



N° d'ordre :

N° de série :

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA  
RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITE ECHAHID HAMMA LAKHDAR D'EL-OUED  
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE CELLULAIRE ET  
MOLECULAIRE

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master Académique

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biochimie Appliquée

### THEME

**La synthèse verte de nanoparticules d'oxyde de zinc  
enrobées : une approche innovante contre les biofilms  
bactériens**

Présenté par: 1- Amal mimoun

2- Basma Mammeri

3- Hocine Bouzid

4- Manar Harrouchi

Devant le jury composé de:

Présidente: ..... Dr.ZEGHIB KHAOULA..... Université d'ElOued

Promotrice: ..... Pr. MEDILA Ifriqya ..... Université d'El Oued

Co- promotrice: ..... Dr. AZZI Manel ..... Université d'El Oued

Examineur: ..... Dr. TOUMI IKRAM.....Université d'El Oued

Année universitaire : 2024/2025

## Remerciements

*Avant tout, nous louons Allah, Le Tout-Puissant, qui nous a accordé la force, la patience et la persévérance nécessaires pour mener à bien ce travail.*

*Nous adressons nos plus sincères remerciements à notre encadrante, Madame **IFRIQYA MEDILA**, et Assistante **AZZI MANELET** pour encadrement rigoureux, ses conseils judicieux, dévouement et son soutien tout au long de cette étude.*

*Nous exprimons également notre profonde gratitude aux membres du jury pour leurs remarques pertinentes et leurs interventions constructives, qui ont contribué à orienter et à améliorer ce travail scientifique.*

## الإهداء

بسم الله الرحمن الرحيم

قال تعالى:

يَرْفَعُ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ.

أهدي هذا النجاح إلى من أحمل اسمه بكل فخر، إلى من حصد الأشواك عن دربي

ليمهد لي طريق العلم إلى أبي الغالي (سايح)،

إلى شمعة حياتي المضيئة الى ملاكي في الحياة... الى من كان دعاؤها سر نجاحي

الى من حاكت سعادتي بخيوط منسوجة إلى أمي كنز الدنيا (فاطمة)

إلى من كانت لي أما ثانية، وكتفًا أستند عليه يامن

كنت ومازلت مصدر إلهامي وتوجيهي لك كل حبي.... وتيني حنان

وإلى زوجها الكريم عبد الحكيم

إلى إخوتي الاعزاء قدوتي شكرا على كل لحظة دعم وقفتم فيها بجانبني (ناجي

جابر عبد الحق. كمال. عادل)

وإلى زوجات إخوتي الغاليات أدامكم الله.... إلى أبنائهم الذين زيّنوا حياتنا

بضحكاتهم البريئة، ريتاج. رنيم. أميمة. بيان إياد بلال. طه الامين. أنس. آدم. يزن

(أيوب)

إلى رُبّ أخت لم تلدها أمي. لآكن جمعتنا اللحظات الجميلة إلى توأمي (أمولتي)

صديقاتي العزيزات، يا من تقاسمن معي لحظات الفرح والحزن، وكنتن ومازلتن

شريكات حياتي ورفيقات دربي، شكرًا على كل لحظة جميلة عشناها معًا،

وتلوح آمال الحياة فأننتشي وأقول من فرط الطموح أنا لها، فظللت أسعى خلفها في

همة حتى عانقت غاياتي ونلتها " عظم المراد ... فهان الطريق، فجاءت لذة

الوصول لتزول مشقة السنين... تم بحمد الله وفضله تخرجي".

بسمه

## الإهداء

إلى التي لم تخذلني يوماً، إلى التي فعلتها رغم كل شيء، إلى البطلة الحقيقية لهذا النجاح... إلى نفسي  
إلى من أحمل اسمي بكل فخر، إلى مصباح دربي، والركن الذي ساندني، إلى أمان المسيرة، ونبض  
الطمأنينة في قلبي... أبي رعاك الله.  
إلى من جعل الله الجنة تحت أقدامها، إلى تلك الإنسانية العظيمة، التي لطالما تمنيت أن تقرّ عينها برؤيتي في  
يوم كهذا... أمي. شفاك الله وعافاك.  
إلى إخوتي، النبض الدافئ الذي لولاه لما كانت الخطى ثابتة: إلى من أخبرني أن العلم قوة وأن الطموح لا  
يكسر... أخي عبد الحق.  
إلى داعمي الأول، الذي لم يبخل يوماً بعطائه، بقلب أخ يرى نجاحي من نجاحه... الوليد. إلى الحنون الذي لم  
أهن عليه يوماً... خالد. إلى من منحني ثقته  
دون قيد، وفتح لي أبواب الفرص بصمت الحكماء... مسعود. إلى من لم يبخل عليّ يوماً بنصحه وحكمته...  
سليمان. إلى السند الذي لا يميل، والظلّ  
الذي لا يغيب، إلى من يتقن فنّ انتشالي من ضعفي... فتحي. إلى مشاكس البيت، وراسم الضحكة في الأيام  
الرمادية... غاني.  
وإلى من وهبني الله نعمة وجودهن، مصدر القوة والدعوات الصادقة، نجاحي هو نجاحكن، وفرحتي لا تكتمل  
إلا بذكركن...  
أخواتي البنات، وإلى من كنتُ لهنّ العمة والخالة.  
إلى خالتي سلطنة قلبي وبناتها الغاليات  
إلى من لم تكن فقط زوجة أخ، بل أختاً، إلى من احتوتني بقلبها، وشاركتني لحظات الفرح والدعاء... زوجات  
إخوتي.  
إلى صديقاتي الغاليات، رفيقات الدرب، وشريكات الضحكة: Z, S, A, R, A, M, B, A, D, M, B,  
إلى كلّ عائلتي فرداً فرداً، وكلّ من كان دعاءً خفياً، وكلمةً طيبة، ونيةً صادقة، شكراً لأنكم كنتم النور الهادي  
في طريقي.  
ولا يسعني إلا أن أختطف هذا السطر من بين سطور الامتحان، لأهديه إلى أمي الثانية، وملهمتي في كلّ  
خطوة،  
أختي العزيزة، وزوجها الذي لم يكن يوماً إلا أختاً كريماً وداعماً.  
وأخيراً، ها أنا اليوم أطوي صفحةً من التعب، وأسجل في تاريخي فخراً لا يُنسى. لم أعد أتساءل عن ملامح  
الوصول، فقد  
تلاشت ملامح التعب، وابتسم الأفق بعد عتمة الانتظار. (وَأَخِرُ دَعْوَاهُمْ أَنْ الْحَمْدُ لِلَّهِ رَبِّ الْعَالَمِينَ) صدق الله  
العظيم.

منار

## الإهداء

(وأخر دعواهم أن الحمد لله رب العالمين) الى النور الذي أضاء دربي إلى العزيز الذي حملت اسمه فخرا إلى معلمي الأول الذي سعى طوال حياته لنكون الافضل إلى أبي الغالي (الصحراوي)

أهدي تخرجي الى اليد الخفية والقلب الحنون وصاحبة الدعاء الصادق أمي الغالية (النخلة) الى سندي ومسندي، يامن كنت ومازلت شريكي في كل لحظة، وقفت بجانبني في الأوقات الصعبة وساندتني بكل قوة، اهديك هذا العمل كتعبير بسيط عن امتناني لوجودك في حياتي "كريم"

أخي الكبير شكرا على كل نصيحة وجهتها لي " شريف " الى مصدر قوتي الداعمين والساندين إلى خيرة أيامي وصفوتها إلى ضلعي الثابت وأمان أيامي أخوتي (فيروز لمياء، حياة) الى صغيرة البيت ونبض القلب وسندي الصغير كرومتي أسأل الله ان يفتح لك ابواب العلم وييسر لك دروب الدراسة إلى أولاد اخوتي الغاليين، يا من جعلتم حياتنا أكثر جمالا بضحكاتكم وبراءتكم (قصي ، أدم ، رودنية ، رنيم ، أريج ، ريماس ، أنفال ، جنان الرحمان ، سعد الدين ، شيماء ، إسراء ، رفيف ، إياد ، جاد ، سلمى ، جيهان)

الى زوجة أخي العزيزة سماح التي تقاسمت معنا الحياة بخلوها ومرها إلى أزواج إخوتي الاعزاء، أنتم لم تكونو فقط إضافة إلى عائلتنا، بل كنتم سندا ورفقة طيبة (حسان . حمه. زياد)

الى أختي التي لم تلدها أمي زوجت خالي وسيلة يا من كنت سند لي في دربي ، أهديك هذا العمل لتعبير عن حبي واحترامي لك استاذي محمد الأمين

إلى التي لن يعيدها الزمان، التي لا يخفت بريقها عني لحظة مشاكستي الدائمة "بسمتي" صديقاتي الغاليات، أنتم النور في حياتي، شكرا على كل لحظة حلوة عشناها معا أهديكن هذا العمل كتعبير عن امتناني لوجودكن في حياتي . ( مروة ماجدة صليحة. فيروز عيشة. أسماء. سوسن. وريدة. منار. دعاء. ايمان. نوال. نفيسة. إكرام. رباب. وئام) لن انساكن يا غاليات.

آمال

## الإهداء

إلى من خاضوا الحياة لأجلي إلى من غرسوا في قلبي  
الحلم وسقوه بالدعاء إلى من كانوا نور دربي وظلي حين  
أثقلتني الأيام .... إلى أمي وأبي يا معنى الحياة وجمالها  
هذا النجاح لكم أنا كنت فقط الوسيلة وأنتم الغاية التي  
سعيت لها بكل قلبي أنتم الإنجاز الحقيقي أنا فقط النتيجة  
كل لحظة شقاء عشتها ... كانت تهون حين أتذكركم وكل  
دمعة نزلت .... كانت تسجد شكراً أنكم في حياتي  
اليوم، أرف لكم شهادتي كما تهدي التيجان للملوك فأنتم  
سلطان قلبي وسر فرحتي هذا التخرج ليس ختما لمسيرة  
دراسية بل تتويجا لحبكم وصبركم ودعمكم الذي لا يقاس  
شكراً لأنكم كنتم وستظلون دوماً أعظم انتصاراتي  
حسين

## Résumé:

Le but de cette étude est la biosynthèse des nanoparticules d'oxyde de zinc (*ZnO NPs*) par une méthode verte utilisant l'extrait de pelures de grenade (*Punica granatum*), et l'évaluation de l'activité anti-biofilm bactérienne et anti-inflammatoire des nanoparticules de ZnO enrobées avec la quercétine et l'amoxicilline. Les étapes de notre travail ont inclus l'extraction des composés actifs à partir de la matière végétale, la réalisation de tests phytochimiques sur l'estimation de la teneur en polyphénols totaux, flavonoïdes et tanins condensés, la biosynthèse et l'enrobage des nanoparticules, suivis de leur caractérisation à l'aide de techniques analytiques (*UV-Vis*, *FTIR*, *DRX*). Nous avons évalué l'activité antioxydante (*FRAP*) des ZnO NPs, ainsi que l'activité anti-biofilm des nanoparticules contre quatre souches bactériennes (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas aeruginosa*), et l'activité anti-inflammatoire basée sur la méthode d'inhibition de la dénaturation des protéines (*BSA*). Les dimensions nanométriques de toutes les nanoparticules ont été confirmées par diffraction des rayons X (*DRX*), qui a confirmé une structure hexagonale pour les trois nanoparticules synthétisées (*ZnO NPs*, *ZnO@Quer* et *ZnO@Amoxicilline*) dont la taille des particules de ZnO est de  $28,16 \pm 0,17$  nm respectivement. Les ZnO NPs ont montré une efficacité antibactérienne notable. L'activité anti-biofilm la plus marquée a été observée à une concentration de 125 µg/mL, en particulier contre *Staphylococcus aureus*, avec un taux d'inhibition supérieur à 73,94 %. Notamment, les nanoparticules de ZnO enrobées de quercétine ont démontré une activité anti-biofilm renforcée, dépassant également les 73,94 % d'inhibition pour l'ensemble des souches bactériennes testées. L'étude de l'activité anti-inflammatoire a montré un grand pourcentage d'inhibition ; une forte activité anti-inflammatoire, avec un pourcentage d'inhibition de 67,6 % pour les ZnO NPs, 96,7 % pour ZnO NPs enrobé de quercétine et 96,0 % pour ZnO NPs enrobé de amoxicilline à la concentration la plus élevée.

Nos résultats suggèrent une synergie prometteuse entre les nanoparticules et les agents antimicrobiens conventionnels, en particulier celles enrobées de quercétine, présentent une efficacité élevée, ce qui en fait une option thérapeutique prometteuse, pouvant ouvrir la voie à des recherches approfondies en vue de leur valorisation potentielle dans les domaines pharmaceutique et agroalimentaire.

**Mots-clés :** La synthèse verte, nanoparticules d'oxyde de zinc, biofilms bactériens, ZnO @Amoxicilline, ZnO@ Quercétine

## **Abstract:**

The aim of this study is the biosynthesis of zinc oxide nanoparticles (*ZnO NPs*) using a green method based on pomegranate peel extract (*Punica granatum*), and the evaluation of the anti-biofilm and anti-inflammatory activities of ZnO nanoparticles coated with quercetin and amoxicillin. The steps of our work included the extraction of active compounds from plant material, phytochemical tests to estimate the content of total polyphenols, flavonoids, and condensed tannins, the biosynthesis and coating of the nanoparticles, followed by their characterization using analytical techniques (*UV-Vis*, *FTIR*, *XRD*). We evaluated the antioxidant activity (*FRAP*) of ZnO NPs, as well as the anti-biofilm activity of the nanoparticles against four bacterial strains (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Pseudomonas aeruginosa*), and the anti-inflammatory activity based on the protein denaturation inhibition method (*BSA*). The nanometric dimensions of all nanoparticles were confirmed by X-ray diffraction (*XRD*), which confirmed a hexagonal structure for the three synthesized nanoparticles (*ZnO NPs*, *ZnO@Quercetin*, and *ZnO@Amoxicillin*), with a particle size of  $28.16 \pm 0.17$  nm respectively. ZnO NPs showed notable antibacterial effectiveness. The most significant anti-biofilm activity was observed at a concentration of 125  $\mu\text{g/mL}$ , particularly against *Staphylococcus aureus*, with an inhibition rate greater than 73.94%. Notably, ZnO nanoparticles coated with quercetin showed enhanced anti-biofilm activity, also exceeding 73.94% inhibition across all tested bacterial strains. The study of anti-inflammatory activity revealed a high inhibition rate; with a strong anti-inflammatory effect shown by 67.6% inhibition for ZnO NPs, 96.7% for ZnO NPs coated with quercetin, and 96.0% for ZnO NPs coated with amoxicillin at the highest concentration.

