

IV.6. Activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des films a été évaluée en utilisant la méthode de diffusion de disque sur gélose Mueller-Hinton avec détermination des zones d'inhibition en mm..

Notre choix s'est porté sur six micro-organismes et une levure : E-Coli (ATCC 25922), S-Aureus (ATCC 25923), Acinetobacter Baumannii (ATCC 19606), Citrobacter Freundii (ATCC 8090), Bacillus Cereus (ATCC10876), Pseudomonas Aeruginosae (ATCC 27853), et Candidae Albicans.

E-coli, Pseudomonas Aeruginosae, Acinetobacter Baumannii et Citrobacter Freundii sont des bactéries à Gram⁻, alors que Bacillus Cereus et S-Aureus sont des bactéries à Gram⁺.

Une suspension bactérienne de microorganismes a été préparée dans un tube contenant 5 ml de TSE (triptone-sel-eau) stérile. La turbidité de la culture a été normalisée à l'aide du spectrophotomètre UV-Vis jusqu'à atteindre une absorbance équivalente à une turbidité de 0,5 Mc Farland. Ces suspensions contiennent environ 10⁶ UFC/ml.

La suspension bactérienne a été cultivée sur les plaques remplies d'agar Mueller-Hinton (préparé à partir d'une base déshydratée), stérilisée et refroidie jusqu'à 45-50 ° C.

On a versé le milieu fraîchement préparé et refroidi dans des boîtes de pétri en polystyrène stériles (90 mm de diamètre) sur une surface horizontale pour donner une épaisseur uniforme d'environ 4 mm. On laisse les plaques de gélose refroidir encore à température ambiante.

Le tampon de coton stérile a été immergé dans la suspension bactérienne et la surface déshydratée de la plaque de gélose Mueller-Hinton été inoculée par striesage de ce tampon sur la surface de la gélose stérile. Cette procédure a été répétée deux fois en faisant tourner la plaque d'environ 60° à chaque fois pour assurer une distribution régulière de l'inoculum. Comme dernière étape, le bord de la gélose a été épongé.

Des disques de 6 mm de diamètre de chaque film préparé a été placé sur la surface de la plaque de gélose inoculée dans les 15 min qui suivent l'inoculation avec le microorganisme témoin. Chaque disque a été pressé vers le bas pour assurer un contact complet avec la surface de la gélose. Les disques ont été placés individuellement et ensuite mis en étuve thermostatée à 37 °C pendant 24 h. La zone d'inhibition complète a été mesurée en utilisant un pied à coulisse. Les essais ont été effectués 3 fois.

Les images des films témoins Cts-Alg apparaissent dans la figure IV.17, suivante :

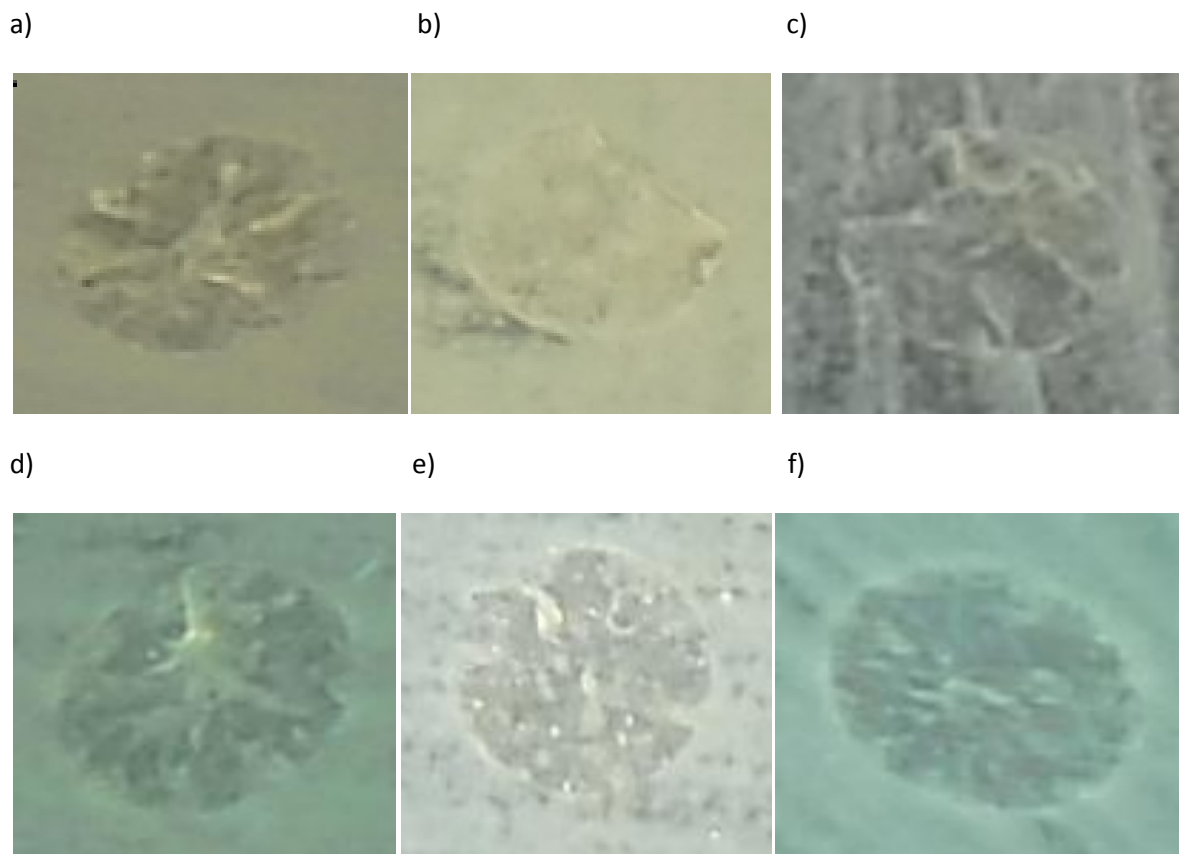


Fig. IV.17. Absence de zone d'inhibition du film Cts-Alg pour :
(a) *E-Coli*, (b) *S-Aureus*, (c) *P-Aeruginosae*, (d) *Citrbacter Freundii*, (e)
***Bacillus Cereus* et (f) *Acinetobacter Baumannii*.**

On remarque qu'il n'y a pas d'halo d'inhibition autour des films composites Cts-Alg, pour toutes les bactéries testées : le film composite Cts-Alg ne présente pas d'activité antibactérienne.

Les images des zones d'inhibition des films préparés à 1 h d'irradiation (C_{E1}) sont présentées dans la figure IV.18.

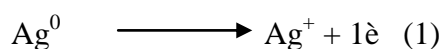
Une faible zone d'exclusion entourant les disques est observée pour E-Coli, S-Aureus, Citrobacter Freundii et Bacillus Cereus, alors qu'une plus grande zone d'exclusion apparaît pour P-Aeruginosae et Acinetobacter Baumannii.

La comparaison des diamètres de la zone d'inhibition telle qu'elle apparaît à partir de la figure IV.18, permet de fournir une tendance d'efficacité décroissante des composites d'argent dans l'ordre suivant :

$$P\text{-Aeruginosae} (9.0\text{mm}) > \text{Acinetobacter Baumannii} (8.7\text{mm}) \gg \text{Citrobacter Freundii} (8.5\text{mm}) > \text{Bacillus Cereus} (8.0\text{mm}) > \text{S-Aureus} (7.7\text{mm}) > \text{E-Coli} (7.6\text{mm})$$

Il a été rapporté que le comportement antibactérien des nanoparticules d'argent repose sur la disponibilité des ions Ag^+ [19,20] et que la quantité libérée d'ions Ag^+ , dans l'environnement aqueux environnant, joue un rôle clé dans l'activité antibactérienne [15] ; de plus, le contact physique direct avec les nanoparticules d'argent peut également induire la destruction des bactéries.

La dissolution des nanoparticules d'Argent, libère les ions Ag^+ antimicrobiens dans l'environnement aqueux comme le montre la réaction (1) et contribue partiellement à la capacité antimicrobienne du nanocomposite Alg-AgNPs-Cts par une destruction par libération [16]. Les ions Ag^+ libérés des nanoparticules d'argent peuvent déclencher l'inactivation des enzymes respiratoires et l'interruption du transport d'électrons [21,22] et interfèrent avec la perméabilité de la membrane microbienne et la réplication de l'ADN [23].



Il peut être suggérer aussi, en observant attentivement les zones d'exclusion, que les Ag-NPs ont du libérer des ions (Ag^+) des disques qui ont été adsorbés sur les molécules biologiques à l'intérieur des cellules bactériennes pour causer leur destruction. L'épaisseur de la zone d'inhibition est normalement dépendante de la bactérie et de la teneur des ions Ag^+ libérés : par exemple, P-Aeruginosae semble être plus sensible aux AgNPs que les autres souches bactériennes.

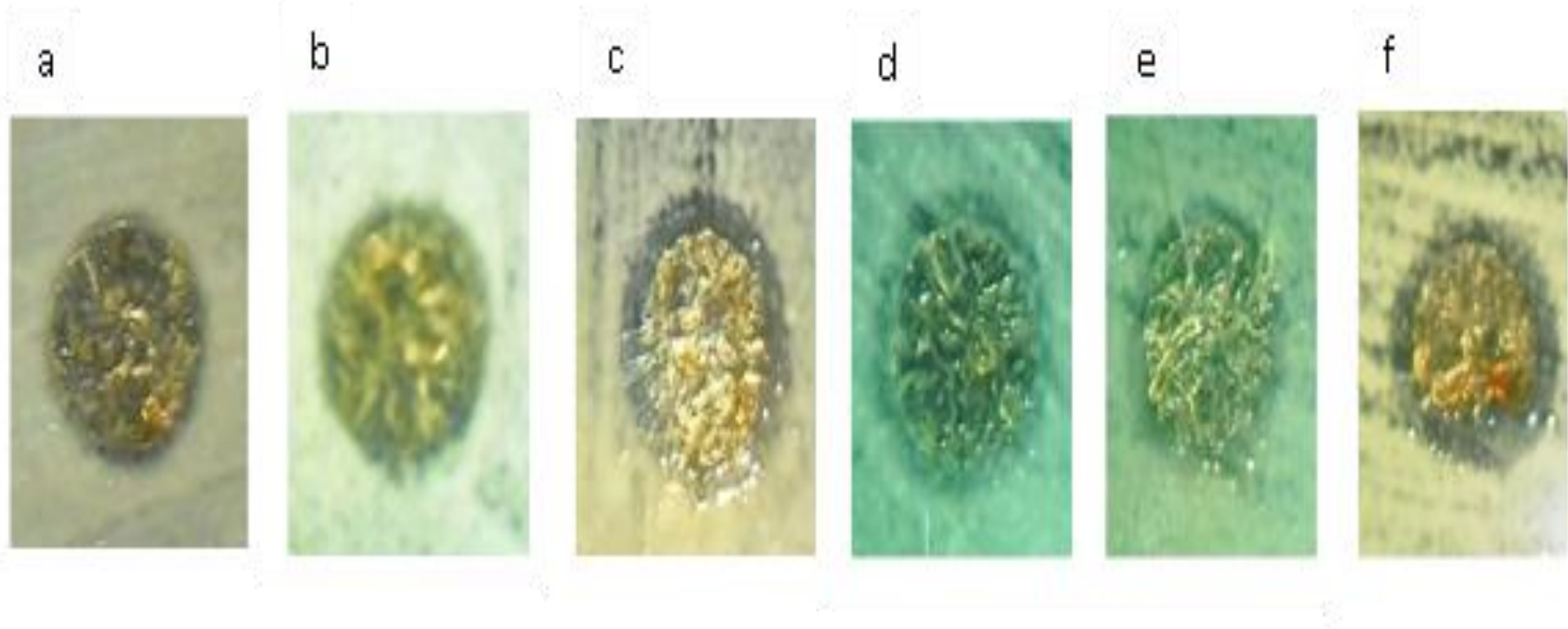


Fig.IV.18. Comparaison des zones d'inhibition du film C_{EI} entre : (a) *E-Coli*, (b) *S-Aureus*, (c) *P-Aeruginosae*, (d) *Citrbacter Freundii*, (e) *Bacillus Cereus* et (f) *Acinetobacter Baumanni*.

Lorsque l'échantillon (C_{E2}) est mis en contact avec les mêmes bactéries, les zones d'inhibition apparaissent uniquement pour les bactéries : *Citrobacter Freundii*, *P-Aeruginosae* et *Acinetobacter Baumannii*, comme illustré dans la figure IV.19.

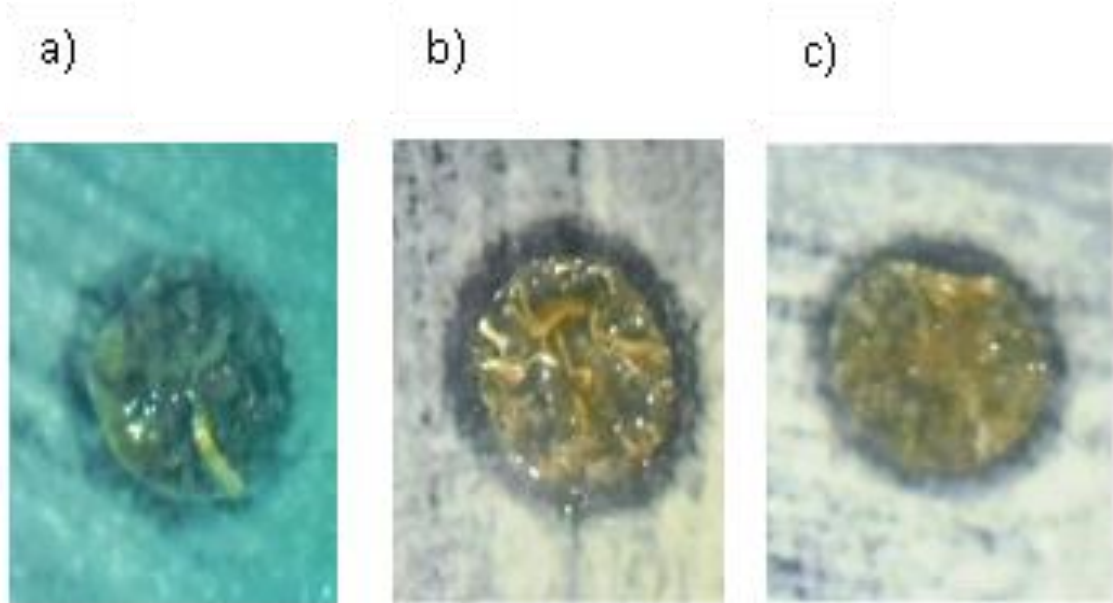


Fig.IV.19. Comparaison des zones d'inhibition du film C_{E2} entre: (a) *Citrobacter Freundii*, (b) *P-Aeruginosae*, (c) *Acinetobacter Baumannii*.

Aucune zone d'inhibition notable n'a été observée pour tous les autres échantillons: C_{E3} , C_{E4} et C_{E5} . L'activité antibactérienne des films dépend de la taille des nanoparticules : on préfère les nanoparticules de grande surface spécifique. Cependant, si les particules sont agglomérées, alors la taille efficace n'est pas la taille des particules mais la taille de l'agglomérat qui peut être plus grande que la taille des particules [26].

Il faut souligner que, quelque soit l'échantillon utilisé, on n'observe aucune activité bactérienne après élimination des disques des boîtes de petriensemencé de bactéries. L'absence de croissance bactérienne, même après ré-incubation, montre que le film composite Alg-AgNPs-Cts a des effets antibactériens et bactériostatiques à la fois contre des bactéries à Gram – et Gram+.

Pour la plaque de gélose contenant la levure, on n'observe pas d'halo d'inhibition, autour des cinq matériaux préparés : l'activité antifongique de ces films contre *C. Albicans* est négative.

Conclusion

Les travaux relatés a travers ce chapitre ont permis d'élaborer cinq matériaux sous forme de films, en mélangeant les nanoparticules d'argent stabilisées par l'alginate (objet du chapitre III) avec le chitosane, par une méthode ex situ, en dispersion aqueuse (matériaux C_{E1}, C_{E2}, C_{E3}, C_{E4}, et C_{E5}).

La caractérisation physicochimique des composites formés, a permis de valider la formation de nanoparticules d'argent, et d'étudier leur dispersion dans la matrice complexe polyélectrolyte.

En effet, d'après les images MEB on peut voir la dispersion des nanoparticules dans la matrice avec la formation d'agrégats pour tous les échantillons, la taille de ces agrégats peut atteindre 1 μ .

L'analyse DRX nous a permis de valider la formation de nanoparticules d'argent par les valeurs de 2 Θ des plans cristallins caractéristiques de l'argent.

L'analyse spectroscopique FTIR a montré certains déplacements dans les valeurs de nombre d'ondes des spectres de l'alginate seul et après irradiation UV en présence de nitrate d'argent, ce qui nous a permis de suggérer que les groupes hydroxyles et carboxyles de l'alginate peuvent être impliqués dans la synthèse et la stabilisation des nanoparticules d'argent

L'étude du gonflement en milieu physiologique a permis de déduire que les films nanocomposites deviennent moins sensibles à l'hydratation avec l'augmentation du temps d'irradiation UV.

Enfin, l'évaluation des propriétés antibactériennes des nanocomposites Alg-AgNPs-Cts vis-à-vis de *P-Aeruginosae*, *Acinetobacter Bomannii*, *Citrobacter Freundii*, *Bacillus Cereus*, *S-Aureus* et *E-Coli* a été réalisée. L'effet antibactérien des nanoparticules d'argent présentes dans le polymère a été confirmé et est d'autant plus marqué pour les échantillons C_{E1} et C_{E2}.

Références bibliographiques

- [1] Balau L, Lisa G, Popa M, Tura V, Melnig V, "Physico-chemical properties of Chitosan films", *Central European Journal of Chemistry*, **2**, 638, (2004).
- [2] Cardenas G, Miranda S Patricia, "FTIR and TGA studies of chitosan composite films", *Journal of the Chilean Chemical Society*, **49**, 292-295, (2004).
- [3] Khan TA, Peh KK, Ch'ng HS, "Reporting degree of deacetylation values of chitosan: The influence of analytical methods", *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, **5**, 205-212, (2002).
- [4] Ke G, Xu W, and Yu W, "Preparation and properties of drug-loaded chitosan–sodium alginate complex membrane", *International Journal of Polymeric Materials*, **59**, 184–191, (2010).
- [5] Benbettaieb Nasreddine, "Influence de traitements de réticulation sans solvant sur les propriétés de films à base de gélatine et chitosan encapsulant ou non des antioxydants naturels : caractérisations physico-chimiques et application", Thèse de doctorat, Université Bourgogne Franche Comte, 2015.
- [6] Kindhakar P, Maity A, Sarkarand R, Mitra AK, "Nanomaterials : synthesis, characterization and applications", *Advances in Nanoscience and Nanotechnology*, 2013.
- [7] Wang, Y. Q., Liang, W. S., and Gen, C. Y. *J. Nanopart Res*, **12**, 655–661 (2010).
- [8] Darroudi M, Ahmad MB, Shameli K, Abdullah AH, Ibrahim NA, "Synthesis and characterization of UV-irradiated silver/montmorillonite nanocomposites", *Solid State Sci.*, **11**, 1621–1624, (2011).
- [9] Lanje AS, Sharma SJ, and Pode RB, "Synthesis of Silver Nanoparticles: A Safer Alternative to Conventional Antimicrobial and Antibacterial Agents", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, **2**, 478-483, (2010).
- [10] Al-Sagheer FA, Ibrahim EI, Khalil KD, "Crystallinity, antimicrobial activity and dyeing properties of chitosan-g-poly(N-acryloyl morpholine) copolymer", *European Polymer Journal*, **58**, 164-172, (2014).

- [11] Prabhu SM, Meenakshi S, “Enriched fluoride sorption using chitosan supported mixed metal oxides beads: synthesis, characterization and mechanism”. *Journal of water process engineering*, **2**, 96–104, (2014).
- [12] Belalia R, “Synthese d’une biocide par modification chimique de chitosane : Presentation du bois préservation des aliments“, Thèse de Doctorat, Université bordeaux I. France, (2006).
- [13] Serrero A, Trombotto S, Cassagnau P, Bayon Y, Gravagna P, Montanari S, David L “Polysaccharide gels based on chitosan and modified starch : structural characterization and linear viscoelastic behavior“, *Biomacromolecules*, **11(6)**, 1534-1543, (2010).
- [14] Liu L, Cao J, Huang J, Cai Y, Yao J, “Extraction of pectins with different degrees of esterification from mulberry branch bark”, *Bioresource Technology*, **101(9)**, 3268–3273, (2010).
- [15] Silverstein RM, Basler GC, Morill TC, “ Identification spectrométrique de composés organiques“, 142- 158, Edition Wiley 1991.
- [16] Yuvarani I, Kumar S, Senthil Venkatesan, Jayachandran K, Se-Kwon Sudha, “Preparation and Characterization of Curcumin Coated Chitosan-Alginate Blend for Wound Dressing Application”, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, **2**, 54–60, (2012).
- [17] Shilpa Sharma, Pallab Sanpui, Arun chattopadhyay and Sankar Ghosh,” Fabrication of antibacterial silver nanoparticle-sodium alginate-chitosan composite films”, *RSC Advances*, **2**, 5837-5843, (2012).
- [18] Vimala K, Samba Sivudu K, Murali Mohan Y, Sreedhar B, Mohana Raju K, “ Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates a rational methodology for antibacterial application”, *Carbohydr. Polym*, **75**, 47–463, (2009).
- [19] Chen X, Schluesener HJ, “Nanosilver: a nanoprodukt in medical application”, *Toxicol Lett.* **176(1)**,1–12, (2008).
- [20] Eckhardt S, Brunetto PS, Gagnon J, Priebe M, Giese B, Fromm KM, “Nanobio silver : its interactions with peptides and bacteria, and its uses in medicine” *Chem Rev.*, **113(7)**, 4708–4754, (2013).

[21] Juan L, Zhimin Z, Anchun M, Lei L, Jingchao Z, “Deposition of silver nanoparticles on titanium surface for antibacterial effect”, *Int J Nanomedicine* , **5**, 261–267, (2010).

[22] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, et al. “The bactericidal effect of silver nanoparticles“, *Nanotechnology*, **16(10)**, 2346–2353, (2010).

[23] Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T, “Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate”, *Appl Environ Microbiol*, **69(7)**,4278–4281, (2003).