Our results suggest a promising synergy between nanoparticles and conventional antimicrobial agents. In particular, those coated with quercetin demonstrated high efficacy, making them a promising therapeutic option and paving the way for further research into their potential applications in the pharmaceutical and agri-food sectors.

**Keywords:** green synthesis, zinc oxide nanoparticles, bacterial biofilms, ZnO@Amoxicillin, ZnO@Quercetin.

يهدف هذا البحث إلى التخليق الحيوي لجسيمات نانوية من أكسيد الزنك (*ZnO NPs*) باستخدام طريقة صديقة للبيئة تعتمد على مستخلص قشور الرمان (*Punica granatum*)، وتقييم النشاط المضاد لتكوين الأغشية الحيوية البكتيرية (*الببوفيلم*) والنشاط المضاد للالتهابات لجسيمات *ZnO* النانوية المغلفة بمادتي الكيرسيتين (*quercétine*) والأموكسيسيلين (*amoxicilline*).

شملت مراحل العمل استخراج المركبات النشطة من المادة النباتية، وإجراء اختبارات فيتوكيميائية لتقدير محتوى البوليفينولات الكلية والفلافونويدات والتانينات المكثفة، ثم التخليق الحيوي وتغليف الجسيمات النانوية، تلاه توصيفها باستخدام تقنيات تحليلية مثل (*DRX*، *FTIR*، *UV-Vis*).

تم تقييم النشاط المضاد للأكسدة (بطريقة *FRAP*) لجسيمات *ZnO*، بالإضافة إلى النشاط المضاد للببوفيلم ضد أربع سلالات بكتيرية (*Pseudomonas*، *Bacillus subtilis*، *Staphylococcus aureus*، *Escherichia coli*) وكذلك النشاط المضاد للالتهابات استنادًا إلى اختبار تثبيط التمسح البروتيني (*BSA*).

تم تأكيد الأبعاد النانوية لجميع الجسيمات من خلال تحليل حيود الأشعة السينية (*XRD*)، والذي أكد وجود بنية بلورية سداسية للأشكال الثلاثة المحضرة (*ZnO@Amoxicilline*، *ZnO@Quer*، *ZnO NPs*)، وبلغ متوسط حجم الجسيمات  $28.16 \pm 0.17$  نانومتر.

أظهرت جسيمات *ZnO* فعالية ملحوظة ضد البكتيريا. وسُجّلت أقوى فعالية مضادة للببوفيلم عند تركيز 125 ميكروغرام/مل، خصوصًا ضد *Staphylococcus aureus*، بنسبة تثبيط تجاوزت 73.94%. كما أظهرت الجسيمات المغلفة بالكيرسيتين نشاطًا معززًا ضد الببوفيلم، متجاوزة كذلك نسبة 73.94% عبر جميع السلالات البكتيرية المختبرة.

كذلك، أظهر اختبار النشاط المضاد للالتهاب نسب تثبيط مرتفعة: 67.6% لجسيمات *ZnO*، و96.7% للجسيمات المغلفة بالكيرسيتين، و96.0% لتلك المغلفة بالأموكسيسيلين عند أعلى تركيز مستخدم.

تشير نتائجنا إلى وجود تآزر واعد بين الجسيمات النانوية والعوامل المضادة للميكروبات التقليدية، خصوصًا تلك المغلفة بالكيرسيتين، والتي أظهرت فعالية عالية، مما يجعلها خيارًا علاجيًا واعدًا وقد يفتح آفاقًا لبحوث مستقبلية تهدف إلى تميمها في المجالات الصيدلانية والصناعات الغذائية الزراعية.

**الكلمات المفتاحية:** التخليق الأخضر، جسيمات أكسيد الزنك النانوية، الأغشية الحيوية البكتيرية، *ZnO@Amoxicilline*، *ZnO@Quer*.

# LISTE DES FIGURES

## PARTIE THEORIQUE

### CHAPITRE I : Nanoparticule

<b>Figure .1:</b> Gamme de tailles des nanoparticules comparée aux principales structures chimiques et biologiques .....	<b>05</b>
<b>Figure .2:</b> Approches de synthèse de nanoparticules.....	<b>09</b>
<b>Figure .3:</b> La synthèse des nanoparticules vertes.....	<b>13</b>
<b>Figure .4:</b> Principe de la spectroscopie FT-IR b) Spectre FT-IR des ZnONP biosynthétique utilisant un extrait de plante .....	<b>18</b>
<b>Figure .5:</b> A schematic representation of nanomaterials and their applications.....	<b>22</b>

### CHAPITRE II : Punica granatum L

<b>Figure .1:</b> Le grenadier, Punica granatum L.....	<b>31</b>
<b>Figure .2:</b> Structure des principaux acides phénoliques des grenades.....	<b>34</b>
<b>Figure .3:</b> Squelette de base de différentes classes des flavonoïdes.....	<b>35</b>

## PARTIE PRATIQUE

### CHAPITRE 1 : Matériels et méthodes

<b>Figure -1:</b> Schéma illustrant les principales étapes de la poudre d'écorces de grenade (Punica granatum).....	<b>58</b>
<b>Figure -2 :</b> Les étapes de préparation de l'extrait végétale à partir des écorces de grenade...	<b>60</b>
<b>Figure -3 :</b> Préparation des nanoparticules de ZnO à partir des écorces de grenade.....	<b>63</b>
<b>Figure -4 :</b> Préparation de Zn O enrobé de quercétine dans l'aboratiore.....	<b>65</b>
<b>Figure -5:</b> Préparation de Zn O enrobé de amoxicilline dans l'aboratiore.....	<b>66</b>
<b>Figure -6:</b> Effet des nanoparticules de ZnO sur la formation du biofilm bactérien (PNA, PNB, PNC).....	<b>67</b>
<b>Figure -7 :</b> Étapes expérimentales de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation des protéines (d'albumine sérique bovine).....	<b>69</b>

# LISTE DES TABLEAUX

## PARTIE THEORIQUE

CHAPITRE II : *Punica granatum* L

**Tableau -1:** Variétés principales de grenade à l'échelle mondiale et en Algérie .....**32**

**Tableau -2:** Composition du jus de grenades en acides organiques (mg/100 g) de la partie comestible du fruit.....**34**

# SOMMAIRE

Remerciements

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

SOMMAIRE

**Introduction générale**

**PREMIERE PARTIE : PARTIE THEORIQUE**

**CHAPITRE I : NANOPARTICULE**

I – Definition de la nanoparticule :.....	5
II – Méthodes de synthèse des nanoparticules .....	5
II.1. Méthodes physiques .....	5
II.1.1. Méthode du broyeur à billes .....	6
II.1.2. Méthode d’ablation laser .....	6
II.1.3. Méthode de décomposition thermique : .....	7
II.1.4. Méthode lithographique:.....	7
II.1.5. Méthode d’évaporation physique .....	8
II.1.6. Méthode de pulvérisation .....	8
II.1.7. Méthode de l’ultra-sonication.....	9
II.2. Méthodes chimiques: .....	9
II.2.1. Dépôt chimique en phase vapeur (CVD).....	10
II.2.2. Méthode sol-gel: .....	10
II.2.3. Procédés hydrothermal et solvothermal .....	11
II.3. Méthodes biologiques .....	11
II.3.1. Synthèse des nanoparticules par les micro-organismes.....	12
II.3.2. Synthèse des nanoparticules par les plantes .....	14
III . Caractérisations des nanoparticules:.....	15
III.1. Spectroscopie UV/visible .....	15
III.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR).....	17
III.3. Diffraction des Rayons X (XRD) .....	18
III.4. Spectroscopie à dispersion d’énergie (EDS/EDX) .....	20
IV .Techniques de microscopie.....	21
IV.1. Microscopie électronique à balayage (MEB) .....	21
IV.2. Microscopie électronique à transmission (MET) .....	21

V. Applications des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnONPs).....	22
V.1. Applications biomédicales des ZnO NPs.....	23
V.2. Applications agricoles :.....	24
V.3. Cosmétiques :.....	24
V.4. Emballage des aliments.....	25
V.5. Textile :.....	25
VI. Activités biologiques nanoparticules ZnO.....	26
VI.1. Activité antibiofilms bactériens.....	26
VI-2. Activités antifongiques:.....	27
VI-3. Applications biomédicales des ZnO-NPs.....	27
VI-4. Activités antibactériennes des nanoparticules de ZnO.....	27
VI-5. Activités anti-diabétiques des nanoparticules ZnO.....	28

## **CHAPITRE II : PUNICA GRANATUM L**

I.1. Origine géographique et germination de la grenade.....	31
I.2. Compositions biochimiques majeures.....	32
I.2.1 Sucres.....	33
I.2.2 Protéines.....	33
I.2.3 Acides organiques.....	33
I.2.4 Acides phénoliques.....	34
I.2.5 Flavonoïdes.....	34
I.2.6 Tanins.....	37

## **CHAPITRE III : LA RESISTANCE BACTERIENNE**

I-1- Définition Bactérie.....	46
I-2- Biofilms.....	46
I-3- Le processus de formation des biofilms bactériens.....	47
I-4- Propriétés des biofilms bactériens.....	48
I-5- Mécanisme d'élimination des bactéries, méthodes et moyens.....	49
I-6- substances antibactériennes.....	49
I-7- familles d'antibiotiques.....	50
I-8- Extraits de plantes aux propriétés antibactériennes.....	51
I-9- Exemple d'utilisation : Synergie avec les antibiotiques.....	53
II. Nanomatériaux antibactériens.....	53
II.1. Nanoparticules métalliques.....	53
II.2. Nanomatériaux carbonés.....	54

II.3. Nanoargiles et nanocomposites .....	54
II.4. Nanoparticules polymériques .....	54
Applications des nanomatériaux antibactériens.....	55

## **DEUXIÈME PARTI : PARTIE PRATIQUE**

### **CHAPITRE I : MATÉRIELS ET MÉTHODES**

I. Matériel .....	58
I.1. Matériel végétale .....	58
I.1.2. Préparation et conservation de la poudre de fruit de grenade:.....	58
I.2. Souches bactériennes :.....	58
I.2.1 Escherichia coli (E. coli):.....	58
I.2.2 Salmonella : .....	59
I.2.3. Staphylococcus aureus:.....	59
I.2.4. Bacillus subtilis:.....	59
II. Méthodes :.....	59
II.1. Préparation de l'extrait :.....	59
II.2. Criblage phytochimique :.....	60
II.2.1 : polyphénols :.....	60
II.2.2. Flavonoïde : .....	60
II.2.3. tanine : .....	60
II.2.4. Alcaloïdes : .....	60
II.2.5. Terpénoïdes : .....	61
II.2.6 Saponines :.....	61
II.2.7. Glycosides cardiaques .....	61
II.2.8. Coumarines.....	61
II.2.9. Quinones.....	61
II.2.10. Stéroïdes .....	61
II.3. Quantification des composés phytochimiques .....	61
II.3.2. Estimation des flavonoïdes totaux :.....	62
II.3.3. Estimation des tanins condensés : .....	62
II.4. Synthèse verte de nanoparticules .....	62
II.4.1. Synthèse écologique de nanoparticules d'oxyde de zinc :.....	62
II.5. Caractérisation des nanoparticules de ZnO :.....	63
II.5.1. Spectrophotomètre UV-Vis (UV-Vis).....	63
II.5.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) .....	64

II.5.3. Diffraction des rayons X (DRX) .....	64
II.6. Activité antioxydante .....	64
II.7. Préparation de nanoparticules de zinc enrobées de médicament (quercétine et amoxicilline). .....	65
II.7.1. Préparation de ZnO enrobé de quercétine : .....	65
II.7.2. Préparation de Zn O enrobé d'antibiotique (amoxicilline) : .....	65
II.8. Activité antibactérienne.....	66
II.9. Activité anti-inflammatoire .....	67
II.10. Analyse statistique .....	67
<b>Conclusion générale.....</b>	<b>70</b>
<b>Références Bibliographique.....</b>	<b>74</b>

# *Introduction générale*

## Introduction générale

---

Les nanoparticules peuvent être synthétisées selon deux grandes stratégies : les approches top-down et bottom-up. Dans les approches top-down, les matériaux en vrac sont progressivement réduits jusqu'à atteindre l'échelle nanométrique, tandis que dans les approches bottom-up, les atomes ou molécules sont assemblés pour former des structures nanométriques. La méthode bottom-up est généralement utilisée dans les procédés de synthèse chimique et biologique des nanoparticules. Les nanomatériaux trouvent de nombreuses applications dans les domaines industriels, biomédicaux et électroniques. Ainsi, la synthèse de nanoparticules aux formes et tailles variées suscite un intérêt croissant dans la recherche **(Kumar et al., 2016)**.

Plusieurs méthodes physiques et chimiques présentent l'inconvénient d'être coûteuses, d'exiger des produits chimiques dangereux, un équipement complexe, une consommation énergétique élevée, ainsi que des conditions extrêmes de température et de pression **.(Manjamadha et Muthukumar., 2016)** Cela a conduit à une demande croissante pour des méthodes de synthèse simples, économiques et respectueuses de l'environnement. La synthèse biologique des nanoparticules s'inscrit dans cette optique en tant qu'approche de chimie verte, ne nécessitant pas l'emploi d'agents réducteurs ou stabilisants toxiques ; elle est de ce fait largement acceptée **(Khan et al., 2015)** Des nanoparticules métalliques ont été obtenues via diverses approches biologiques utilisant des micro-organismes **(Kushwaha et al., 2015)** **(Syed et al., 2013)** , des enzymes **(Gholami-Shabania et al., 2015)** ainsi que des extraits de plantes **(Patra et al., 2016)**. Ces différents agents biologiques sont donc considérés comme de véritables nano-usines vertes.

Parmi ces méthodes, la synthèse assistée par les plantes se distingue par sa simplicité, sa fiabilité, son faible coût et son caractère non toxique. **(Jayakumar et al., 2016)**

Diverses parties des plantes comme les feuilles, les racines, les callus, les tiges, les graines, les écorces, les fruits et les peaux ont été employées pour la synthèse de nanoparticules métalliques. Les biomolécules présentes dans les extraits végétaux, telles que les phénols, les protéines, les acides aminés, les flavonoïdes, les enzymes et les terpénoïdes, peuvent jouer simultanément le rôle d'agents réducteurs et stabilisants dans la formation des nanoparticules **(Maria et al., 2015)**.

Les nanoparticules (NPs), notamment celles à base de métaux comme l'argent, l'or ou l'oxyde de zinc, possèdent des propriétés antimicrobiennes efficaces via la génération de ROS, la perturbation membranaire et l'inhibition métabolique **(Dizaj et al., 2014)**. Elles sont également utilisées comme vecteurs pour une libération contrôlée d'antibiotiques, réduisant

## Introduction générale

---

les effets secondaires (Patra et al., 2018), et comme outils de diagnostic rapide via des biosenseurs (Zhao et al., 2013).

Les biofilms, quant à eux, forment des structures microbiennes protégées par une matrice extracellulaire, conférant une résistance accrue aux antibiotiques (Costerton et al., 1999). Les NPs peuvent pénétrer cette matrice (Peulen & Wilkinson., 2011), la dégrader avec des enzymes (Fleming & Rumbaugh., 2017), et induire un stress oxydatif létal pour les bactéries (Hajipour et al., 2012).

La résistance aux antibiotiques, identifiée comme une menace sanitaire mondiale (O'Neill., 2016), repose sur plusieurs mécanismes : enzymes inactivatrices, modification de cibles, efflux actif et barrière membranaire. Les biofilms exacerbent cette résistance via leur structure physique (Stewart & Costerton., 2001), la diversité métabolique des cellules (Lewis., 2007) et le transfert de gènes de résistance (Madsen et al., 2012).

Face à cela, les stratégies à base de NPs se développent : NPs multifonctionnelles combinant antibiotiques et agents antibiofilms (Beikzadeh et al., 2021), ou NPs sensibles aux conditions locales du biofilm permettant une libération ciblée (Chen et al., 2018).

L'objectif de cette étude est d'explorer le potentiel des nanoparticules dans le domaine médical, en particulier leur rôle dans la lutte contre les infections bactériennes. Elle vise à :

1. **Biosynthèse de nanoparticules**
2. **Évaluer leurs activités antibiofilms et anti inflammatoire**, en mettant en évidence leurs mécanismes d'action contre divers types de bactéries.
3. **Étudier leur implication dans la lutte contre la résistance aux antibiotiques**, un problème de santé publique majeur.
4. **Examiner l'usage des nanoparticules :**
  - **comme vecteurs d'antibiotiques**, pour améliorer leur efficacité et ciblage,
  - **et comme agents antibactériens à part entière**, grâce à leurs propriétés intrinsèques.

# *Partie Théorique*

---

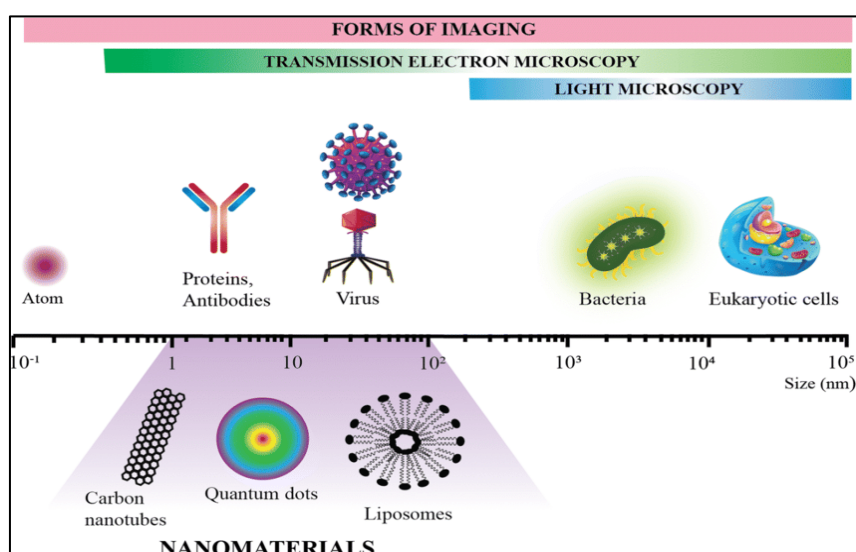
# **CHAPITRE I**

## **NANOPARTICULE**

### I – Définition de la nanoparticule :

Une nanoparticule, ou particule ultra-fine, constitue l'unité de base essentielle dans la fabrication d'une nanostructure. Elle est définie comme un nano-objet dont les dimensions sont réduites à l'échelle nanométrique, avec une taille estimée entre 1 et 100 nm (Figure .1).

Autrement dit, une nanoparticule peut être constituée de  $10$  à  $10^6$  atomes ou molécules, indépendamment de sa forme. Ces particules présentent des propriétés physico-chimiques particulières, en grande partie en raison du nombre significatif d'atomes présents à leur surface par rapport à ceux situés dans leur noyau. Dans ce contexte, la surface joue un rôle déterminant dans la compréhension des propriétés des nanoparticules.



**Figure.1 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée aux principales structures chimiques et biologiques (Boumezoued., 2020)**

### II – Méthodes de synthèse des nanoparticules

Les nanoparticules ont longtemps été synthétisées à l'aide de méthodes physiques et chimiques. Toutefois, ces dernières années, des avancées notables ont été réalisées grâce à l'introduction de micro-organismes et d'autres systèmes biologiques dans les procédés de synthèse et de production de nanoparticules métalliques.

#### II.1. Méthodes physiques

Un grand nombre de techniques physiques sont utilisées pour la synthèse des nanoparticules, parmi lesquelles on trouve l'ablation laser, le broyage à billes, la pyrolyse, les techniques lithographiques, le dépôt physique en phase vapeur, la pulvérisation, le dépôt par

arc électrique, l'implantation ionique, le laser à impulsions, le dépôt chimique en phase vapeur, ainsi que les méthodes sonochimique et radiolytique.

### II.1.1. Méthode du broyeur à billes

Le broyage à billes constitue une technique efficace pour réduire les matériaux en structures nanocristallines, et il est couramment utilisé dans la fabrication d'oxydes nanométriques (**Yamamoto et Mazumder., 1996**). À titre d'exemple, Bello et al. ont employé cette méthode pour synthétiser des nanoparticules à partir de coquilles de noix de coco. Ces dernières ont été finement broyées à différents intervalles de temps à l'aide d'un broyeur planétaire muni de billes en céramique. Les auteurs ont observé que la taille globale des nanoparticules dépendait du temps de broyage, et que la taille cristalline diminuait avec l'augmentation du temps de broyage, conformément à l'équation de Scherrer. Les résultats de diffraction des rayons X ont confirmé cette diminution de taille au fil du temps (**Bello, Agunsoye et Hassan., 2015**).

Par ailleurs, Salah et al. (**Salah et al., 2011**) ont utilisé la technique du broyeur à billes à haute énergie (HEBM) pour produire des nanoparticules de ZnO à partir de poudre microcristalline. Quatre échantillons ont été soumis à un broyage durant 2, 10, 20 et 50 heures respectivement. Les observations par microscopie électronique à balayage (SEM) et transmission (TEM) ont révélé une réduction progressive de la taille des particules, allant de 600 nm à environ 30 nm, démontrant ainsi l'efficacité de la méthode HEBM dans la synthèse de nanoparticules de ZnO.

Enfin, Yang et Chen (**Yang et Chen., 2017**) ont réussi à élaborer des nanoparticules d'oxyde de cuivre (CuO) via une méthode combinant broyage à billes et assistance par ultrasons à basse température, en utilisant l'acétate de cuivre ( $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) comme matière première.

### II.1.2. Méthode d'ablation laser

La technique d'ablation laser repose sur l'utilisation d'un laser pulsé de haute puissance afin d'évaporer le matériau cible placé dans une chambre contenant un gaz inerte. L'énergie du faisceau laser incident doit être adaptée en fonction des propriétés du matériau. Il s'agit d'une méthode polyvalente et largement applicable. L'ablation laser en solution constitue une approche simple permettant la synthèse de nanoparticules à partir de divers solvants. Lorsqu'un métal immergé dans une solution est irradié par un faisceau laser, un plasma se forme, induisant la condensation et la génération de nanoparticules (**Amendola et**

**Meneghetti., 2009).** Cette méthode permet d'obtenir des nanoparticules stables sans nécessité d'ajouter des agents stabilisants ou des produits chimiques.

Divers types de nanoparticules ont été synthétisés avec succès grâce à cette technique. **(Kim, Osone, Kim, Higashi et Seto., 2017)** ont résumé le mécanisme de formation des nanoparticules par ablation laser, et discuté des avancées récentes concernant le contrôle de leur taille ainsi que les défis liés à la synthèse fonctionnelle via cette technologie avancée. De même, Marina et Maria **(Martínez-Carmona et Vallet-Regí., 2020)** ont présenté une vue d'ensemble sur la synthèse de nanomatériaux à base de silicium par ablation laser, en mettant en évidence leur activité antibactérienne.

L'ablation laser s'avère également efficace pour la production de nanoparticules d'argent et d'or à partir de matériaux métalliques massifs en solution. Par exemple, Noor et al. **(Adrolhosseini et al., 2020)** ont synthétisé des nanoparticules d'or dans le tétrahydrofurane par ablation laser pulsée. Ils ont observé qu'un temps d'ablation de 30 minutes permettait de réduire la taille moyenne des nanoparticules d'or de 11 nm à 6 nm, et que la proportion de particules supérieures à 15 nm passait de 20 % à seulement 0,47 %. Ces résultats sont attribués à l'effet de la convection forcée et des ondes de choc générées par les impulsions laser, fragmentant ainsi les particules.

### **II.1.3. Méthode de décomposition thermique :**

La décomposition thermique est un procédé endothermique impliquant la dégradation chimique d'un composé sous l'effet de la chaleur. Cette dernière permet de rompre les liaisons chimiques au sein des composés, entraînant ainsi leur transformation **(Mir., 2008)**. La température de décomposition correspond à la valeur spécifique à laquelle un composé chimique se décompose. La formation de nanoparticules résulte de la décomposition de sels métalliques à des températures bien définies.

### **II.1.4. Méthode lithographique:**

Les méthodes lithographiques sont employées depuis plusieurs décennies dans la fabrication de circuits imprimés et de dispositifs électroniques. La lithographie nanoimprimée constitue une variante particulière, distincte de la lithographie classique, et s'apparente à une méthode de synthèse basée sur l'utilisation de modèles. Dans cette approche, un gabarit est d'abord élaboré, suivi par l'estampage d'un matériau polymère souple pour former des motifs spécifiques. La lithographie par nanosphères, par exemple, utilise des sphères de latex pour créer une structure matricielle ordonnée.

Il existe plusieurs techniques lithographiques, telles que la photolithographie, la lithographie par faisceaux d'électrons, la lithographie douce, la lithographie par ions focalisés, la lithographie par nano-empainte et la lithographie par pince plongeante (Ijaz et al., 2020). Dans une étude, (Prasek et al., 2011) ont présenté une vue d'ensemble sur la synthèse contrôlée de nanotubes de carbone (NTC) alignés verticalement à l'aide de techniques lithographiques pour le dépôt de catalyseurs. Par ailleurs, Zhang et al. (Zhang et al., 2006) ont résumé les récentes avancées dans la fabrication de nanoparticules de tailles variées en utilisant la lithographie nanosphérique (NSL), une méthode de nanofabrication économique, à haut rendement, permettant la création de structures nanométriques diversifiées, telles que des réseaux bidimensionnels ordonnés de nanoparticules.

### II.1.5. Méthode d'évaporation physique

La méthode d'évaporation physique repose sur l'évaporation de matériaux métalliques ou autres sous l'effet de la chaleur dans une atmosphère de gaz inerte ou réactif, au sein d'une chambre d'évaporation. Cette évaporation s'effectue à l'aide de techniques conventionnelles à partir d'un creuset adapté. Les atomes évaporés sont ensuite transportés vers une chambre de dépôt via un conduit spécifique. Lors de leur interaction avec les molécules du gaz, les atomes se condensent sous forme d'amas ou de nanoparticules sur un doigt froid installé dans le système sous vide. Ce cycle d'évaporation-condensation peut être répété afin de collecter une quantité suffisante de matériau dans un entonnoir équipé d'un dispositif à enclume (Yamamoto et Mazumder, 1996).

### II.1.6. Méthode de pulvérisation

La pulvérisation est une méthode de dépôt de nanoparticules basée sur l'éjection de particules vers un substrat (Shah et Gavrin, 2006). Le recuit thermique joue un rôle essentiel dans cette technique pour le dépôt de couches minces. Les caractéristiques des nanoparticules, telles que leur taille et leur morphologie, dépendent de paramètres tels que la température, l'épaisseur du film, la durée du recuit, le type de substrat, entre autres (Lugscheider et al., 1998)

Cette méthode est particulièrement adaptée à la réalisation de films multicouches pour des applications telles que les miroirs ou les couches magnétiques utilisées en spintronique. Trois types principaux de pulvérisation sont décrits : la pulvérisation à courant continu (DC), la pulvérisation par radiofréquence (RF) et la pulvérisation par magnétron (MS).

### II.1.7. Méthode de l'ultra-sonication

La méthode de l'ultra-sonication est largement utilisée pour réduire les ions métalliques en vue de la synthèse de nanomatériaux à l'état massif (**Mizukoshi et al., 1999**) (**Belloni, 1998**). Zhang et al. (**Zhang et al., 2015**) ont appliqué une approche descendante pour synthétiser des particules sphériques de carbone colloïdal de taille comprise entre 20 et 50 nm. Cette méthode repose sur l'adsorption chimique à la surface du carbone, permettant ainsi la transformation du noir de carbone en particules plus petites et sphériques. Les analyses par micrographie ont révélé que la taille des particules de carbone diminue avec l'augmentation du temps de sonication.