[24] Holt KB, Bard AJ, “Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of Escherichia coli: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag”, *Biochemistry*, **44(39)**, 13214–13223, (2005).

[25] Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO, “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus”, *J Biomed Mater Res*,**52(4)**, 662–668, (2000).

[26] Depan D, Misra RDK, ”On the determining role of network structure titania silicone against bacterial colonization: Mecanism and disruption of biofilm”, *Materials Science and Engineering C*, **34**, 221- 228, (2014).

Conclusion générale

Conclusion générale

Dans ce travail de thèse, nous avons élaboré et caractérisé des films composites alginate-nanoparticules d'argent-chitosane, à partir de nanoparticules d'argent, synthétisées en solution aqueuse et stabilisées par l'alginate, tout en mettant en œuvre des procédés simples et respectueux de l'environnement.

Cette étude nous a permis de valider la synthèse de nanoparticules d'argent dans l'alginate par irradiation UV, à température ambiante.

Nous avons pu montrer que la morphologie et la structure des nanoparticules d'argent sont dépendantes du temps d'irradiation UV : les suspensions préparées présentent des dispersions hétérogènes de nanoparticules.

Du point de vue populations de nanoparticules, la distribution par intensité dans les graphiques de diffusion dynamique de lumière confirme la formation de nanoparticules d'argent ayant les diamètres hydrodynamiques suivants :

- Pour la solution irradiée pendant 1h : La première population présente un diamètre hydrodynamique moyen de 15.95 nm alors que la seconde présente un diamètre moyen de 78.43 nm et la troisième 418.9 nm.
- Pour la solution irradiée pendant 3h : La première population présente un diamètre hydrodynamique moyen de 57.05 nm alors que la seconde présente un diamètre moyen de 556.4 nm.
- Concernant la solution irradiée pendant 24h : La première population présente un diamètre moyen de 22.46 nm alors que la seconde présente un diamètre moyen de 101.8 nm et la troisième 501.4 nm.
- Les solutions irradiées pendant 48, et 96 heures présentent chacune deux populations de diamètres très larges allant jusqu'à 4710 nm.

Si l'on considère les graphiques de distribution par nombre des nanoparticules synthétisées, Les diamètres hydrodynamiques des nanoparticules les plus importantes en nombre se présentent comme suit :

- 10 à 11nm de diamètre dans l'échantillon E₁
- 57.05 nm de diamètre dans l'échantillon E₂.
- 2 nm, 7nm et 7nm pour les échantillons E₃, E₄ et E₅ respectivement.

On peut conclure donc que le temps d'irradiation est déterminant sur la taille des nanoparticules d'argent dans cette voie de synthèse.

La redispersion de ces nanoparticules d'argent dans une matrice chitosane est efficace. On a pu élaborer des films nanocomposites alginate/nanoparticules d'argent/chitosane par simple agitation mécanique. Les nanoparticules d'argent synthétisées sont cristallines et influent sur les propriétés structurales des polysaccharides utilisées pour l'élaboration de la matrice nanocomposite. De cette particularité de structure, dépendent ensuite fortement les propriétés de gonflement des films nanocomposites à base d'argent.

En effet, lors de l'étude des propriétés de gonflement des films nanocomposites à base d'argent, seuls les films nanocomposites élaborés à partir de nanoparticules préparées à faible temps d'irradiation présentent un degré de gonflement important. Ce qui permettra aux nanoparticules de diffuser facilement des ions argent en cas d'imprégnation à travers le film.

L'évaluation des propriétés physicochimiques et biocides des matériaux obtenus par ce procédé a permis d'en déduire les faits suivants :

- L'incorporation de la dispersion aqueuse de nanoparticules d'argent stabilisées par l'alginate se fait parfaitement pour les AgNPs préparés à 1h et 3h. En effet, la présence des fonctions amines du chitosane permet leur incorporation chimique dans les chaînes d'alginate lors de la réaction de polycomplexation.

En revanche, l'introduction de la dispersion de nanoparticules d'argent préparées par irradiation à 24, 48 et 96 heures, se traduit par la formation d'agrégats de taille micrométrique.

Par ailleurs, les propriétés des matériaux obtenus révèlent :

- Une dispersion homogène des AgNPs dans le film C_{E3} et la présence du phénomène d'agrégation.
- Un faible gonflement dans l'eau.
- Un effet bactéricide pour les deux types de bactéries Gram⁺ et Gram⁻.

Ces résultats nous permettent de faire ressortir les paramètres les plus intéressants pour la synthèse de nanoparticules d'argent stabilisées par l'alginate pour l'élaboration de nanocomposites Alg-AgNPs-Cts ayant un effet bactéricide marquant, donc on peut limiter l'étude de l'irradiation entre quelques minutes et 3h.

Donc, l'irradiation par rayonnements UV, est une méthode physique de réduction *efficace* pour la préparation de nanoparticules d'argent, considérée comme propre n'utilisant pas de solvant. Elle s'est avérée être une alternative efficace pour créer de nouvelles liaisons intramoléculaires entre les chaînes du biopolymère et les ions argent. Ces traitements ionisants n'engendrent pas de résidus toxiques dans le film nanocomposite fini.

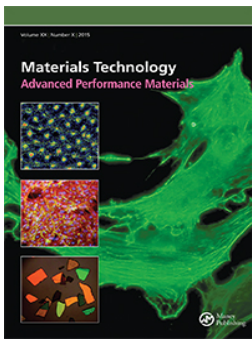
L'originalité de cette étude s'articule sur la synthèse de nanoparticules d'argent par voie verte en solution aqueuse et leur utilisation pour l'élaboration de films bionanocomposite à effet combiné bactéricide bactériostatique visant une application en biotechnologie comme film antibactérien biocompatible et biodégradable.

Si l'on considère le volet matériaux, plusieurs points restent à éclaircir et/ou à compléter. Il conviendrait par exemple de caractériser l'alginate, ainsi que de compléter la caractérisation des matériaux synthétisés afin d'avoir une vision plus complète de leurs propriétés mécaniques, épaisseur, couleur,...etc

Il sera également nécessaire d'ajuster les paramètres de la réaction d'irradiation UV, et notamment sa durée pour obtenir le meilleur compromis entre l'obtention de produits d'intérêt et la non dégradation photochimique de l'alginate. Enfin, presque tout reste à faire sur le volet analytique de ces produits. Le premier point sera de séparer les produits agrégés dans l'alginate afin que les techniques analytiques dédiées aux nanoparticules soient pertinentes.

Pour résumer, ce travail de thèse a été difficile tant du point de vue expérimental, qu'analytique et également en termes d'interprétation des résultats obtenus.

Mais il fut également très fructueux puisqu'il nous a permis d'ouvrir de nouveaux domaines d'étude au laboratoire tels que la synthèse de matériaux nanométriques par une voie originale, ainsi que l'exploration de nouvelles voies de valorisation de biopolymères.



Synthesis and characterization of antibacterial silver-alginate - chitosan bionanocomposite films using UV irradiation method

N. Bousalem, K. Benmansour & H. Ziani Cherif

To cite this article: N. Bousalem, K. Benmansour & H. Ziani Cherif (2016): Synthesis and characterization of antibacterial silver-alginate - chitosan bionanocomposite films using UV irradiation method, Materials Technology, DOI: [10.1080/10667857.2016.1241856](https://doi.org/10.1080/10667857.2016.1241856)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/10667857.2016.1241856>



Published online: 19 Oct 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Synthesis and characterization of antibacterial silver-alginate - chitosan bionanocomposite films using UV irradiation method

N. Bousalem, K. Benmansour and H. Ziani Cherif

Macromolecules Research Laboratory, Department of Chemistry, Tlemcen University, Tlemcen, Algeria

ABSTRACT

A simple UV-based method for the preparation of alginate-silver nanoparticles-chitosan composite films is described herein. Alginate, a polysaccharide was simultaneously used as a natural stabiliser and reducing agent of silver ions (Ag^+) delivered from silver nitrate solution. The properties of silver nanoparticles (Ag NPs) in alginate and alginate-Ag NPs-chitosan (Alg-Ag NPs-CTS) composite films were investigated in terms of their surface plasmon resonance, crystalline structure and morphology. The average diameter size, the degree of swelling and functional groups distribution were also addressed. Antibacterial activities were carried out against both Gram+ and Gram- bacteria cells; the synthesised nanocomposite films displayed an interesting antibacterial activity. The perspectives for a potential use of these nanocomposite films in areas such as biomedical engineering may seriously be considered.

ARTICLE HISTORY

Received 26 June 2016
Accepted 22 September 2016

KEYWORDS

Alginate; silver nanoparticles; green synthesis; chitosan

Introduction

Standing now at the highest point of human accomplishment in science and technology, this century promises to be more revealing and rewarding. Basic research in science has provided the foundation of this technological revolution. Undoubtedly, major breakthroughs have been accomplished in medicine, chemistry, physics, computer sciences and other 'classical' branches of Science, which ultimately led the visionaries and the front runners among the scientific community to explore new horizons on an interdisciplinary basis with an enthusiastic spirit and daring approach. Materials science, a more recent and rapidly growing area which evolved just a few decades ago at the borderline of other disciplines, offers a fertile ground for a seemingly limitless number of inventions, applications and perspectives as evidenced by the explosive number of published scientific papers.

Right from its beginning, nanotechnology emerged as one of the most prominent and active areas of research in materials science in view of its potential use and applications. For example, the physical and chemical properties of metallic nanoparticles differ from those of bulk metals (e.g. lower melting points, higher specific surface areas, specific optical properties, mechanical strengths, and specific magnetisations). This difference in properties is useful in various industrial applications. The exploration of the potential offered by the use of nanoparticles in biomedical applications including their antimicrobial

activity and drug delivery ability represents a matter of intense investigations.

In recent years, a number of studies have been carried out to study the antimicrobial activities of magnesium, copper, zinc and rare earth inorganic elements in stainless steels and titanium alloys.[1-18]

A considerable attention was given to the synthesis of silver nanoparticles owing to their tiny particle size and potential for use as novel materials. Their applications extended to various fields of science encompassing catalysis and chemical sensing and more particularly as antibacterial agents.[19-29]

Several methods have been devised for the synthesis of Ag NPs. These generally include chemical reducing agents like sodium borohydride,[30] hydrazine [31] and DMF,[32] in conjunction with stabilisers such as polyaniline or polyvinylpyrrolidone.[33,34] However, most of these stabilising agents are carbogenic compounds that lack the biocompatibility requirements or are relevantly toxic.[35]

An insightful alternative which broadened further the perspectives of applications on NP's and met at the same time the biocompatibility requirements, was the introduction of biopolymers as stabilisers,[36,37] and as such paved the way for a promising outcome to biomedical sciences.[38-42] Polyelectrolytes are known to stabilise NP's due to their electrostatic interactions.[43] Alginate, a prominent member of the class of polyelectrolytes, is a block copolymer of (1,4)-linked β -D-mannuronic (M)

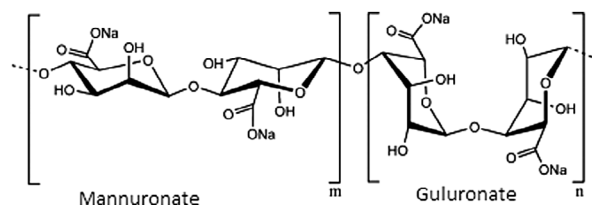


Figure 1. The molecular structure of sodium alginate.

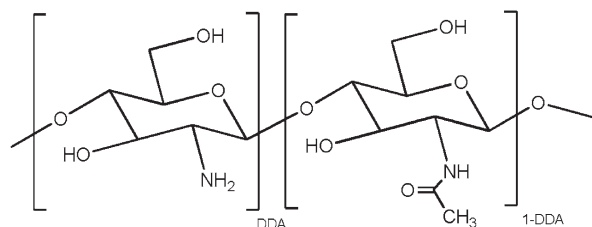


Figure 2. The molecular structure of chitosan.

and α -L-gluconic (G) acid units Figure 1, which shows an excellent biocompatibility profile. The carboxylic acid residues present along the alginate main chain provide negatively charged sites which are able to interact electrostatically with positively charged particles to form gels.[44–46]

An abundant literature on alginate-based applications is available, especially with chitosan (CTS) whose combination with alginate forms an interesting ionic complex. Chitosan, another naturally occurring polysaccharide, obtained by partial deacetylation of chitin, has a repeating (1,4)-linked β -D-glucosamine and N-acetylglucosamine structure Figure 2. It is a cationic polymer, which has been widely used in food, cosmetic, biomedical and pharmaceutical areas.[47,48]

The association of alginate and chitosan to form membranes or films as support for drugs has been the subject of intensive research.[49,50]

In a contribution to this field, we have prepared silver nanoparticles by a green method. Sodium alginate was used as stabiliser and reducing agent under UV irradiation in aqueous medium. The formed silver nanoparticles were analysed by means of UV–Vis spectroscopy and their size was determined by zetametric measurements. Chitosan addition to suspensions of alginate-stabilised Ag NPs allowed us to prepare films which were analysed by FTIR spectroscopy and XRD. Their antibacterial effect was investigated against Gram (+) and Gram (–) bacteria cells. The preparation and characterisation of Alg–Ag NPs and Ag NPs–CTS complexes, as well as antibacterial activity of the films are described.

Materials and methods

Materials

In this work, all reagents were used as received without further purification. AgNO_3 (99.98%) used as silver precursor and chitosan (medium molecular weight) were

purchased from Sigma-Aldrich. Alginic acid sodium salt 800G was obtained from CEVA. All other chemicals used in this study were of analytical grade.

Preparation of Alg–Ag NPs

Alg–Ag NPs were synthesised by adding 2 mL of freshly prepared AgNO_3 aqueous solution (10^{-2} M) to 50 mL of (0.2%) alginate solution. The mixture was irradiated under vigorous stirring using a UV reactor (30 W), with a UV lamp at $\lambda = 365$ nm. Irradiation times of 1 h (E_1), 3 h (E_2), 24 h (E_3), 48 h (E_4) and 96 h (E_5) were applied respectively. The appearance of a light brown colour after 1 hr showed the formation of Ag NPs.

Characterisation of Alg–Ag NPs. UV–Vis spectroscopic measurements were used for the characterisation of alginate–Ag NPs, using a spectrophotometer (Lambda 25 Perkin Elmer). The histograms for particle size distribution were obtained using Malvern Zetasizer Nano Zs.

Preparation of Alg–Ag NPs–CTS films

The films were prepared by adding 25 mL of chitosan solution (0.2% w/v) in a 1:1 v/v mixture of (2%) acetic acid and acetone (pH 5) to 25 mL of alginate–Ag NPs under vigorous stirring for 30 min at room temperature according to a procedure previously described in the literature.[51] The resulting suspensions were cast in Petri dishes and dried for 24 h at 40°C .

Characterisation of films. The surface morphology of the films was examined using light microscopy. The images were acquired with an Olympus SC30 Camera, and the Fourier transform infrared spectra of the films were recorded over the range $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ with Agilent Cary 640 FTIR spectrophotometer.

Moreover SEM observations were carried out using the Hitachi FEG S-4800 electron microscopy.

X-ray powder diffraction (XRD) patterns were recorded on a Philips X-ray diffractometer (PW 1710) with Cu K α radiation ($\lambda = 1.5406\text{ \AA}$).

The swelling degree (SD) of the films was determined as follows: the initial mass (m_0) of a piece of the dried film was measured and then the sample was immersed in 50 mL of stirred phosphate-buffered solution (PBS) at 25°C at different periods of time. The wet sample was carefully blotted between filter paper to remove the excess water from the surface and reweighed.[52] The SD was calculated in terms of the amount of absorbed water relative to the initial mass. $\text{SD} = (m_w - m_0)/m_0$, m_w is the mass of the swollen film.

Antibacterial activity of films

The antibacterial activity of the films was evaluated using the Mueller–Hinton agar disc diffusion method with determination of inhibition zones in mm. It was tested on *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus*

aureus (ATCC 25923), *Acinitobacter baumannii* (ATCC 19606), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Bacillus cereus* (ATCC10876) and *Pseudomonas aeruginosae* (ATCC 27853).

A bacterial suspension of the test control micro-organisms was prepared in a tube containing 5 mL sterile PBS. The turbidity of the culture was standardised with the aid of UV-Vis spectrophotometer until an absorbance equivalent to a turbidity of 0.5 McFarland was reached. These suspensions contain approximately 10^6 CFU mL⁻¹. The bacterial suspension was cultured on the plates filled with Mueller-Hinton agar (prepared from a commercially available dehydrated base), sterilised and cooled until 45–50°C. The freshly prepared and cooled medium was poured into sterilised Petri dishes (90 mm diameter) on a horizontal surface to give a uniform thickness of approximately 4 mm. The agar plates were allowed to cool further to room temperature. The sterile cotton swab was dipped into the bacterial suspension and the dried surface of the Mueller-Hinton agar plate was inoculated by streaking this swab over the sterile agar surface. This procedure was repeated twice while rotating the plate by approximately 60° each time to ensure a regular distribution of inoculum. As a final step, the rim of the agar was swabbed off.

Discs of 6 mm diameter of each prepared film were placed on the surface of the inoculated agar plate within the 15 min after the inoculation with the control micro-organism. Each disc was pressed down to ensure complete contact with the agar surface. The discs were placed individually and then put in thermostat at 37°C for 24 h. Then, the zone of complete inhibition was measured to the nearest whole millimetre on the back of the inverted Petri plate using sliding calipers. The assays were performed in triplicate.

Results and discussion

Synthesis and characterisation of Alg-Ag NPs

UV-Vis analysis

Ag Nps were prepared with a green method by simple irradiation of an aqueous mixture of sodium alginate and AgNO₃ with UV light ($\lambda = 364$ nm) for several times. Alginate which acts as a multipurpose agent (biocompatible, biodegradable and nontoxic-effective stabilising component) was utilised to inhibit the aggregation of the Ag NPs in solution.

After 1 h of reaction, the colour of the mixture changed gradually from colourless (E₀) to light brown (E₁), and then to dark brown (E₂) and finally to green (E₃), (E₄), (E₅) on increasing time of irradiation, indicating the formation of Ag nanoparticles (Figure 3).

The complex set of reactions depicting the cascade complexation of Ag with alginate and leading to Alg-Ag NPs was reported by Marignier et al. [53] A schematic representation of the reaction cascade is illustrated as follows:

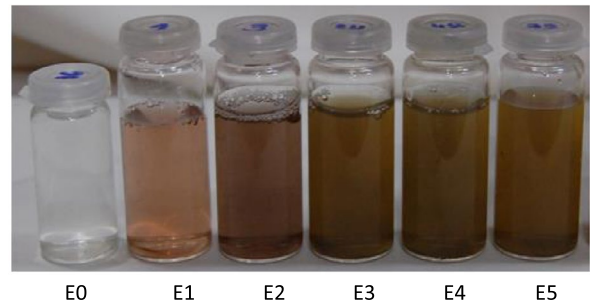
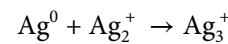
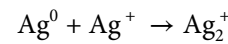
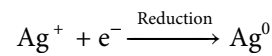
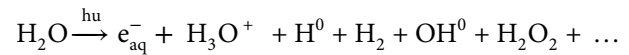


Figure 3. Photograph of the synthesised Ag NPs in alginate solution at different UV-irradiating times.



The progress of nanoparticles formation was also monitored by measuring the surface plasmon resonance (SPR) bands of the synthesised suspensions at wavelength range 300–700 nm Figure 4. It shows the appearance of strong absorption band around 410–426 nm, indicating the formation of spherical Ag NPs.[54]

Figure 4(a) shows the progress of Ag NPs formation monitored by UV-Vis spectroscopy. A time-dependent relationship of Ag NPs concentration is observed, as the absorption intensity steadily increases while time elapses.

Interestingly, as the reaction progressed, a red shift of the plasmon resonance bands occurred from 419 nm (E₁, E₂, E₃ and E₅) to 426 nm (E₄), indicating that Ag NPs grew larger.

The broadness of the absorption peaks is intuitively suggesting that the sample should be a mixture of silver nanoparticles with different morphology,[55] a fact that shall be discussed in size analysis in the following section.

A necessary step and prerequisite for further elaboration of the composite material was the assessment of Ag NPs stability. Samples of Alg-Ag NPs in suspension were stored in the dark for three months at room temperature and then checked by UV-Vis spectroscopy. Figure 4(b) shows the UV-Vis profile of the samples. A slight shift from 419 to 421 nm was observed without significant change in the absorption shape or intensity, indicating that Ag NPs were fairly stable over this period. Thus, it may be safely concluded that sodium alginate stabilises actively the Ag NPs.

There was no noticeable increase in the surface plasmon band intensity of Ag NPs after 48 h irradiation, a fact strongly suggesting that AgNO₃ reduction was virtually complete within 48 h (Figure 5).

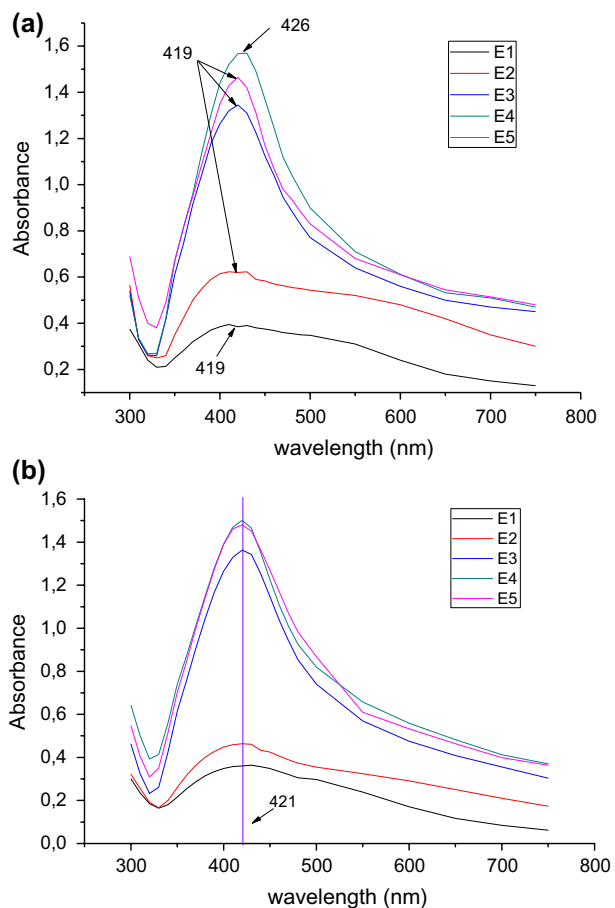


Figure 4. (a) The UV-Vis absorption spectra of Ag NPs synthesised for different reaction times and (b) The changes in UV-Vis absorption spectra of Ag NPs after 03 months.