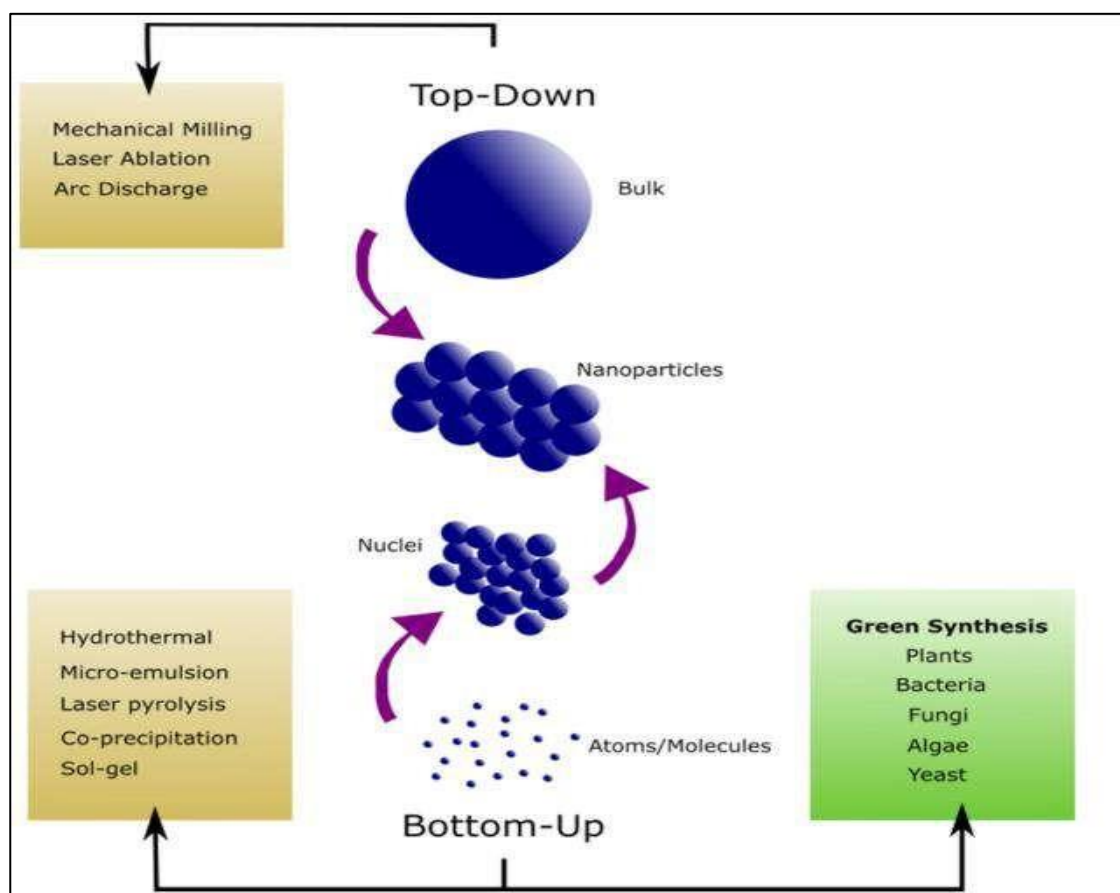


Figure.2 : Approches de synthèse de nanoparticules

### II.2. Méthodes chimiques:

Les méthodes chimiques représentent une approche ascendante, où les nanoparticules sont synthétisées à travers des processus de nucléation et de croissance à partir de précurseurs atomiques ou moléculaires, généralement dans la phase liquide ou gazeuse d'une réaction chimique. Parmi ces méthodes figurent la microémulsion, les procédés hydrothermaux, la précipitation, la pyrolyse ainsi que la méthode sol-gel.

Un contrôle rigoureux des paramètres de réaction tels que la température, la nature et la concentration des réactifs ainsi que des agents stabilisants permet d'ajuster finement la taille, la distribution granulométrique, la morphologie et la composition des nanoparticules, ce qui confère une grande diversité aux systèmes obtenus. La synthèse chimique offre l'avantage de produire des nanostructures avec peu de défauts, une homogénéité chimique élevée et des compositions complexes. En outre, cette approche est évolutive, économique et adaptée à la production de masse.

### II.2.1. Dépôt chimique en phase vapeur (CVD)

Le dépôt chimique en phase vapeur (Chemical Vapor Deposition, CVD) est un procédé permettant de produire des matériaux solides de haute pureté et de grande performance (**Okumura, Tsubota, & Haruta., 2003**). Ce procédé est couramment utilisé dans l'industrie des semi-conducteurs pour la formation de films minces. Typiquement, les précurseurs volatils sont introduits dans une chambre de réaction où ils se décomposent ou réagissent à la surface du substrat, générant ainsi le dépôt du matériau désiré, tandis que les sous-produits volatils sont évacués par le flux gazeux.

Le CVD est largement utilisé en microfabrication pour la déposition de matériaux sous forme amorphe, non cristalline ou épitaxiale. Les variantes les plus répandues incluent le CVD à basse pression (LPCVD) et le CVD assisté par plasma (PECVD). Le LPCVD permet la formation de couches d'une excellente uniformité, alors que le PECVD permet un dépôt plus localisé, limité à un côté de quelques plaquettes (**Bhaviripudi et al., 2007**).

Cette méthode permet la synthèse de nanoparticules homogènes, dures, résistantes et très pures. Toutefois, elle présente certains inconvénients, tels que la nécessité d'un équipement spécialisé et la formation de sous-produits gazeux potentiellement toxiques (**Hirao et al., 2003**).

### II.2.2. Méthode sol-gel:

La méthode sol-gel est l'une des techniques les plus répandues pour la synthèse des composés inorganiques, notamment des oxydes nanostructurés. Elle repose sur l'hydrolyse de précurseurs métalliques, souvent des alcooxydes en solution alcoolique ou des sels métalliques dissous dans une solution aqueuse (**Brinker & Scherer., 1990**).

De nombreuses études ont été publiées sur la synthèse de nanoparticules via cette méthode. Par exemple, Kayani et al. (**Kayani, Umer, & Riaz., 2015**) ont obtenu des

nanoparticules d'oxyde de cuivre en utilisant une solution aqueuse de nitrate de cuivre ( $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ ) et d'acide acétique comme précurseur. L'ajout d'hydroxyde de sodium ( $\text{NaOH}$ ) a conduit à la précipitation immédiate de  $\text{CuO}$ . Les analyses XRD ont révélé des pics caractéristiques de nanoparticules de  $\text{CuO}$  contenant à la fois des phases de cuprite et de ténorite. Les images MEB ont montré des nanoparticules sphériques de ténorite, tandis que la cuprite apparaissait sous forme de dépôt compact.

### II.2.3. Procédés hydrothermal et solvothermal

Les procédés hydrothermal et solvothermal constituent des méthodes importantes de synthèse basées sur la croissance de matériaux dans des autoclaves à température et pression élevées (Feng & Li., 2017).

La méthode hydrothermale est largement utilisée pour la fabrication de divers nanomatériaux inorganiques. Liang et al. (Liang et al., 2010) ont obtenu un nanocomposite  $\text{GO-TiO}_2$  par cette technique, démontrant une excellente performance photocatalytique.

Yang et al. (Liang et al., 2010) ont appliqué la méthode solvothermale pour synthétiser des nanocomposites graphène-Ag, montrant une conductivité électrique remarquable. L'hydrazine, utilisée comme agent réducteur, a permis un bon contrôle de la taille et de la morphologie des nanoparticules d'argent.

Malgré ses avantages - rendement élevé, morphologie uniforme, bonne dispersion - la méthode hydrothermale présente certains inconvénients : durée de réaction longue, impossibilité d'observer le processus in situ, limitation aux oxydes, et nécessité de réacteurs sous pression posant des risques de sécurité.

### II.3. Méthodes biologiques

La biosynthèse des nanométaux constitue une approche relevant de la « chimie verte ». La nature a doté les organismes vivants de mécanismes efficaces permettant d'élaborer des structures complexes. La synthèse verte a suscité un intérêt croissant, car elle représente une méthode écologique et économiquement viable pour produire des nanoparticules, tout en minimisant, voire éliminant, l'usage de précurseurs toxiques. Cette technique émergente vise à réduire la toxicité généralement associée aux méthodes chimiques et physiques conventionnelles. Elle repose sur une réaction d'oxydo-réduction, au cours de laquelle les ions métalliques sont réduits en nanoparticules.

La synthèse biologique s'effectue à l'aide d'extraits de plantes ou de micro-organismes tels que les bactéries et les champignons. Voir figure.2.

### II.3.1. Synthèse des nanoparticules par les micro-organismes

Les micro-organismes sont considérés comme de véritables « nano-usines », capables de produire des nanoparticules de manière écologique, économique et sans recourir à des produits chimiques toxiques ni à une consommation énergétique élevée. Ils possèdent des enzymes réductases leur permettant d'accumuler et de détoxifier les métaux lourds. Ces enzymes jouent un rôle clé dans la réduction des sels métalliques en nanoparticules. Ces dernières années, divers micro-organismes tels que les levures, champignons et bactéries ont été utilisés. Des protéines, cofacteurs réducteurs, gènes de résistance aux métaux, enzymes et substances organiques agissent comme agents réducteurs dans ces procédés.

Les protocoles de biosynthèse des nanoparticules s'appuient sur les 12 principes de la chimie verte (Kirchhoff, 2002). L'usage d'agents réducteurs et de tensioactifs écologiques pour la préparation des nanoparticules constitue une avancée récente (Kharissova et al., 2013). Des entités biologiques unicellulaires telles que les bactéries, champignons, virus et algues permettent d'obtenir des nanoparticules ultrapures à partir de précurseurs ioniques métalliques (Thakkar et al., 2010).

#### II.3.1.1. Synthèse des nanoparticules par les bactéries

La première démonstration de la capacité bactérienne à synthétiser des nanoparticules d'argent (Ag-NPs) a été réalisée avec la souche *Pseudomonas stutzeri* AG259, isolée d'une mine d'argent (Prabhu & Poulouse., 2012).

De nombreuses espèces bactériennes sont capables de réduire les métaux lourds, ce qui en fait des candidates potentielles pour la synthèse de nanoparticules. Cette réduction résulte de l'interaction entre les nanoparticules en formation et certains groupes fonctionnels présents à la surface de la paroi cellulaire, conférant à ces micro-organismes le statut de bio-usines efficaces (Rafique et al., 2017). Les espèces bactériennes utilisées incluent *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Actinobacter* sp, *Lactobacillus* spp, *Corynebacterium* sp, *Pseudomonas* sp, *Bacillus methylotrophicus*, *Streptomyces* sp, *Bhargavaea indica* (souche DC1), et *Rhodococcus* sp, entre autres.

Le principal inconvénient de l'utilisation des bactéries comme « nano-usines » est la lenteur du processus de synthèse et la diversité limitée des formes et tailles obtenues, en comparaison avec les méthodes conventionnelles.

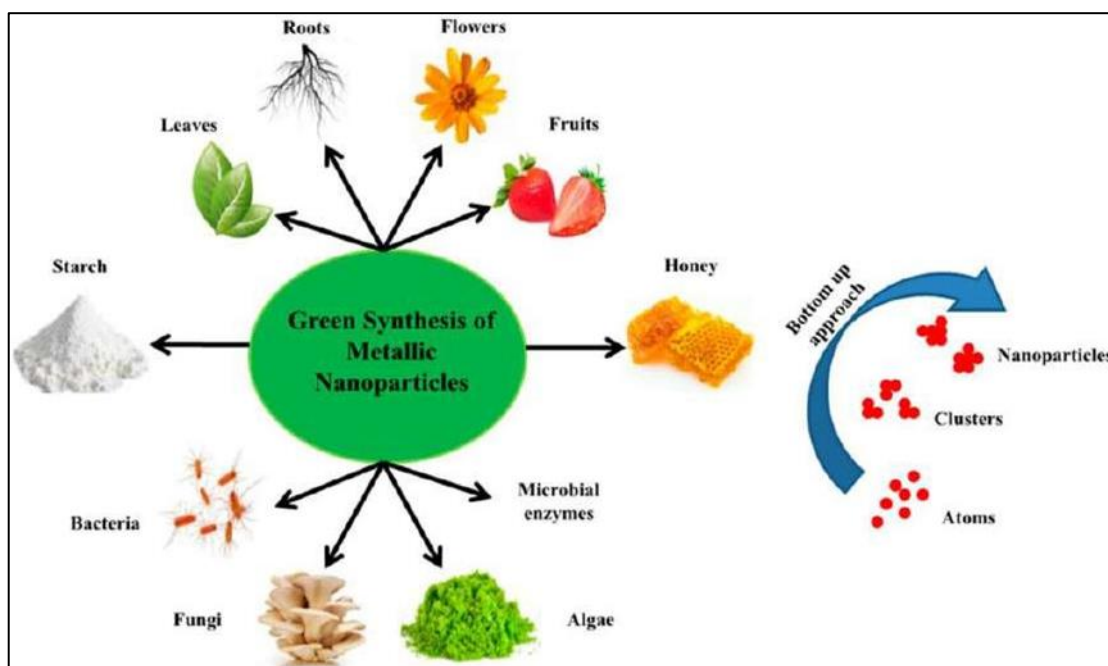


Figure.3 : La synthèse des nanoparticules vertes

### II.3.1.2. Synthèse des nanoparticules par les champignons

Récemment, la mycogénèse des nanoparticules a suscité un intérêt croissant parmi les chercheurs, bien que le mécanisme exact impliqué dans cette synthèse reste encore mal élucidé. Les champignons, appartenant au règne des eucaryotes multicellulaires, sont des organismes hétérotrophes jouant un rôle clé dans le cycle des nutriments des écosystèmes. Ils se reproduisent à la fois par voie sexuée et asexuée, et forment également des associations symbiotiques avec des plantes et des bactéries (Duhan et al., 2017).

La biosynthèse des nanoparticules métalliques ou d'oxydes métalliques par les champignons représente une méthode efficace, permettant l'obtention de structures aux morphologies bien définies. Comparés aux bactéries, les champignons produisent des quantités plus importantes de nanoparticules. Ils sont capables de sécréter divers types d'enzymes et de protéines qui non seulement réduisent les ions métalliques en nanoparticules, mais en assurent aussi leur stabilisation (Khandel & Kumar., 2018).