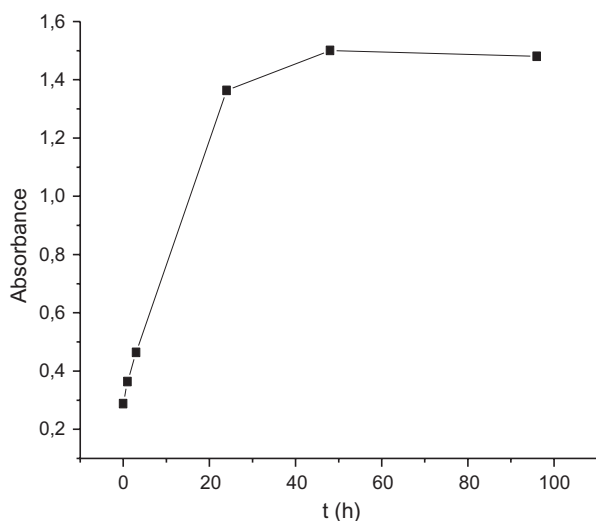


Figure 5. Maximum of plasmon band intensity of Ag NPs as a function of irradiation time.

Synthesis and characterisation of Alg-Ag NPs-CTS films

Morphology

The films prepared from chitosan, alginate-chitosan and Alg-Ag NPs-CTS were analysed under light microscopy as depicted in Figure 6(a-c), respectively. In Figure 6(a),

a photograph of chitosan film reveals a very smooth and homogeneous surface. Indeed, the molecular structure and the nature of interactions between chitosan fragments are the main reasons of a strong cohesion and the close-packing pattern of chitosan, which is revealed by a surface smoothness and homogeneity at light microscopy resolution level.[56]

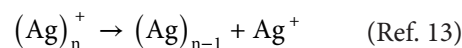
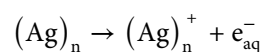
Obviously, much more complex interactions are involved when chitosan and alginate polyelectrolytes are mixed together, since they are essentially electrostatic in nature, thus resulting in a different surface morphology and topography.

Figure 6(b) depicts the film photograph of chitosan-alginate complex which appears with a surface roughness much closer to that of polyelectrolytes aggregation, as for example, in montmorillonite-chitosan mixture.

Alg-Ag NPs-CTS films appeared also with a high roughness and fibrillate structures. The microstructure observed in the Alg-Ag NPs-CTS films, Figure 6(c) (E_1 - E_6), resembles to that of alginate-chitosan, and has been explained by the electrostatic interactions formed between alginate and chitosan molecules.[57]

The particle size distributions of the Alg-Ag NPs prepared at different reaction times are shown in Figure 7. The images reveal that the mean diameters were about (15.95, 78.43 nm) for E_1 , 57.05 nm for E_2 , (22.46, 101.8 nm) for E_3 , 12.17 nm for E_4 , 40.53 nm for E_5 and 32.81 nm for E_6 .

Large Ag NPs were obtained upon short UV light irradiation time. A size redistribution or disintegration occurred on prolonged UV light exposure. This phenomenon seems in accordance with a fragmentation mechanism of Ag NPs reported in the literature,[56,57] and may be summarised as in the cascade reaction shown below.



Interestingly, it seems that size control of Ag NPs may be obtained upon a definite irradiation period. A redistribution of Ag NPs within alginate framework occurs until a possible equilibrium is reached where the internal energy of the complex is minimised. Additional exposure of the composite to UV light causes a photolytic cleavage of alginate, leading therefore to an aggregation of Ag NPs, Figure 6(c) (E_4 and E_5).

Figure 8 depicts the SEM image of a 1:1 blended film, and reveals that Ag NPs are uniformly dispersed in the form of small particles throughout the film.

Powder X-ray diffraction

Valuable information can be obtained from XRD technique in solid state chemistry and materials science.

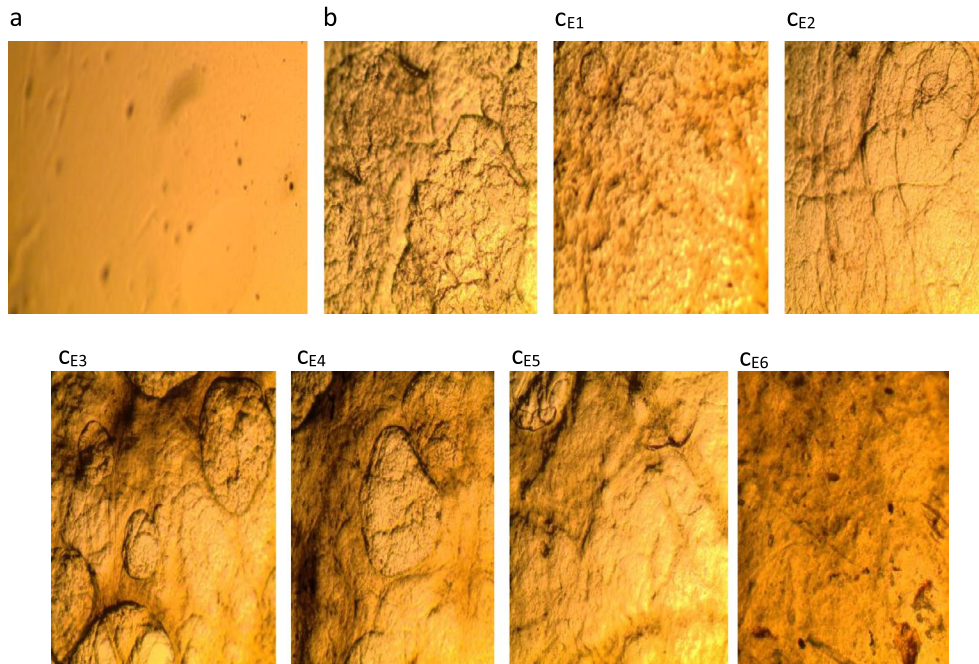


Figure 6. Morphology of (a) chitosan, (b) chitosan–alginate and (c) alginate–Ag Nps-chitosan PEC films as observed under a light microscope.

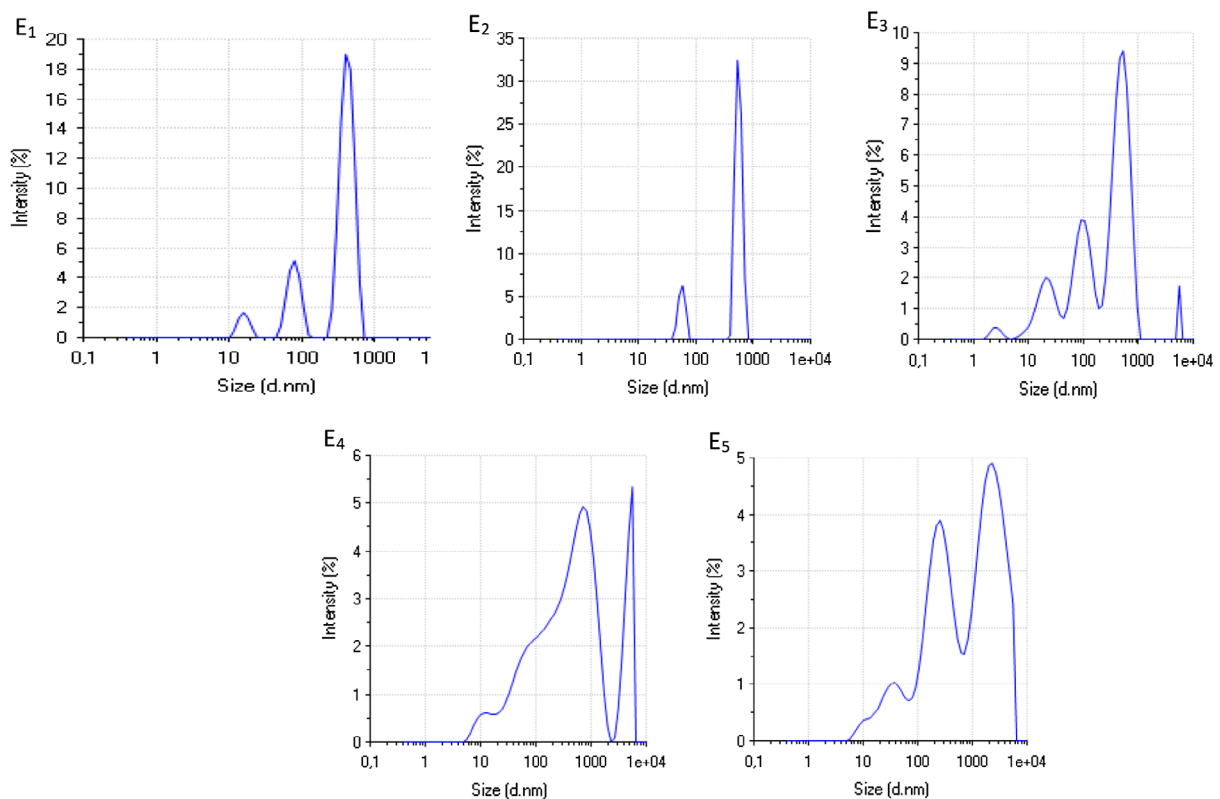


Figure 7. Size distribution of the fabricated Ag NPs in alginate solution at different irradiation times: (E_1) 1 hr; (E_2) 3 hr; (E_3) 24 hr; (E_4) 48 hr; (E_5) 96 hr.

X-ray diffraction of pure chitosan and Alg–Ag NPs-CTS composite films were performed as shown in Figure 4. Data were taken for 2θ angles ranging from 5 to 80 degrees with a 0.02° increment. Significant 2θ peaks were assigned and their data analysed. Figure 9(a) is relative to chitosan film and shows two peaks at 2θ angle of 9.8°

and 19.5° , corresponding to hydrated and anhydrous chitosan crystals, respectively. Figure 9(b) presents the XRD pattern of Alg–Ag NPs-CTS film obtained after 48 h UV-irradiation time. The peaks corresponding to the crystalline region of chitosan have almost disappeared, revealing an amorphous morphology

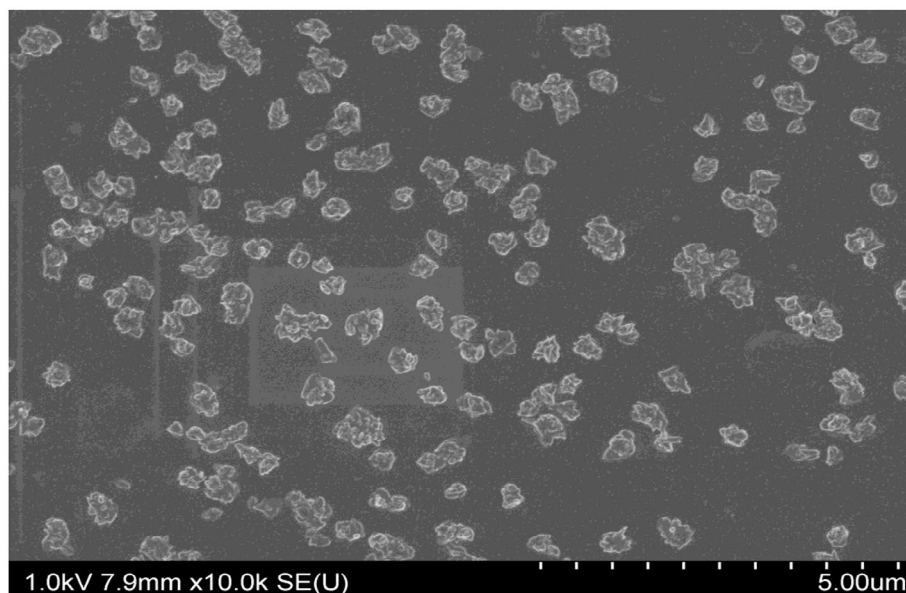


Figure 8. SEM image of 1:1 blended film (E_3) showing Ag NPs.

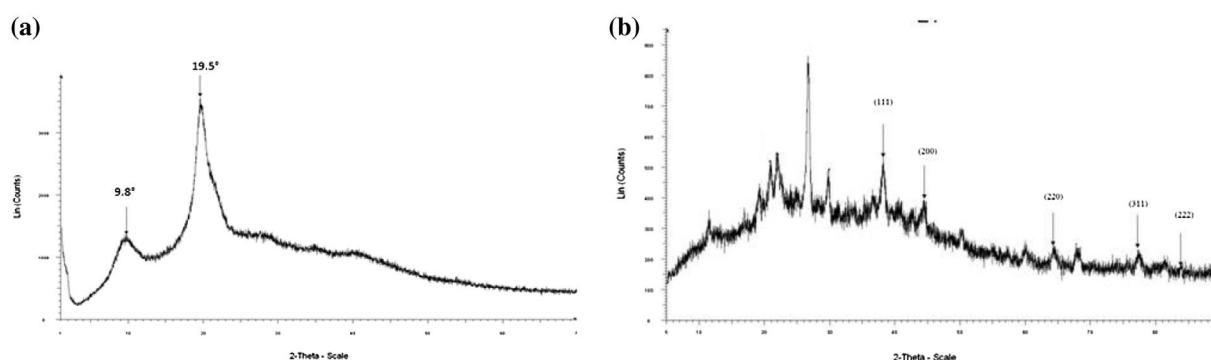


Figure 9. (a) XRD patterns of chitosan (b), and Alg–Ag NPs–CTS composite film after 48 h UV-irradiation.

of alginate–chitosan complex. Five 2θ angle peaks at 38.28° , 44.60° , 64.21° , 77.28° and 83.98° are observed and correspond to (1 1 1), (2 0 0), (2 2 0), (3 1 1) and (2 2 2) plans of silver, respectively, by comparison with the standard powder diffraction chart of JCPDS, silver file N°-04-0783.

A strong peak commonly related to (1 1 1) reflection in cubic materials, is observed in Figure 9(b), which confirms that Alg–Ag NPs–CTS particles are (FCC) silver nanoparticles.[58]

Chemical analysis by Fourier Transform Infra Red (FTIR) spectroscopy

Alginate–chitosan blend and Alg–Ag NPs–CTS composite materials were probed by FTIR spectroscopy. For a comparison purpose, Figure 10 shows the recorded FTIR spectra, at room temperature, of the individual alginate and chitosan polymers, taken separately, and the alginate–chitosan polyelectrolyte complex.

With respect to alginate, the characteristic absorption bands at 1597 and 1409 cm^{-1} represent the asymmetric and symmetric stretching vibrations of carboxylate anions, respectively.[59]

The broad band at 3318 cm^{-1} is attributed to OH stretching of hydroxyl groups which are present in the alginic acid backbone of sodium alginate, and to hydrogen bonding ($\text{O}\dots\text{H}^+\dots\text{O}$), while the band at 2928 cm^{-1} is assigned to CH_2 stretching.

In Chitosan, the absorption bands centred at 1640 , 1556 and 1402 cm^{-1} are related to the amide I, amide II and amide III groups, respectively.

The FTIR spectrum of the blend (Chitosan/Alginate: 1/1) film revealed a clear difference when compared with that of pure chitosan and sodium alginate film. The amide I absorption merged with characteristic absorption band of amide II and showed a wide absorption at 1558 cm^{-1} . Upon mixing, alginate interaction with chitosan– NH_2 groups mainly through hydrogen bonding, the absorption band at 1597 cm^{-1} shifted to 1558 cm^{-1} (carboxylate anions stretching), and the 1409 cm^{-1} band shifted to 1403 cm^{-1} (NH bending), while the 1020 cm^{-1} band appeared at 1016 cm^{-1} (CH deformation). On the other hand, chitosan, alginate and their blend display each a characteristic absorption bands in the 3300 – 3400 cm^{-1} region. The broad band of the blend at 3306 cm^{-1} reveals the presence of OH

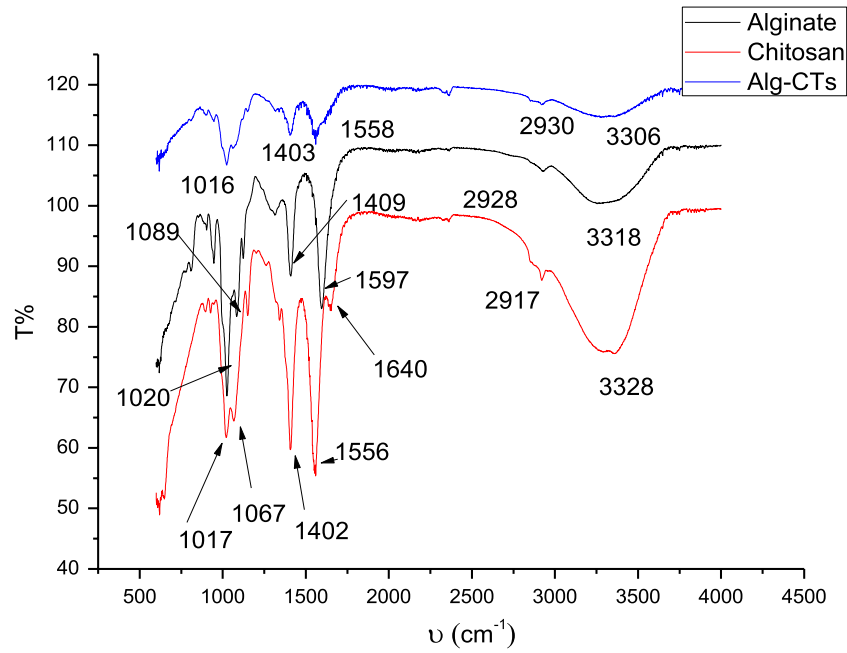


Figure 10. FTIR spectra of alginate, chitosan and alginate–chitosan PEC films.

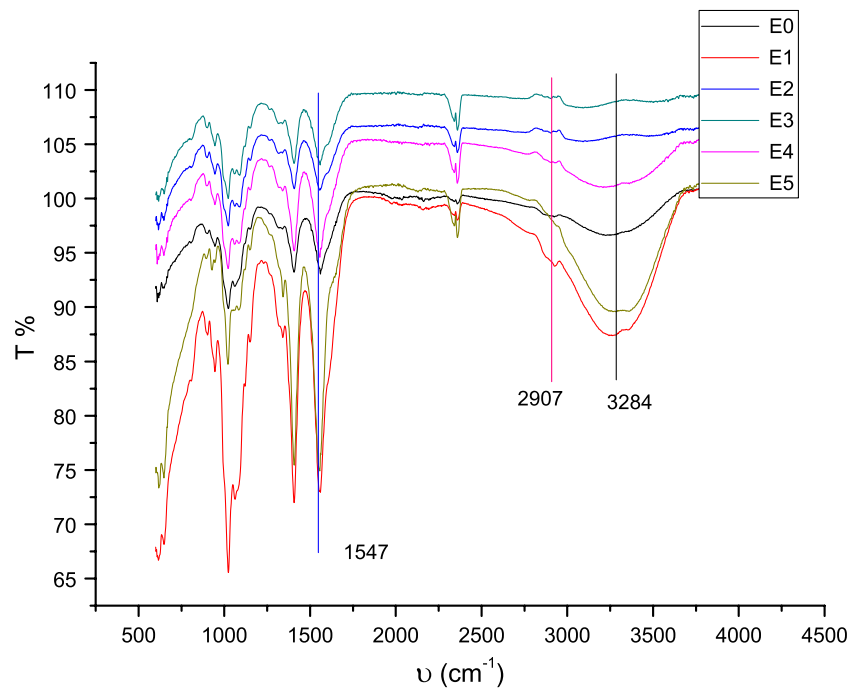


Figure 11. FTIR spectra of E_0 (alginate–chitosan polyelectrolyte complex film without Ag NPs), E_1 (1 hr), E_2 (3 hr), E_3 (24 hr), E_4 (48 hr) and E_5 (96 hr) (Alg–Ag NPs–Chs films).

stretching, a polymeric association and also an intermolecular hydrogen bonding in the alginate–chitosan (1:1) binary blend.[60]

An interesting change in the structural modification of the composite material upon different UV irradiation time exposure is observed.

A plot of FTIR spectra of pure alginate–chitosan (E_0) and silver nanoparticles–alginate–chitosan films irradiated at different periods (E_1 , E_2 , E_3 , E_4 and E_5) is shown

in Figure 11. The stretching vibrations of OH groups at 3306 cm^{-1} in pure alginate–chitosan film have shifted to 3284 cm^{-1} . CH stretching absorption at 2930 cm^{-1} shifted to 2907 cm^{-1} , and absorptions at 1558 cm^{-1} shifted to 1547 cm^{-1} . On the basis of these structural variations, the formation of a chemical bonding between silver and oxygen atoms of alginate has been suggested. Consequently, both hydroxyl and carboxyl groups of alginate may be involved in the synthesis and stabilisation of Ag NPs.[51]

Swelling degree

The swelling behaviour of an antibacterial film represents a fundamental criterion for its intended biomedical application. Water transport through films not only depends on the macromolecule intrinsic rigidity but on the cross-linking degree of the polymeric matrix, as well. No visual change was observed when the prepared films were immersed in water. The SD of the films versus UV-irradiation time is illustrated in Figure 12. Regardless of the equilibrium SD, equilibrium was reached within 5 to 10 min. Water uptake increased when decreasing the UV irradiation time of the alginate–AgNO₃ solution and inversely. This behaviour may be explained by the availability of hydrophilic groups in alginate (–OH and –COOH). Upon UV-irradiation, more Ag particles are inserted and bound to OH or COOH groups, thus lowering the number of available hydrophilic sites, and as a result, the film becomes less prone to hydration. Indeed, alginate–chitosan composite film (E₀) showed a higher SD than any of the nanocomposite films (E₁, E₂, E₃, E₄ and E₅). This lowering in the SD can be attributed to a binding of AgNPs with ‘O’ and ‘N’ atoms of hydroxyl and amine groups present in alginate and chitosan chains thereby producing additional crosslinks within the chain networks.[61]

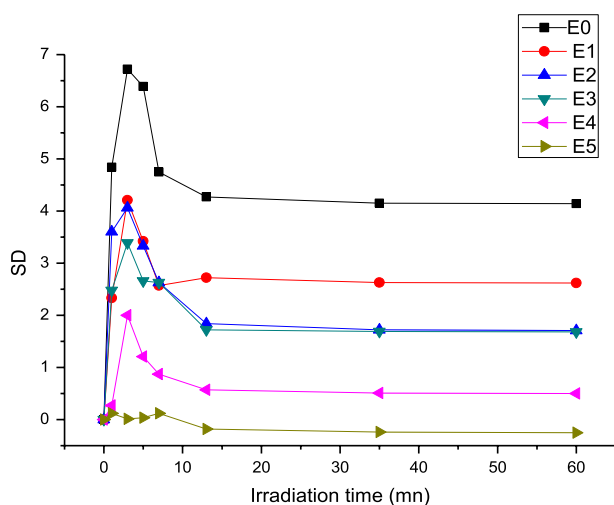


Figure 12. Swelling degree of the Alg–Ag NPs-CTS films in phosphate-buffered solution pH 7.4 at 23°C.