Le mécanisme de synthèse suit généralement deux étapes : tout d'abord, l'adsorption des ions métalliques (comme  $\text{Ag}^+$ ) à la surface des cellules fongiques, puis leur réduction par les enzymes produites par le système fongique.

De nombreux travaux ont été rapportés sur la synthèse de nanoparticules à partir de champignons tels que *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, *Alternaria alternata*, *Agaricus bisporus*, *Acremonium diospyri*, *Amylomyces rouxii*, *Colletotrichum sp.*, *Chlamydomucor rouxii*, *Candida utilis*, *Cryptococcus humicola*, *Chrysosporium*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium*

semitectum, Gloeophyllum abietinum, Ganoderma sp., Neurospora intermedia, Phomosis sp., Pleurotus sajor-caju, Penicillium janthinellum, Phoma glomerata, P. nodositatum, Phytophthora, Pestalotia sp., Pycnoporus sanguineus, Shigella dysenteriae, Trichothecium, Verticillium sp., etc. (Khan et al., 2018).

### II.3.1.3. Synthèse des nanoparticules par les algues

Les algues sont des organismes appartenant au règne végétal, vivant majoritairement en milieu aquatique ou dans des environnements humides. Elles possèdent de la chlorophylle et leur taille varie considérablement, allant de moins d'un micromètre (Prochlorococcus) à plusieurs dizaines de mètres (Macrocystis). Elles ne possèdent ni feuilles, ni racines, ni tissus vasculaires, ni fleurs, ni graines. Elles peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires, libres ou fixées, et on en recense plus de 30 000 espèces (Boussafeur & Hadjéris., 2012).

Pour optimiser la production de nanomatériaux à base d'argent, Rajeshkumar et al. (Rajeshkumar et al., 2014) ont utilisé un extrait de Sargassum longifolium et étudié les effets du temps d'incubation et du pH sur la synthèse. Mandal et al. (Mandal, Sekh, Sen Sarkar, Chattopadhyay & De., 2016) ont synthétisé des nanoparticules de sulfure de cadmium (CdS) à l'aide d'algues bleues couramment utilisées comme compléments alimentaires. Les CdS NPs obtenues présentaient une photoluminescence marquée et un fort potentiel en tant que photocatalyseurs pour la dégradation du colorant vert malachite, répondant ainsi aux exigences du traitement des eaux usées.

### II.3.2. Synthèse des nanoparticules par les plantes

La synthèse verte de nanoparticules à l'aide d'extraits végétaux a été initiée avec l'utilisation de la luzerne (alfalfa) entre 2002 et 2003. Cette approche se distingue par son efficacité, sa rapidité, sa non-pathogénicité, ainsi que par un potentiel élevé de bio-réduction.

Le mécanisme principal repose sur la réduction des ions métalliques assistée par les extraits végétaux, principalement en raison de la richesse en composés phytochimiques. Parmi ceux-ci, on retrouve les terpénoïdes, flavones, cétones, aldéhydes, amides et acides carboxyliques. Les flavonoïdes, les acides organiques et les quinones hydrosolubles sont responsables de la réduction immédiate des ions métalliques (Prabhu & Poulouse., 2012).

Diverses espèces végétales peuvent être utilisées pour la réduction et la stabilisation des nanoparticules. Les chercheurs ont exploité différentes parties de la plante – feuilles, tiges, racines ou fruits – pour la synthèse biologique de nanoparticules métalliques ou d'oxydes

métalliques. Les plantes contiennent une variété de biomolécules telles que des protéines, coenzymes et glucides, qui contribuent à la réduction des sels métalliques en nanoparticules.

De nombreux travaux ont mis en évidence l'utilisation de différentes espèces végétales dans la biosynthèse des nanoparticules métalliques. Gardea-Torresdey et al. (**Gardea-Torresdey et al., 2003**) ont rapporté la première utilisation de germes de luzerne pour la synthèse d'AgNPs, constituant ainsi la première description de production de nanoparticules d'argent par un système végétal vivant. Les racines de luzerne absorbent les ions  $\text{Ag}^+$  du milieu agar, les transportent dans les pousses sans altération de leur état d'oxydation, où ils s'assemblent pour former des nanoparticules.

En somme, la biosynthèse des nanoparticules à partir de plantes, en particulier médicinales, est considérée comme sûre, peu coûteuse, facile à mettre en œuvre, et économiquement viable par rapport à d'autres organismes biologiques tels que les microbes. La phytonanotechnologie offre ainsi des avantages considérables, notamment en termes d'évolutivité, de biocompatibilité et d'utilisation de l'eau comme solvant universel pour la réduction.

### III. Caractérisations des nanoparticules:

Les nanoparticules sont caractérisées par différentes techniques pour évaluer leur taille, forme, morphologie, composition et structure. Les méthodes couramment utilisées incluent la spectroscopie UV-visible pour l'absorbance (UV-Vis), la diffusion dynamique de la lumière (DLS) pour la taille (Rayleigh), l'analyse élémentaire via EDX/EDS, la diffraction des rayons X (XRD) pour la taille cristalline (équation de Scherrer (**Scherrer., 1918**), et la spectroscopie FTIR, XPS et Raman pour l'identification des groupes fonctionnels (**Menon, Rajeshkumar & V. K. S., 2017**) , (**Shah, Fawcett, Sharma & Tripathy., 2015**). Les techniques de microscopie comme le MEB, MET, HR-MET et MFA permettent d'observer les détails morphologiques et dimensionnels (**Quester et al., 2013**) , (**Hulkoti & Taranath., 2014**) .

#### III.1. Spectroscopie UV/visible

La spectroscopie UV-Visible est une méthode quantitative, non destructive, permettant de mesurer l'absorbance et la transmission de la lumière à travers un échantillon dans les gammes UV (200–400 nm) et visible (400–800 nm). Elle fournit des informations sur les propriétés optiques telles que l'absorption (A), la transmission (T) et la réflexion (R). L'intensité de la lumière est mesurée avant et après passage à travers l'échantillon, ce qui

permet de tracer le spectre d'extinction en fonction de la longueur d'onde. Ce spectre est corrigé à l'aide d'un blanc (tampon) afin d'éliminer les interférences de fond. L'absorbance est généralement interprétée selon la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

où A est l'absorbance,  $\epsilon$  le coefficient d'extinction molaire, c la concentration de l'échantillon et l la longueur du trajet optique.

Les nanoparticules métalliques présentent des propriétés optiques uniques en raison du phénomène de résonance plasmonique de surface (SPR), qui est fortement dépendant de leur taille, forme et nature (2–100 nm) (**Poinern., 2014**). Par exemple, les AgNPs présentent un pic d'absorbance entre 400 et 450 nm (**Verma, Kharwar & Gange., 2010**), (**Aboelfetoh, El-shenody & Ghobara., 2017**) , les AuNPs entre 500 et 550 nm, et les ZnONPs entre 350 et 390 nm (**Poinern, 2014**), (**Shukla & Iravani., 2017**) .

Diverses études ont démontré l'application de cette technique dans la caractérisation de NPs :

Gur et al. (**Shukla & Iravani., 2017**) ont observé un pic autour de 360 nm pour les ZnONPs synthétisées à partir de *Thymbra spicata* L. Dans une autre étude (**Erdogan et al., 2019**) , des ZnONPs obtenues à partir de feuilles d'artichaut (*Cynara scolymus*) ont montré une absorbance croissante entre 320–335 nm.

Sathiyaraj et al. (**Sathiyaraj et al., 2021**) ont synthétisé des AuNPs à partir d'un extrait de pancha gavya, détectant un pic SPR à 527 nm.

Rolim et al. (**Rolim et al., 2018**) ont confirmé la formation d'AgNPs biogéniques à partir d'extraits de thé vert (*Camellia sinensis*) par un pic SPR à 410 nm, avec revêtement PEG pour stabilité.

Mariadoss et al. (**Mariadoss et al., 2022**) ont observé un pic à 278 nm pour des SeNPs synthétisées à partir d'*Artemisia annua* et encapsulées dans de l'amidon (StAaSeNPs).

Amer et Awwad (**Amer & Awwad., 2018**) ont rapporté un pic à 579 nm pour des CuNPs obtenues par réduction verte avec un extrait de Citrus limon, indiquant une bioréduction presque complète.

Enfin, Ruíz-Baltazar et al. (**Ruíz-Baltazar & Reyes-López., 2019**) ont rapporté la synthèse de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs à l'aide de l'extrait de *Cynara cardunculus*, dont le spectre UV-vis a

montré une faible intensité à 230 nm, et identifié deux bandes principales liées aux flavonoïdes responsables de la réduction

### III.2. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR)

La spectroscopie FT-IR est largement utilisée pour l'identification des groupes fonctionnels présents dans les échantillons, à partir des positions caractéristiques des pics dans le spectre infrarouge, généralement compris entre 4000 et 400  $\text{cm}^{-1}$ . Cette technique permet également d'obtenir des informations précieuses sur l'encapsulation, la réduction et la stabilisation des nanoparticules. (Figure.2.a)

Par exemple, Ahmed et al. (**Ahmed et al., 2019**) ont analysé des nanoparticules de cuivre (CuNPs) synthétisées à partir de la solution de chlorure de cuivre ( $\text{CuCl}$ ) et de l'extrait de feuilles de *Camellia sinensis*. Le spectre FT-IR a révélé plusieurs pics caractéristiques : une bande large à 3306  $\text{cm}^{-1}$  attribuée à l'élongation des groupes hydroxyles (OH) présents dans les polyphénols, un pic à 1621  $\text{cm}^{-1}$  correspondant aux vibrations d'étirement des phénols aromatiques, et un autre à 1041  $\text{cm}^{-1}$  dû aux vibrations des liaisons C–O des alcools et groupes carboxyliques. Ces signaux confirment la présence de biomolécules responsables de la réduction et de la stabilisation des CuNPs.

Ont étudié les nanoparticules de cuivre obtenues par l'extrait de graines de *Persea americana* afin d'identifier les groupes fonctionnels intervenant dans leur stabilisation. Les pics identifiés dans le spectre FTIR de l'extrait de graines se trouvent à 3250  $\text{cm}^{-1}$  (élongation O–H des acides carboxyliques), 2920  $\text{cm}^{-1}$  (élongation symétrique H–C–H des alcanes), 1618  $\text{cm}^{-1}$  (élongation C–C–C des alcènes), et 1310  $\text{cm}^{-1}$ . Un spectre similaire pour les CuNPs synthétisées montre des bandes à 3356,14  $\text{cm}^{-1}$ , 1604,77  $\text{cm}^{-1}$ , 1442,75  $\text{cm}^{-1}$  et 1282,66  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant respectivement aux vibrations d'élongation O–H, C–C–C, H–C–H et C–O (esters). (**Rajeshkumar & Rinitha., 2018**)

Dans une autre étude, Muhammad et al. (**Muhammad et al., 2019**) ont analysé par FT-IR des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnONPs) biosynthétisées à l'aide d'un extrait aqueux de *Papaver somniferum* L. (Figure.2.b). Le spectre présente une large bande à 3380  $\text{cm}^{-1}$  correspondant à l'élongation O–H des amides, un pic à 2370  $\text{cm}^{-1}$  associé à l'eau de cristallisation, ainsi que des pics à 1652  $\text{cm}^{-1}$  (élongation C=C des alcènes), 1520  $\text{cm}^{-1}$ , 1387  $\text{cm}^{-1}$ , 1012  $\text{cm}^{-1}$  (C–N et vibrations de flexion C–H), 885  $\text{cm}^{-1}$  et un faible pic à 664  $\text{cm}^{-1}$  indiquant la présence de chlorure d'alkyle et la phase hexagonale de ZnO.

Enfin, Aini et al. (Nurul Aini et al., 2019) ont rapporté l'analyse FT-IR de nanoparticules d'argent (AgNPs) synthétisées à partir d'extraits d'Ageratum conyzoides et de Mikania micrantha. Dans les deux cas, les spectres des AgNPs présentent des bandes à  $2960\text{ cm}^{-1}$  (groupes C=C aromatiques),  $2330\text{ cm}^{-1}$  (groupes nitriles  $-\text{C}\equiv\text{N}$ ),  $1612\text{ cm}^{-1}$  (étirement C=O), et  $1180\text{ cm}^{-1}$  (groupes C–O–C ou C–OH), indiquant la présence de groupes fonctionnels impliqués dans la réduction et la stabilisation, fortement dépendants des agents réducteurs et des conditions de synthèse.

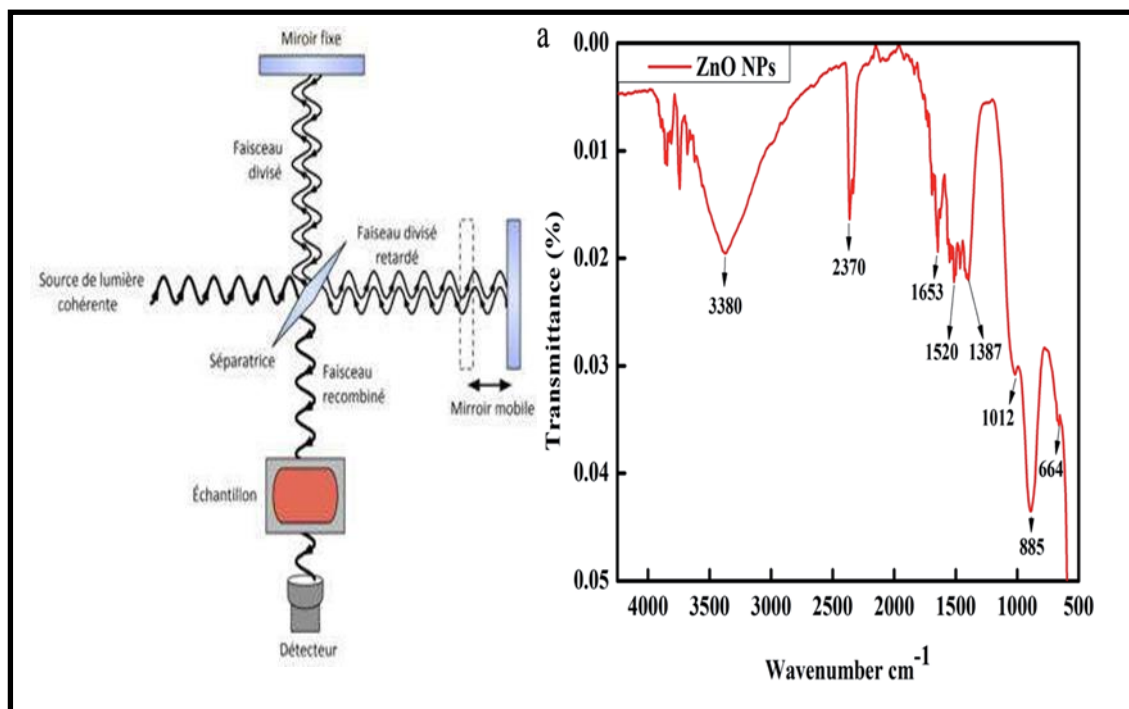


Figure.4 : Principe de la spectroscopie FT-IR b) Spectre FT-IR des ZnONP

biosynthétique utilisant un extrait de plante *P. somniferum*

### III.3. Diffraction des Rayons X (XRD)

La diffraction des rayons X (XRD) est l'une des techniques les plus utilisées pour la caractérisation structurale des nanoparticules. Elle fournit des informations sur la structure cristalline, la nature des phases présentes, les paramètres de maille et la taille cristalline moyenne. Cette dernière peut être estimée à l'aide de l'équation de Scherrer, en analysant l'élargissement du pic le plus intense dans le diffractogramme d'un échantillon donné. Un des avantages majeurs de la XRD, souvent appliquée à des échantillons sous forme de poudre obtenus après séchage des suspensions colloïdales, réside dans sa capacité à fournir des données statistiques moyennes à l'échelle volumique.

La composition des nanoparticules peut être déterminée en comparant les positions et les intensités des pics observés avec les modèles de référence issus de la base de données de

l'International Centre for Diffraction Data (ICDD, anciennement JCPDS). Toutefois, cette technique est peu adaptée aux matériaux amorphes et présente une résolution limitée pour les particules de taille inférieure à 3 nm. L'analyse consiste à exposer un échantillon cristallin ou en poudre à un faisceau de rayons X de longueur d'onde fixe, l'intensité des rayons diffusés étant ensuite mesurée à l'aide d'un goniomètre (**Aziz et al., 2015**).

Les données obtenues sont exploitées selon l'équation de Bragg :

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (2)$$

Où  $n$  est un entier,  $\lambda$  la longueur d'onde,  $d$  la distance interplanaire et  $\theta$  l'angle d'incidence du faisceau.

Pour les nanoparticules métalliques, la présence de pics larges est fréquente. Ces élargissements permettent d'estimer la taille cristalline via l'équation de Debye-Scherrer :

$$d = k\lambda / (\beta \cos \theta) \quad (3)$$

Où  $k$  est le facteur de forme,  $\lambda$  la longueur d'onde,  $\beta$  la largeur à mi-hauteur (FWHM), et  $\theta$  l'angle de Bragg. (Figure.4)

Dans l'étude de Lima et al. (**Vanin dos Santos Lima et al., 2022**), un extrait aqueux de *Ilex paraguariensis* a été utilisé pour la biosynthèse d'AgNPs à température ambiante. Les pics caractéristiques à  $38^\circ$ ,  $44^\circ$ , et  $64,4^\circ$ , correspondant aux plans (111), (200) et (220), ont confirmé la structure cubique à faces centrées (fcc) des AgNPs, avec des tailles variant entre 34 et 144 nm.

Sebeia et al. (**Sebeia, Jabli & Ghith, 2019**) ont analysé la nature cristalline des nanoparticules d'oxyde de cuivre obtenues à partir d'un extrait de feuilles de *Nerium oleander*. Les pics enregistrés à  $2\theta = 21,80$  ;  $29,20$  ;  $35,40$  ;  $38,60$  ;  $53,30$  ;  $56,10$  et  $66,0$  ont révélé notamment les plans (002) et (111), caractéristiques de la formation de nanoparticules CuO. La taille cristalline moyenne a été estimée à environ 21 nm.

#### **Autre études pour l'Oxyde de Zinc NPs**

Analyse des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO NPs) par diffraction des rayons X (XRD).

La diffraction des rayons X (XRD) est une technique clé permettant de confirmer la structure cristalline des ZnO NPs. Les pics caractéristiques observés dans le diffractogramme XRD sont généralement en accord avec la structure wurtzite hexagonale du ZnO.

Dans une étude menée par Sirelkhatim et al. (2015), les nanoparticules de ZnO synthétisées ont montré des pics de diffraction intenses à des angles  $2\theta$  correspondants aux plans cristallins (100), (002), (101), (102), (110), (103), et (112), typiques d'une phase hexagonale pure, conformément à la fiche JCPDS n° 36-1451. Cette correspondance confirme l'absence d'impuretés et la bonne cristallinité des nanoparticules.

La taille moyenne des cristallites peut être estimée à partir de la largeur à mi-hauteur des pics (FWHM) en utilisant la formule de Scherrer :

$$D = \frac{K \lambda}{\beta \cos \theta}$$

**Où :**

Est la taille moyenne du cristal,

Est une constante de forme (en général 0,9),

Est la longueur d'onde du rayonnement X (en général Cu  $K\alpha = 1,5406 \text{ \AA}$ ),

Est la largeur à mi-hauteur du pic (en radians),

Est l'angle de Bragg. (Sirelkhatim et al., 2015)

#### III.4. Spectroscopie à dispersion d'énergie (EDS/EDX)

La spectroscopie des rayons X à dispersion d'énergie (EDS ou EDX) est une technique analytique utilisée pour la caractérisation chimique des nanoparticules. Elle repose sur le principe fondamental selon lequel chaque élément du tableau périodique possède une structure électronique unique, produisant ainsi une réponse spectroscopique caractéristique lorsqu'il est excité par un rayonnement électromagnétique. Cette technique s'appuie sur l'interaction entre les rayons X et la matière pour identifier les éléments présents dans un échantillon.

Les mesures EDS/EDX, souvent associées à d'autres techniques, permettent de mieux comprendre les transformations structurales : depuis les précurseurs métalliques, en passant par la réduction atomique, la nucléation, l'agrégation des nanoparticules (NP), jusqu'à la formation de mésostructures. Par exemple, Rautela et al. (Rautela, Rani & Debnath., 2019) ont rapporté une étude sur des nanoparticules d'argent synthétisées à partir d'un extrait de graines de *Tectona grandis*, où la cartographie élémentaire EDX a révélé une teneur de 94 % en argent et 6 % en oxydes.

Prerna et al. (Prerna et al., 2020) ont synthétisé avec succès des nanoparticules de ZnO dopées au nickel par la méthode sol-gel. Une analyse EDS a été réalisée pour déterminer la

composition élémentaire de l'échantillon. Le spectre a révélé des pics caractéristiques du zinc, du nickel et de l'oxygène, avec des pourcentages pondéraux respectifs de 70,28 %, 21,45 % et 8,27 %, confirmant la composition attendue.

Dans l'étude menée par Iqbal et al. (Iqbal et al., 2020), des nanoparticules d'oxyde de fer (IONPs) ont été analysées par EDX, révélant des pics intenses correspondant au fer et à l'oxygène. L'absence de tout autre signal dans le spectre EDX a confirmé la pureté des IONPs synthétisées biologiquement.

## IV .Techniques de microscopie

### IV.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La nanoscience et la nanotechnologie ont permis le développement de techniques de microscopie à très haute résolution, permettant une observation fine des nanomatériaux grâce à un faisceau d'électrons à haute énergie. La microscopie électronique à balayage (MEB) est principalement utilisée pour étudier la morphologie et la topographie des nanoparticules métalliques.

Dans cette technique, l'image est formée en balayant la surface de l'échantillon avec un faisceau d'électrons accélérés. Les électrons rétrodiffusés et secondaires sont collectés par des détecteurs pour former l'image finale. Le MEB permet une analyse détaillée de la forme, de la distribution granulométrique, de la rugosité de surface, ainsi que du degré d'agrégation, jusqu'à l'échelle nanométrique. Néanmoins, cette méthode ne permet pas d'accéder à la structure interne des particules. Le MEB peut être utilisé pour caractériser des nanoparticules d'une taille inférieure à 10 nm (Figure.5).

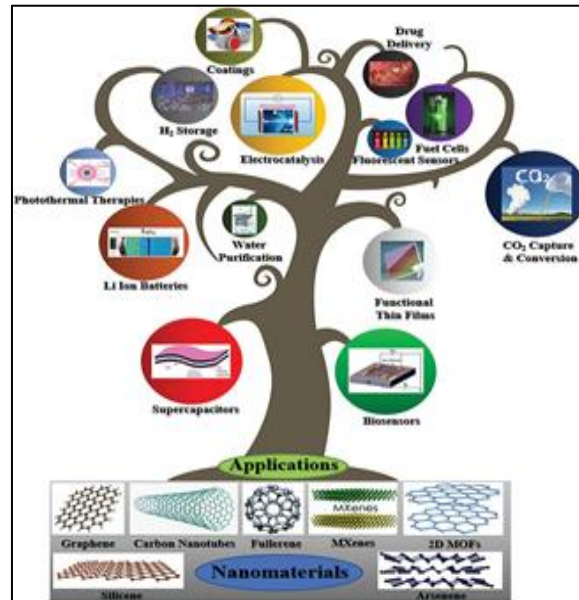
### IV.2. Microscopie électronique à transmission (MET)

La microscopie électronique à transmission (MET) est couramment utilisée pour déterminer la forme, la taille ainsi que la dispersion des nanoparticules métalliques. Les structures inférieures à 1  $\mu\text{m}$  échappent aux capacités de résolution de la microscopie optique en raison des limitations imposées par la diffraction. Les informations obtenues par MET dépendent de la résolution de l'instrument, elle-même liée principalement à la longueur d'onde du faisceau utilisé : plus cette dernière est courte, plus la résolution est élevée.

Le MET est considéré comme l'une des techniques les plus répandues pour la caractérisation des nanoparticules métalliques. L'appareil fonctionne de manière similaire à

un projecteur de diapositives, à la différence qu'il utilise un faisceau d'électrons (entre 100 et 300 kV) projeté à travers l'échantillon. L'image résultante est ensuite capturée sur un écran phosphorescent (Figure .6.a). Cette technique permet de recueillir des informations précises sur la topographie, la monodispersion, la composition et la cristallinité des échantillons.

- **Application de nanoparticules :**



**Figure .5: A schematic representation of nanomaterials and their applications (Baig et al., 2021)**

## V. Applications des nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnONPs)

Les oxydes métalliques nanostructurés ont suscité un intérêt croissant dans de nombreux secteurs technologiques. Parmi eux, l'oxyde de zinc (ZnO) a particulièrement attiré l'attention ces dernières années. Il s'agit d'une poudre amorphe jaune inorganique, considérée comme l'un des matériaux les plus prometteurs, largement employée dans la conception de dispositifs variés. Le ZnO se distingue notamment dans le domaine des dispositifs électroluminescents (LED), fonctionnant dans les courtes longueurs d'onde allant du bleu à l'ultraviolet, ainsi que dans les cellules solaires en tant que film conducteur transparent (**Minegishi et al., 1997**).

En outre, il trouve des applications notables dans les cellules solaires à points quantiques (QDSC) et dans les nano-générateurs sensibilisés aux colorants. Les nanoparticules d'oxyde de zinc, caractérisées par une forte ionicité, présentent des particularités remarquables, telles qu'une large surface spécifique, ainsi que des structures et tailles cristallines atypiques (**Basnet et al., 2018**). Ces nanoparticules font l'objet de

nombreuses recherches en raison de leurs propriétés antibactériennes, antifongiques, leur capacité à filtrer les UV, ainsi que leur forte activité catalytique et photochimique.

La synthèse des nanostructures de ZnO suscite ainsi un intérêt mondial. La diversité de ses propriétés physico-chimiques et la facilité avec laquelle ces nanostructures peuvent être obtenues font de l'oxyde de zinc un matériau de choix pour les chercheurs. Il joue un rôle clé dans un large éventail d'applications, dont certaines seront abordées ci-dessous

### V.1. Applications biomédicales des ZnO NPs

Les nanoparticules ont pour objectif principal d'interagir avec les macromolécules biologiques et les structures supramoléculaires cellulaires afin d'améliorer la santé humaine. Les nanostructures d'oxyde de zinc (ZnO) se distinguent dans ce domaine, notamment dans les systèmes d'administration de médicaments. Leur faible coût, leur faible toxicité et leur multifonctionnalité (anticancéreuse, antibactérienne, antioxydante, antidiabétique, anti-inflammatoire, bioimagerie) les rendent très prometteuses pour la biomédecine.

Selon Ferial Ghaemi et ses collaborateurs, divers nanomatériaux, dont les ZnONPs, jouent un rôle important dans la prévention, le diagnostic et le traitement de la COVID-19 (**Ghaemi et al., 2021**).

Sharma et al. ont démontré que les ZnONPs induisent une apoptose mitochondriale dans les cellules HepG2 (cancer du foie), en provoquant une cytotoxicité et génotoxicité accrues par production de ROS et libération de cytochrome c (**Sharma et al., 2012**).

Jiang et al. ont rapporté que les ZnONPs (~30 nm) tuent les bactéries comme E. coli par destruction directe de la membrane cellulaire (**Jiang et al., 2016**). Reddy et al. ont observé que les ZnONPs (~13 nm) inhibaient complètement E. coli à 3,4 mM et S. aureus à 1 mM (**Reddy et al., 2007**). De plus, Ohira et Yamamoto ont montré que les petites tailles cristallines des ZnONPs libèrent plus d'ions  $Zn^{2+}$ , ce qui augmente leur activité antibactérienne, notamment contre E. coli (**Ohira & Yamamoto., 2012**).

Kitture et al. ont évalué un conjugué ZnO-bois de santal rouge (RSW) pour son activité antidiabétique. Le conjugué a montré une inhibition enzymatique supérieure à celle des composants seuls, notamment contre l' $\alpha$ -glucosidase (61,93 %) (**Kitture et al., 2015**).

Enfin, Jiang et al. ont conçu des nanofeuilles de ZnO pour la bioimagerie. Ces structures ont montré une émission jaune-orange après pénétration dans les cellules leucémiques K562 irradiées aux UV, indiquant leur potentiel comme marqueurs fluorescents (**Jiang et al., 2011**).