Antibacterial activity of the films

The antibacterial activity of the alg–Ag NPs-CTS films was evaluated towards: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosae*, *C. freundii*, *B. cereus*, and *A. baumannii*, by the inhibition zone method. Images of the inhibition zones of the films prepared at 1hr of irradiation time (E₁) are presented in Figure 13.

A thin exclusion area surrounding the discs is observed for *E. coli*, *S. aureus*, *c. freundii* and *B. cereus*, while a larger exclusion zone appears for *P. aeruginosae* and *A. baumannii*.

Comparison of the inhibition zone as it appears from Figure 13, allows us to provide a trend of decreasing efficiency of the silver composites in the following order:

P. aeruginosae (9.0 mm) > *A. bomannii* (8.7 mm) >>
C. freundii (8.5 mm)

>*B. cereus* (8.0 mm) > *S. aureus* (7.7 mm) > *E. coli*
(7.6 mm)

P. aeruginosae appears to be significantly more sensitive to Ag NPs than other bacteria strains.

It may be suggested from a careful observation of the exclusion zone that Ag NPs were released out of the discs and adsorbed onto biological molecules inside the bacteria cells. This behaviour seems to be in good agreement with the generally accepted mechanism of silver antimicrobial activity which involves an interaction of silver ions with negatively charged species present within the cytoplasm membrane. This interaction is believed to cause a shrinking of the cell membrane or its separation from the cell wall.[27,28,62]

When the sample was UV-irradiated for three hours (E₂), an inhibition zone appeared only for *C. freundii*, *P. aeruginosae* and *A. baumannii*, as illustrated in Figure 14.

No noticeable inhibition zone was observed in the case of all the other samples: E₃, E₄ and E₅; it appears that the antimicrobial activity is in direct relationship with silver-specific area. Indeed, the antimicrobial activity is favoured when a large specific area primarily imparted by the tiny-sized silver nanoparticles is obtained. Inversely, the silver specific area decreases dramatically when Ag

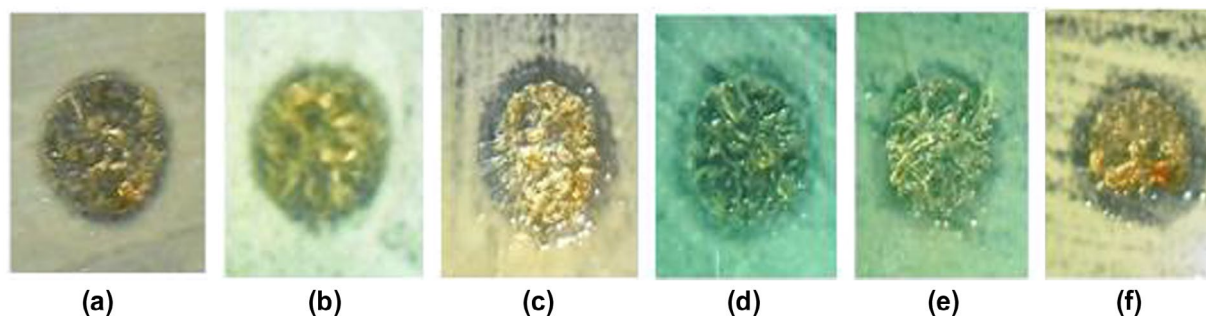


Figure 13. Comparison of the inhibition zone test of E₁ film between: (a) *E. coli*, (b) *S. aureus*, (c) *P. aeruginosae*, (d) *Citrobacter freundii*, (e) *Bacillus cereus* and (f) *Acinetobacter baumannii*.

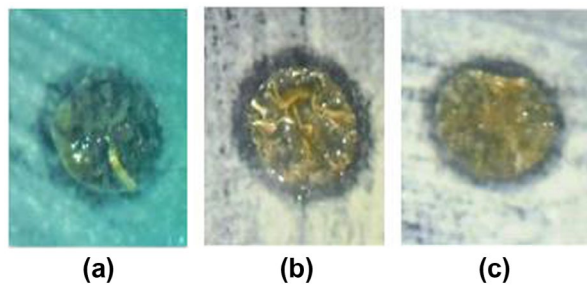


Figure 14. Comparison of the inhibition zone test of E₂ film between: (a) *Citrobacter freundii*, (b) *P. aeruginosae*, (c) *Acinitobacter baumannii*.

nanoparticles form aggregates, the effective size of which is larger than the particle size.[29]

It should be pointed out that, regardless of the sample used, any bacterial activity was observed after removing the discs from the agar plates of *E. coli*. The absence of bacterial growth, even upon re-incubation, shows that the Alg–Ag NPs–CTS composite film has both antibacterial and bacteriostatic effects.

Conclusion

The preparation of silver nanoparticles in aqueous alginate solution under UV-irradiation and without the use of a reducing agent or heat treatment was performed.

The UV–Vis absorption spectra revealed that the SPR bands of Ag NPs were affected by the UV-irradiation exposure time. The size of the synthesised Alg–Ag NPs ranged from 12.17 to 101 nm. These fabricated Ag NPs in alginate proved very stable over a three-month period.

Blending with chitosan, and casting in Petri dishes effectively delivered films of Alg–Ag NPs–CTS bionanocomposite.

Characterisation by FTIR, SEM and XRD was undertaken and showed an interaction between alginate and chitosan polymers, as well as the formation of cubic centred Ag NPs in the films.

The antibacterial activity of the prepared films, namely those irradiated for one and three hours, against *P. aeruginosae*, *A. baumannii*, *C. freundii*, *B. cereus*, *S. aureus* and *E. coli*, was demonstrated.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

[1] Li Y, Liu L, Qu X, et al. Drug delivery property, antibacterial performance and cytocompatibility of gentamycin loaded poly(lactic-co-glycolic acid) coating on porous magnesium scaffold. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2015;30:B96–B103.

[2] Ren L, Chong J, Loya A, et al. Determination of Cu²⁺ ions release rate from antimicrobial copper bearing stainless steel by joint analysis using ICP-OES and XPS. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2015;30:B86–B89.

[3] Zhang S, Yang C, Ren G, et al. Study on behaviour and mechanism of Cu²⁺ ion release from Cu bearing antibacterial stainless steel. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2015;30:B126–B132.

[4] Yin Y, Zhang X, Wang D, et al. Study of antibacterial performance of a type 304 Cu bearing stainless steel against airborne bacteria in real life environments. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2015;30:B104–B108.

[5] Wang S, Zhu W, Yu P, et al. Antibacterial nanostructured copper coatings deposited on tantalum by magnetron sputtering. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2015;30:B120–B125.

[6] Rawat J, Rana S, Srivastava R, et al. Antimicrobial activity of composite nanoparticles consisting of titania photocatalytic shell and nickel ferrite magnetic core. *Mater Sci Eng C.* 2007;27:540–545.

[7] Rawat J, Rana S, Sorensson MM, et al. Anti-microbial activity of doped anatase titania coated nickel ferrite composite nanoparticles. *Mater Sci Technol.* 2007;23:97–102.

[8] Rana S, Rawat J, Sorensson MM, et al. Antimicrobial function of Nd³⁺-doped anatase titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: a biomaterial system. *Acta Biomater.* 2006;2:421–432.

[9] Nune KC, Somani MC, Spencer CT, et al. Cellular response of *Staphylococcus aureus* to nanostructured metallic biomedical devices: surface binding and mechanism of disruption of colonization. *Biotechnol. Bioeng.* doi:10.1080/10667857.2015.1112572

[10] Venkatasubramanian R, Srivastava RS, Misra RDK. Comparative study of antimicrobial and photocatalytic activity in titania encapsulated composite nanoparticles with different dopants. *Mater Sci Technol.* 2008;24:589–595.

[11] Sunkara BK, Misra RDK. Enhanced antibactericidal function of W⁴⁺-doped titania-coated nickel ferrite composite nanoparticles: a biomaterial system. *Acta Biomater.* 2008;4:273–283.

[12] Depan D, Misra RDK. On the determining role of network structure titania in silicone against bacterial colonization: mechanism and disruption of biofilm. *Mater Sci Eng C.* 2014;34:221–228.

[13] He T, Zhu W, Wang X, et al. Polydopamine assisted immobilisation of copper (II) on titanium for antibacterial applications. *Mater Technol Adv Perform Mater.* 2014. doi:10.1179/1753555714Y.0000000189

[14] Zhang D, Zhang B, Tang XN, et al. Preparation and characterisation of copper inorganic antibacterial material containing Holmium. *Mater Technol Adv Biomater.* 2015;30:B133–B138.

[15] Ma Z, Yao M, Liu R, et al. Study on antibacterial activity and cytocompatibility of Ti–6Al–4V–5Cu alloy. *Mater Technol Adv Biomater.* 2015. doi:10.1179/1753555714Y.0000000237.

[16] Rana S, Srivastava RS, Sorensson MM, et al. Synthesis and characterization of nanoparticles with magnetic core and photocatalytic shell: anatase TiO₂–NiFe₂O₄ system. *Mater Sci Eng B.* 2005;119:144–151.

[17] Huang HH, Tung KL, Lin YY. Treating Ti containing dental orthodontic wires with nitrogen plasma immersion ion implantation to reduce the metal ions release and bacterial adhesion. *Mater Technol Adv Biomater.* 2015;30:B73–B79.