## V.2. Applications agricoles :

Un large éventail de nanomatériaux et de structures à l'échelle nanométrique sont actuellement développés à des fins agricoles, notamment en tant que fertilisants, herbicides, pesticides, capteurs et agents améliorant la qualité, dans le but d'optimiser les pratiques agricoles conventionnelles (**Iavicoli et al., 2017**). Cependant, plusieurs facteurs tels que la dérive, la photolyse, l'hydrolyse, la dégradation microbienne et le lessivage entraînent des pertes considérables des produits agrochimiques appliqués aux cultures. Pour y remédier, les nanoparticules et les nano-capsules sont exploitées afin de réduire les effets secondaires et permettre une libération contrôlée, ciblée et efficace des fertilisants et pesticides (**Sabir et al., 2014**).

De plus, les nano-capteurs sont capables de détecter l'humidité ainsi que la teneur en éléments nutritifs dans le sol. Il a été démontré que les nanoparticules d'oxyde de zinc peuvent contribuer à améliorer la croissance et le rendement des cultures vivrières (**Prasad et al., 2012**).

Afin d'évaluer cet effet, deux essais en plein champ ont été réalisés par Elshayb et ses collaborateurs (**Elshayb et al., 2021**) durant les saisons agricoles de 2018 et 2019. Les ZnO NPs ont été appliquées comme engrais foliaires à des concentrations comprises entre 20 et 60 mg/L. Les résultats ont révélé qu'un mélange de ZnSO<sub>4</sub> et de ZnO NP à 40 mg/L a permis d'améliorer le rendement ainsi que l'absorption de nutriments (N, K, P et Zn) par rapport à l'utilisation traditionnelle du ZnSO<sub>4</sub> seul. Toutefois, un effet négatif sur l'absorption du phosphore a été observé avec l'usage des ZnO NPs. Par conséquent, une application foliaire combinant ZnO NPs et une faible quantité (40 ppm) de ZnSO<sub>4</sub> en traitement basal s'est avérée bénéfique, en induisant une amélioration des paramètres agronomiques et physiologiques, menant ainsi à une production plus élevée de riz enrichi en éléments nutritifs.

## V.3. Cosmétiques :

Dans le domaine cosmétique, les nanomatériaux sont utilisés sous diverses formes et types. Leur emploi présente plusieurs avantages notables, notamment une meilleure pénétration cutanée permettant une délivrance plus efficace des ingrédients actifs, une transparence accrue, l'introduction de nouvelles teintes et une durabilité prolongée des effets. L'objectif principal de l'intégration des nanomatériaux dans les produits cosmétiques est d'assurer une libération ciblée et durable des substances actives au niveau souhaité du corps, tout en garantissant leur stabilité à long terme (**Fytianos et al., 2020**).

Parmi les produits cosmétiques utilisant les nanomatériaux, on retrouve les écrans solaires formulés à base de nanoparticules capables d'absorber les rayons UV tout en neutralisant les radicaux libres générés par l'exposition aux lampes UV, les soins dentaires, les colorations capillaires longue tenue enrichies en nanotubes de carbone, ainsi que les crèmes anti-âge contenant des ingrédients actifs encapsulés dans des nanoparticules de polymères synthétiques qui améliorent la perméabilité de la peau (**Mihiranyan et al., 2012**).

Par ailleurs, les nanoparticules d'oxyde de zinc ont démontré leur efficacité en apportant une meilleure texture, une diffusion optimisée et un facteur de protection solaire (FPS) accru, ce qui les rend particulièrement prisées dans l'industrie cosmétique (**Raj et al., 2012**).

#### **V.4. Emballage des aliments**

Étant donné que le zinc est un oligo-élément essentiel, l'oxyde de zinc figure actuellement sur la liste des substances généralement reconnues comme sûres (GRAS) par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, et il est utilisé comme additif alimentaire. Les matériaux nanométriques peuvent être employés dans l'emballage alimentaire en tant que barrières, pour leurs propriétés mécaniques, la détection des agents pathogènes, ainsi que dans les emballages intelligents et actifs, apportant des bénéfices en termes de sécurité et de qualité des denrées alimentaires (**Brody et al., 2008**).

Dans le but de conférer une activité antimicrobienne aux matériaux d'emballage, des nanoparticules d'oxyde de zinc ont été intégrées dans des matrices polymériques, ce qui a permis d'améliorer les caractéristiques de l'emballage. Cette efficacité repose principalement sur trois mécanismes: la libération d'ions antimicrobiens, l'altération de l'intégrité des membranes cellulaires bactériennes, et la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) sous l'effet de la lumière autant de facteurs qui contribuent à l'amélioration de la qualité de l'emballage alimentaire (**Espitia et al., 2012**).

Aswathy Jayakumar et collaborateurs ont développé des films à base d'amidon et de PVA sensibles au pH, incorporant de l'huile de muscade, des nanoparticules d'oxyde de zinc et un extrait de jamun. Ces films présentent une meilleure barrière à l'eau et aux UV, ainsi que des propriétés mécaniques et antimicrobiennes accrues (**Jayakumar et al., 2019**).

#### **V.5. Textile :**

L'oxyde de zinc est considéré comme l'un des matériaux les plus prometteurs pour le développement de textiles haute performance, en raison de ses propriétés multiples telles que

l'activité antimicrobienne, l'auto-nettoyage, la résistance au feu, l'isolation thermique, la protection contre les rayons UV, l'hydrophobicité, la conductivité électrique ainsi que la régulation de l'humidité dans les tissus (**Verbic et al., 2019**).

S. Kathirvelu et al. ont rapporté la synthèse et la caractérisation de nanoparticules de ZnO, ainsi que leur application sur des tissus en coton et en polyester en vue de renforcer leur protection contre les rayons ultraviolets (**Kathirvelu et al., 2009**). Des textiles en coton dotés de propriétés autonettoyantes ont été obtenus par dépôt de nanoparticules d'oxyde de zinc photocatalytiques sur la surface des fibres, en utilisant une méthode classique de trempage à sec. Selon les travaux de Chunhong Zhu et collaborateurs, l'efficacité de l'auto-nettoyage est directement liée à la concentration des nanoparticules d'oxyde de zinc : une teneur plus élevée entraîne une dégradation photolytique plus marquée (**Zhu et al., 2017**).

Par ailleurs, la solidité au lavage est fortement corrélée à l'adhésion des nanoparticules au tissu. Grâce à leur grande surface spécifique et leur forte énergie de surface, les nanoparticules présentent une excellente affinité avec les fibres textiles, ce qui contribue à améliorer la durabilité des propriétés fonctionnelles apportées aux tissus traités (**Wong et al., 2006**).

## **VI. Activités biologiques nanoparticules ZnO**

### **VI.1. Activités antibiofilmes bactériens**

Les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) présentent une activité antimicrobienne remarquable, s'exerçant contre un large éventail de microorganismes pathogènes. Leur efficacité repose sur plusieurs mécanismes d'action biologiques et physicochimiques, leur conférant une place prometteuse dans la lutte contre les infections.

En ce qui concerne l'activité antibactérienne, les ZnO-NPs se montrent particulièrement actives aussi bien contre les bactéries Gram-positives que Gram-négatives. Des études ont mis en évidence leur capacité à inhiber la croissance de souches pathogènes courantes telles que *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* (**Sirelkhatim et al., 2015 ; Raghupathi et al., 2011**). L'efficacité de ces nanoparticules dépend de divers facteurs, notamment leur taille, leur surface spécifique et leur capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables de dommages cellulaires irréversibles chez les microorganismes.

## VI.2. Activités antifongiques :

Par ailleurs, les nanoparticules d'oxyde de zinc possèdent également une activité antifongique notable, en particulier contre des levures pathogènes telles que *Candida albicans*, ainsi que d'autres espèces fongiques opportunistes (**Lipovsky et al., 2011**). Cette action antifongique repose sur plusieurs mécanismes synergiques.

Parmi ces mécanismes, on retrouve notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui entraînent un stress oxydatif important au sein des cellules fongiques. Ce stress provoque des altérations structurales de la membrane cellulaire, perturbant ainsi son intégrité et sa perméabilité. En outre, les ZnO-NPs peuvent interagir directement avec le matériel génétique (ADN) des micro-organismes, entraînant des dommages irréversibles qui inhibent leur croissance et leur viabilité (**Siddiqi et al., 2018**).

## VI.3. Applications biomédicales des ZnO-NPs

Les nanoparticules d'oxyde de zinc démontrent des capacités anticancéreuses significatives, caractérisées par une cytotoxicité sélective envers les cellules tumorales. Ce ciblage repose principalement sur l'induction de l'apoptose (mort cellulaire programmée) et la génération de stress oxydatif, sans affecter de manière significative les cellules saines. Ces effets ont été confirmés par plusieurs études qui soulignent le potentiel thérapeutique des ZnO-NPs dans le traitement du cancer (**Akhtar et al., 2012 ; Vinardell & Mitjans, 2015**).

D'autre part, ces nanoparticules peuvent être utilisées comme vecteurs de médicaments, permettant une amélioration de la biodisponibilité des agents thérapeutiques, ainsi qu'un contrôle plus précis de leur libération dans l'organisme. Cela permet d'optimiser l'efficacité des traitements tout en réduisant les effets secondaires (**Mishra et al., 2017**).

Les ZnO-NPs jouent un rôle prometteur dans le domaine de la cicatrisation des plaies, en favorisant la régénération des tissus endommagés et en empêchant les infections microbiennes secondaires. Leur activité antimicrobienne combinée à leur effet stimulant sur la prolifération cellulaire contribue à accélérer le processus de guérison (**Verma et al., 2018**).

## VI.4. Activités antibactériennes des nanoparticules de ZnO

Les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) présentent des propriétés antibactériennes remarquables qui ont été largement étudiées. Voici une analyse détaillée de ces propriétés :

- **Mécanismes d'action antibactérienne**

**1. Production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

-Les ZnO-NPs génèrent des ROS comme le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), les radicaux superoxydes ( $O_2^-$ ), et les radicaux hydroxyles ( $OH\cdot$ ) sous illumination UV ou même en conditions ambiantes (**Padmavathy & Vijayaraghavan., 2008**)

-Ces ROS endommagent les membranes cellulaires bactériennes, provoquent des dommages à l'ADN et aux protéines, menant à la mort cellulaire (**Sirelkhatim et al., 2015**).

**2. Libération d'ions  $Zn^{2+}$** 

-Les ZnO-NPs libèrent des ions  $Zn^{2+}$  qui peuvent perturber le métabolisme bactérien et inhiber les enzymes essentielles (**Pasquet et al., 2014**).

-L'accumulation d'ions  $Zn^{2+}$  dans le cytoplasme bactérien affecte la perméabilité membranaire (**Li et al., 2011**).

**3. Interaction directe avec la paroi cellulaire**

-Les ZnO-NPs peuvent adhérer à la surface des bactéries en raison d'interactions électrostatiques, causant des dommages structurels (**Xie et al., 2011**).

-Elles peuvent pénétrer la membrane cellulaire et s'accumuler dans le cytoplasme, perturbant les processus cellulaires (**Raghupathi et al., 2011**).

**4. Effet abrasif mécanique**

- Les nanoparticules peuvent exercer un effet abrasif sur la surface cellulaire bactérienne, contribuant à l'endommagement de la paroi cellulaire (**Zhang et al., 2010**).

**VI.5. Activités anti-diabétiques des nanoparticules ZnO**

Les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) présentent un potentiel intéressant dans la gestion du diabète, avec plusieurs mécanismes d'action contribuant à leurs effets anti-diabétiques.

- **Mécanismes d'action anti-diabétique**

### **1 .Amélioration de la sensibilité à l'insuline**

Les ZnO-NPs peuvent améliorer la signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation des récepteurs à l'insuline et des substrats de récepteurs à l'insuline (IRS) (Umrani & Paknikar., 2014).

Amélioration de la voie de signalisation PI3K/Akt impliquée dans la transduction du signal insulinique (Alkaladi et al., 2014).

### **2 .Modulation du métabolisme du glucose**

Influence sur l'expression des transporteurs de glucose GLUT-4, facilitant l'absorption du glucose par les tissus périphériques (Nazarizadeh & Asri-Rezaie., 2016).

Stimulation de l'activité des enzymes glycolytiques et inhibition des enzymes gluconéogéniques dans le foie (Hussain et al., 2016).

### **3 .Protection des cellules $\beta$ pancréatiques**

Réduction du stress oxydatif dans les cellules  $\beta$  pancréatiques via leurs propriétés antioxydantes (Rehman et al., 2019).

Prévention de l'apoptose des cellules  $\beta$  induite par les cytokines inflammatoires (El-Kordy & Alshahrani., 2015).

Promotion de la prolifération et de la régénération des cellules  $\beta$  endommagées (Hussein et al., 2014).

### **4 .Effets anti-inflammatoires**

Diminution des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) impliquées dans la résistance à l'insuline (Ranasinghe et al., 2015).

Modulation des voies de signalisation inflammatoires comme NF- $\kappa$ B et JNK (Thiruvengadam et al., 2015).

**CHAPITRE II**  
**PUNICA**  
**GRANATUM L**

### I.1.Origine géographique et germination de la grenade

Le grenadier (*Punica granatum L.*), originaire d'une vaste région allant de l'Iran au nord de l'Inde (Morton., 1987) , est une plante fruitière ancienne dont la domestication remonte à la préhistoire, probablement vers le Néolithique . Des populations sauvages subsistent encore dans cette aire, notamment en Iran, Turkménistan, et Asie centrale, ce qui atteste de son origine autochtone dans ces régions (Mars, 2000).

G. Levin propose une structure hiérarchique de l'origine et de la diversité de la grenade comprenant : un mégacentre primaire : Moyen-Orient (Iran, Azerbaïdjan, Afghanistan), des mégacentres secondaires : Méditerranée et Asie de l'Est,et cinq macrocentres : Moyen-Orient, Méditerranée, Asie de l'Est, Amérique, et Afrique du Sud (Levin, 2006).