- [18] Yu L, Li J, Wang D, et al. Improved antimicrobial activity and bioactivity of porous CaP-TiO₂ coating through surface nanofunctionalisation. *Mater Technol Adv Biomater.* 2015. doi:10.1179/1753555714Y.0000000240.
- [19] Bhatte KD, Tambade PJ, Dhake KP, et al. Silver nanoparticles as an efficient, heterogeneous and recyclable catalyst for synthesis of β -enaminones. *Catal Commun.* 2010;11:1233–1237.
- [20] Musarrat J, Dwivedi S, Singh BR, et al. Production of antimicrobial silver nanoparticles in water extracts of the fungus *Amylomyces rouxii* strain KSU-09. *Bioresour Technol.* 2011;101:8772–8776.
- [21] Kosmala A, Wright R, Zhang Q, et al. Synthesis of silver nano particles and fabrication of aqueous Ag inks for inkjet printing. *Mater Chem Phys.* 2011;129:1075–1080.
- [22] Ryu BHW, Choi Y, Park HS, et al. Synthesis of highly concentrated silver nanosol and its application to inkjet printing. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects.* 2005;270-271:345–351.
- [23] Jain P, Pradeep T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90:59–63.
- [24] Gong P, Li H, He X, et al. Preparation and antibacterial activity of Fe₃O₄-Ag nanoparticles. *Nanotechnology.* 2007;18:604–11.
- [25] Jun J, Yuan DY, Shao-hai W, et al. Preparation and characterization of antibacterial silver-containing nanofibers for wound dressing applications. *J US-China Med Sci.* 2007;4:52–54.
- [26] Kim JS, Kuk E, Yu KN, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol Med.* 2007;3:95–101.
- [27] Misra RDK, Bhupendra G, Depan D, et al. Hybrid nanoscale architecture for enhancement of antimicrobial activity: immobilization of Silver nanoparticles on thiol-functionalized. Polymer crystallized on carbon nanotubes. *Adv Eng Mat.* 2012. doi: 10.1002/adem.20118008
- [28] Girase B, Depan D, Shah JS, et al. Silver-clay nanohybrid structure for effective and diffusion-controlled antimicrobial activity. *Mater Sci Eng C.* 2011;31:1759–1766.
- [29] Depan D, Misra RDK. Hybrid nanoscale architecture of wound dressing with super hydrophilic, antimicrobial, and ultralow fouling attributes. *J Biomed Nanotechnol.* 2015;11:306–318.
- [30] Gogoi SK, Gopinath P, Paul A, et al. Green fluorescent protein-expressing *Escherichia coli* as a model system for investigating the antimicrobial activities of silver nanoparticles. *Langmuir.* 2006;22:9322–9328.
- [31] Nickel U, Castell AZ, Poppl K, et al. A silver colloid produced by reduction with hydrazine as support for highly sensitive surface enhanced Raman spectroscopy. *Langmuir.* 2000;16:9087–9091.
- [32] Pastoriza-Santos I, Liz-marzan LM. Formation and stabilization of silver nanoparticles through Reduction by N,N-Dimethylformamide. *Langmuir.* 1999;15:948–951.
- [33] Kang Y, Choi S, Gopalan A, et al. Tuning of morphology of Ag nanoparticles in the Ag/polyaniline nanocomposites prepared by γ -ray irradiation. *J Non Cryst Solids.* 2006;352:463–468.
- [34] Chou KS, Lai YS. Effect of polyvinyl pyrrolidone molecular weights on the formation of nanosized silver colloids. *Mater Chem Phys.* 2004;83:82–88.
- [35] Liu Y, Chen S, Zhong L, et al. Preparation of high stable silver nanoparticle dispersion by using sodium alginate as a stabilizer under gamma radiation. *Radiat Phys Chem.* 2009;78:251–255.
- [36] Huang H, Yang X. Synthesis of polysaccharide-stabilized gold and silver nanoparticles: a green method. *Carbohydr Res.* 2004;339:2627–2631.
- [37] Long DW, Wu GZ, Chen SM. Preparation of oligochitosan stabilized silver nanoparticles by gamma irradiation. *Radiat Phys Chem.* 2007;76:1126–1131.
- [38] Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydr Polym.* 2012;88:1–12.
- [39] Shilpa A, Agrawal SS, Ray AR. Controlled Delivery of Drugs from Alginate Matrix. *J Macromol Sci Part C Polym Rev.* 2003;43:187–221.
- [40] Sachan NK, Pushkar S, Jha A, et al. Sodium alginate: the wonder polymer for controlled drug delivery. *J Pharm Res.* 2009;2:1191–1199.
- [41] Chiu CT, Lee JS, Chu CS, et al. Development of two alginate-based wound dressings. *J Mater Sci Mater Med.* 2008;19:2503–2513.
- [42] Kim E, Yeum JH, Ghim HD, et al. Ultra small polyethyleneimine-gold nanopatricles with high stability. *Polym (Korea).* 2011;35:161–165.
- [43] Gombotz WR, Wee SF. Protein release from alginate matrices. *Adv Drug Delivery Rev.* 1998;31:267–285.
- [44] Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate Hydrogels as Biomaterials. *Macromol Biosci.* 2006;6:623–633.
- [45] Lee KY, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev.* 2001;101:1869–1880.
- [46] Madihally SV, Matthew HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 1999;20:1133–1142.
- [47] Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering☆. *Adv Drug Delivery Rev.* 2006;58:487–499.
- [48] Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci.* 2006;31:603–632.
- [49] Bhupendra G, Krutika D, Sawant K. Polyelectrolyte complex of chitosan Alginate for local drug delivery. *Int J Chem Technol Res.* 2009;1:643–648.
- [50] Lai HL. The preparation and characterisation of drug-loaded alginate and chitosan sponges. *Int J Pharm.* 2003;251:175–181.
- [51] Sharma S, Sanpui P, Chattopadhyay A. Fabrication of antibacterial silver nanoparticle-sodium alginate-chitosan composite films. *RSC Adv.* 2012;2:5837–5843.
- [52] Xu JB, Bartley JP, Johnson RA. Preparation and characterization of alginate-carrageenan hydrogel films crosslinked using a water soluble carbodiimide (WSC). *J Membr Sci.* 2003;218:131–146.
- [53] Marignier JL, Belloni J, Delcourt M, et al. Microaggregates of non-noble metals and bimetallic alloys prepared by radiation-induced reduction. *Nature.* 1985;317:344–345.
- [54] Szymańska-Chargot M, Gruszecka A. Formation of nanoparticles and nanorods via UV irradiation of AgNO₃ solutions. *J Alloys Compd.* 2009;486:66–69.
- [55] Meng X, Tian F, Yang J, et al. Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21:1751–1759.
- [56] Ke G, Xu W, Yu W. Preparation and properties of drug-loaded chitosan-sodium alginate complex membrane. *Int J Poly Mater.* 2010;59:184–191.
- [57] Kamat PV, Flumiani M, Hartland GV. Picosecond dynamics of silver nanoclusters. photoejection of electrons and fragmentation. *J Phys Chem B.* 1998;102:3123–3128.

- [58] Darroudi M, Ahmad MB, Shamel K, et al. Synthesis and characterization of UV-irradiated silver/montmorillonite nanocomposites. *Solid State Sci.* **2009**;11:1621–1624.
- [59] Lanje AS, Sharma SJ, Pode RB. Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial Agents. *J Chem Pharm Res.* **2010**;2:478–483.
- [60] Yuvarani I, Kumar S, Venkatesan S, et al. Preparation and characterization of curcumin coated chitosan-alginate blend for wound dressing application. *J Biomater Tissue Eng.* **2012**;2:54–60.
- [61] Vimala K, Sivudu KS, Mohan YM, et al. Controlled silver nanoparticles synthesis in semi-hydrogel networks of poly(acrylamide) and carbohydrates a rational methodology for antibacterial application. *Carbohydr Polym.* **2009**;75:47–463.
- [62] Depan D, Misra RDK. On the determining role of network structure titania silicone against bacterial colonization: mechanism and disruption of biofilm. *Mater Sci Eng C.* **2014**;34:221–228.

ملخص

تهدف هذه الأطروحة إلى تحضير افلام مركبة نانومترية باستخدام الالجينات، جسيمات الفضة النانومترية والكتوزان باستعمال طرق صديقة للبيئة. نقدم في هذا العمل طريقة تحضير جسيمات الفضة النانومترية في وسط مائي بواسطة الأشعة فوق البنفسجية وباستعمال بوليمير طبيعي : الألجينات كعامل مساعد على الاستقرار، بعد التفاعل، نقوم بدراسة أبعادها وأشكالها. فيما بعد تستعمل هذه الجسيمات المستقرة، لتكوين أفلام نانومترية مع الكيتوزان، ودراسة مدى تأثيرها على العديد من أنواع البكتيريا الممرضة.

أظهرت الدراسة الأولية للطيف فوق البنفسجي لهذه المحاليل أن تحضير جسيمات الفضة النانومترية بهذه الطريقة يمكن إجراؤه و أن أشكالها كروية أو قريبة من الكروية، كما يشير عرض هذه الاطيف إلى أن أبعاد هذه الجسيمات كبيرة . وقد أثبتت دراسة تشتت الضوء الديناميكي أن أبعادها تتراوح بين النانومتر و تصل حتى الميكرون.

بعد ذلك أستعملت هذه الجسيمات النانومترية المستقرة بواسطة الألجينات في صنع شرائط مركبة مع الكيتوزان، وقد درس التفاعل بينها بواسطة التحليل الطيفي بالأشعة تحت الحمراء. يشير التطور في أطيف الأشعة تحت الحمراء قبل وبعد التفاعل أن هناك فعلا تركيب متعدد الالكتروليت بين الالجينات و الكيتوزان كما يؤكد أيضا وجود جسيمات الفضة النانومترية في الشرائط. أما طيف الاشعة إكس فيؤكد وجود الامتصاصات المميزة للفضة في هذه الشرائط
أخيرا أثبتنا بوضوح التأثير المضاد للجراثيم للخلايا البكتيرية غرام + و غرام - .

Résumé

Ce travail de thèse a pour objectif de formuler un film nanocomposite à base d'un mélange d'alginate, de nanoparticules d'argent et de chitosane par procédé de chimie verte. Nous présentons dans ce travail la synthèse de nanoparticules d'argent par irradiation UV, et leur stabilisation en solution aqueuse avec un polysaccharide naturel : l'alginate.

Notre objectif est double : synthétiser ces nanoparticules dans les conditions suscitées, caractériser leur morphologie et leur taille et les utiliser pour former le film nanocomposite avec le chitosane par simple agitation.

À partir de mesures de spectrophotométrie UV-vis, nous avons montré que l'on pouvait synthétiser des nanoparticules d'argent de forme sphériques ou proches d'une sphère. L'allure des spectres de résonance des plasmons de surface élargis, suppose que les diamètres des nanoparticules sont élevés. Ces résultats ont été confirmés par mesure de diffusion dynamique de lumière : les diamètres varient de quelques nanomètres aux microns.

Nous avons ensuite élaborés des films nanocomposites avec le chitosane et on a étudié l'interaction de l'alginate agent stabilisant, avec le chitosane par spectrométrie infra rouge à transformée de Fourier. L'évolution des spectres IR avant et après formation de polyélectrolyte complexe Alginate / chitosan confirme la réaction ente eux et confirme aussi l'existence de nanoparticules d'argent dans les films. Les diffractogrammes RX montrent des pics caractéristiques des plans cristallins de l'argent. Dans les films nanocomposites préparés, nous avons clairement mis en évidence l'effet antibactérien pour des cellules bactériennes à Gram⁺ et Gram⁻.

Abstract

This work aims at the synthesis of a nanocomposite film using alginate, silver nanoparticles and chitosan by a green method. We present in this thesis the synthesis of silver nanoparticles by UV irradiation method, and their stabilization in aqueous solution by a natural polysaccharide: alginate.

Our objective is twofold: to synthesize these nanoparticles in the above-mentioned conditions, to characterize their morphology and size and to use them for elaboration of a nanocomposite film with chitosan by agitation.

From UV-vis spectrophotometry measurements, we have shown that the silver nanoparticles synthesized are of spherical shape or like a sphere . The appearance of the resonance spectra of the expanded surface plasmons, assume that the diameters of the nanoparticles are high. These results have been confirmed by dynamic light scattering measurements: diameters vary from a few nanometers to a few microns.

We have developed nanocomposite films with chitosan from these prepared nanoparticles and we studied the interaction of the stabilizing agent alginate, with chitosan by Fourier transform Infrared Spectroscopy. The evolution of the IR spectra before and after formation of the polyelectrolyte complex alginate / chitosan confirms the reaction between them and also confirms the existence of silver nanoparticles in the films. The X-ray diffractograms show characteristic peaks of the crystalline planes of silver. Finally, we clearly demonstrated the antibacterial effect of the prepared nanocomposite films for Gram + and Gram - bacteria cells.