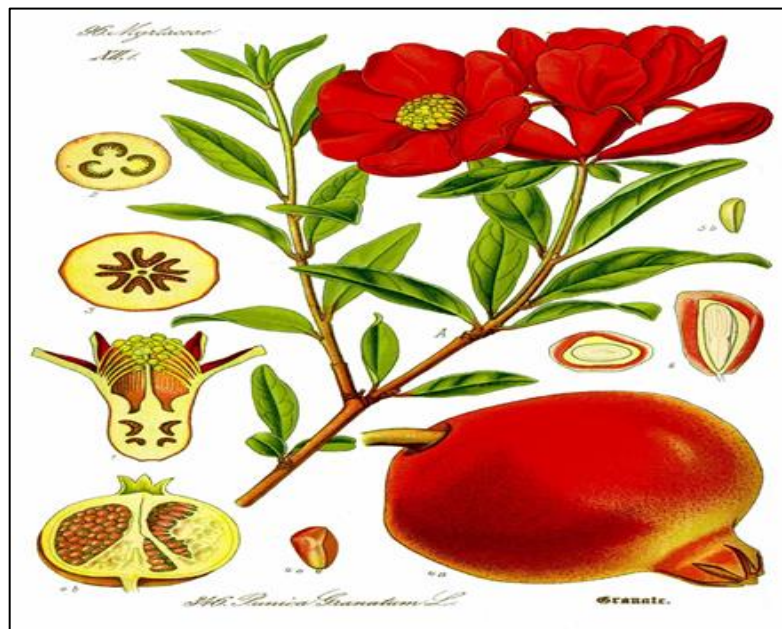







Figure .1 : Le grenadier, *Punica granatum L.*

Tableau.1: Variétés principales de grenade à l'échelle mondiale et en Algérie (Betoui, 2017)

Variétés de grenade	Photos	Caractéristiques
Sefri		Couleur : jaune à rose Arilles : rose clair – doux
Kabylie		Couleur : rose Arilles : violacé-doux
Shani		Couleur : rouge Arilles : rouge foncé – doux
Hicas		Couleur : rouge Arilles : rouge clair – Doux /acide
Acco		Couleur : rouge Arilles : rouge foncé – doux

## I.2. Compositions biochimiques majeures

Le jus de grenade est considéré parmi les jus les plus riches en sucres (glucose, fructose et saccharose) et en antioxydants flavonoïdiques puissants, qui lui confèrent sa couleur éclatante, augmentant en intensité au cours de la maturation (Lansky & Newman., 2007). Aussi il est considéré comme une source importante d'anthocyanines tels que : 3-glucoside, 3,5-diglucoside de delphinidine, cyanidine, et pelargonidine (Alighourchi, Barzegar, & Abbasi, 2008). Il est de même riche en vitamines : vitamine C, vitamine E et  $\beta$ -carotène et en polyphénols : catéchine, acide éllagique, acide gallique et éllagitannins (Okonogi, et al, 2007) (Çam, Hisil, & Durmaz, 2009); En outre, des acides organiques tels que l'acide citrique,

l'acide malique et l'acide ascorbique S'y trouvent en quantités non négligeables (Gil, et al, 2000).

### I.2.1 Sucres

Les sucres, à l'instar des polyphénols, constituent l'un des composants majeurs du jus de grenade. Leur teneur varie selon plusieurs facteurs : la variété de la plante, les conditions de culture, la nature du sol, ainsi que l'âge de l'arbre (Evreinoff, 1957). Globalement, la concentration en sucres dans les grenades se situe entre 4,4 % et 22 %.

Les principaux glucides présents dans le jus de grenadier sont des monosaccharides, principalement le glucose et le fructose, ce dernier étant souvent en concentration légèrement inférieure. On retrouve également, bien que dans des proportions moindres, des polysaccharides tels que le saccharose et l'amidon (Legua, et al., 2000). La teneur en ces différents sucres évolue avec le degré de maturation des fruits (Zarei, et al., 2011).

### I.2.2 Protéines

La teneur en protéines du jus de grenadier varie en fonction de plusieurs facteurs, notamment le génotype, les conditions climatiques et le milieu de culture. Les concentrations observées oscillent entre 0,29 % et 1,23 % (Fadavi, et al., 2005).

La maturation des fruits exerce peu d'influence sur cette teneur, avec une variation ne dépassant pas 0,06 g/L entre la nouaison et le stade de maturité complète (El-Nemr, Ismail, & Ragab, 1990). Par ailleurs, l'analyse biochimique des arilles de grenadier révèle une teneur protéique bien plus élevée, atteignant 13,2 % (El-Nemr, Ismail, & Ragab, 1990).

### I.2.3 Acides organiques

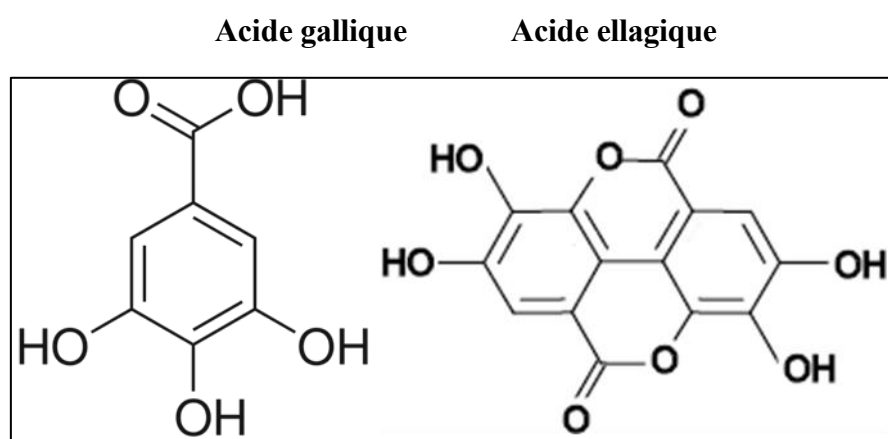
Les principaux acides organiques du jus de grenade sont l'acide citrique et l'acide malique. Le jus de grenade contient également de l'acide ascorbique, de l'acide fumarique, de l'acide oxalique, de l'acide quinique, de l'acide succinique et de l'acide tartrique, dont certains ont également été identifiés dans les tissus de feuilles, de l'épicarpe de fruits et d'arilles (Mena, Calani, et al., 2012). La quantité de ces acides est variable selon la variété et les conditions du milieu de culture ; le Tableau 4 suivant montre les différentes concentrations de ces composés dans le jus de grenadier.

**Tableau.2:** Composition du jus de grenades en acides organiques (mg/100 g de la partie comestible du fruit) (Melgarejo, Salazar, & Artés., 2000)

Composé	mg/100 g d'arilles
Acide citrique	0,09- 0,32
Acide malique	0,01- 0,07
Acide oxalique	0,10- 0,21
Acide tartrique	0,01- 0,05
Acide fumarique	0,01

### I.2.4 Acides phénoliques

Les acides phénoliques désignent une catégorie de composés organiques caractérisés par la présence d'au moins un groupement carboxyle et un hydroxyle de type phénolique. En phytochimie, cette appellation est spécifiquement réservée aux dérivés des acides benzoïque (structure C6-C1) et cinnamique (structure C6-C3) (Belyagoubi & Benhammou., 2011). Ces composés peuvent exister sous différentes formes dans diverses plantes agricoles et médicinales, notamment les acides p-coumarique, caféique, férulique, sinapique, p-hydroxybenzoïque, protocatéchique, vanillique, gallique, salicylique et gentsique. Dans le jus de grenade, les principaux acides phénoliques identifiés sont l'acide gallique et l'acide ellagique



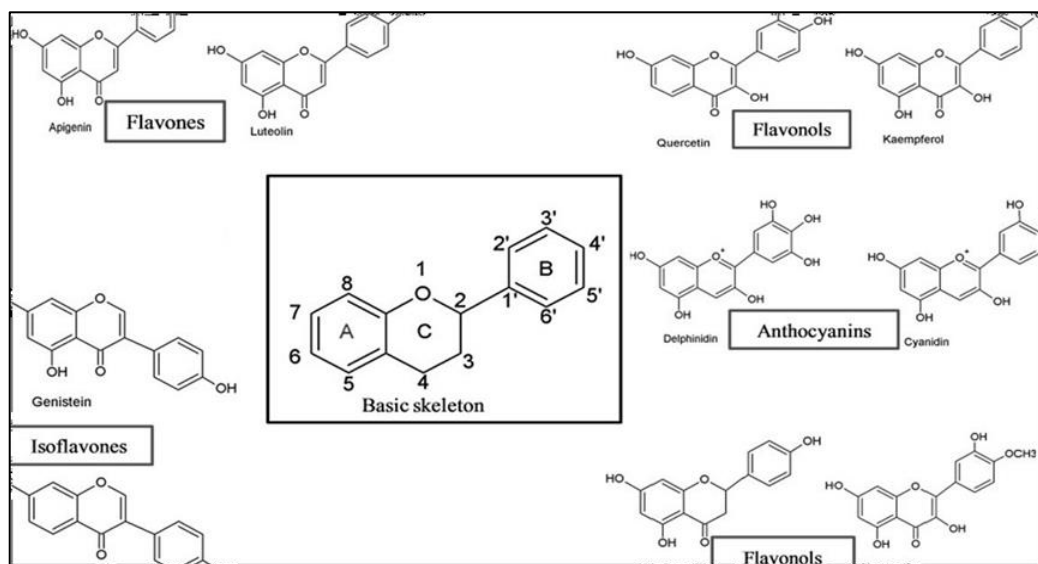
**Figure .2 :** Structure des principaux acides phénoliques des grenades

### I.2.5 Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols complexes dérivés du noyau flavone (ou 2-phénylchromone), caractérisés par la présence de groupes fonctionnels de type phénols libres, éthers ou glycosides. Leur structure de base comporte deux noyaux aromatiques (A et B)

reliés par un hétérocycle oxygéné (cycle C), formant un squelette commun de quinze atomes de carbone de type C6-C3-C6 (**Benguerba., 2008**). À ce jour, plus de 4000 flavonoïdes ont été identifiés. Ils partagent une origine biosynthétique commune à partir du précurseur 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (**Benguerba., 2008**). On les retrouve largement répartis dans le règne végétal, localisés dans diverses parties des plantes supérieures : racines, tiges, feuilles, fleurs, pollen, fruits, arilles, bois, etc. Leur concentration et leur nature varient en fonction de l'espèce végétale et du stade de développement (**Akroum., 2011**).

Les flavonoïdes sont généralement des pigments hydrosolubles, présents soit sous forme d'hétérosides dissous dans la vacuole, soit comme constituants des chromoplastes. Ils jouent plusieurs rôles essentiels dans la physiologie des plantes, notamment : la pigmentation des organes, la protection contre les rayonnements UV, la défense contre les herbivores, l'attraction des pollinisateurs et la régulation de la croissance (**Hepaksoy, Aksoy, Can, & Ui., 2000**). Sur le plan chimique, les flavonoïdes se divisent en plusieurs classes : flavones, flavonols, flavanones et anthocyanes. Leurs propriétés varient selon leur classe mais aussi selon leur degré d'hydroxylation, de méthyoxylation, de glycosylation et de polymérisation. Parmi les nombreux pigments dérivants de cette structure des flavonoïdes, il convient de citer



**Figure .3 :** Squelette de base de différentes classes des flavonoïdes

- **notamment :**

- **Flavonols (hydroxy-3 flavone)**

Ce sont des composés largement répandus et incolores, ils sont caractérisés par la présence d'un carbonyle en position 4 et d'un groupement hydroxyle en position 3. Les flavonols qui possèdent en plus des hydroxydes en carbone 6 ou 8 colorent certaines fleurs en jaune primevère (Bessas, 2008). Parmi les flavonols répandus, nous trouvons le kaempférol (OH en 4',5, 7), le quercétol (OH en 3', 4', 5,7), le myricétol, quercitrine, épicatechine, catéchine et l'isorhamétol. Les flavonols les plus trouvés dans les jus de grenades sont la quercétine (0.23- 4.58 g/L) et la catéchine (0.06-8.44 g/L) (Poyrazoğlu, et al., 2002) .

- **Flavones:**

Les flavones sont une classe de flavonoïdes dont la structure est basée sur le squelette de la 2-phénylchromène-4-one (ou 2-phényl-1-benzopyran-4-one). Cette structure comprend deux cycles benzéniques (A et B) reliés par un cycle  $\gamma$ -pyrone (Jiang, Doseff, & Erich., 2016).

Tout comme les flavonols, les flavones sont des pigments naturels, généralement de couleur allant du blanc au jaune. La principale différence entre flavones et flavonols réside dans la présence d'un groupement hydroxyle en position 3 chez les flavonols, absent chez les flavones (Vrielynck., 1996). Chez le grenadier, les flavones ont été identifiées principalement dans les feuilles, notamment sous forme de lutéoline et d'apigénine (Van Elswijk, et al., 2004) noyau central C6-C3-C6.

- **Flavanones:**

Les flavanones constituent l'une des principales classes de flavonoïdes, avec environ 350 formes aglycones et 100 formes glycosylées identifiées à ce jour. Elles sont issues d'une hydrogénation en positions 2 et 3 des flavones. Leur structure repose sur le squelette typique des flavonoïdes, composé de deux cycles aromatiques (A et B) reliés par un cycle dihydropyrone (C) (Barreca, et al., 2017).

Les flavanones se distinguent des autres flavonoïdes par l'absence de double liaison entre les carbones C2 et C3, ainsi que par la présence d'un carbone chiral en position C2, conférant des caractéristiques structurales particulières à cette classe (Barreca, et al., 2017). Sur le plan organoleptique, les flavanones sont responsables de l'amertume caractéristique de certains agrumes tels que le pamplemousse, le citron et l'orange. Parmi les principaux

composés de cette classe figurent l'hespérétine, la naringénine, l'ériodictyol, l'isosakuranétine, ainsi que leurs formes glycosylées (Janne, et al., 2004). Chez le grenadier (*Punica granatum*), la naringénine est la flavanone prédominante (Fletcher, et al, 1992).

### I.2.6 Tanins

Les tanins sont des composés polyphénoliques naturels, de poids moléculaire élevé, à saveur astringente, capables de tanner l'épicarpe des fruits en se fixant sur les protéines, rendant cette dernière dure et imputrescible (Biaye., 2002). On les trouve dans de nombreux végétaux comme les écorces d'arbres et divers fruits (raisins, grenades, dattes, café, cacao). Leur structure complexe est formée d'unités monomériques répétitives, variant par leurs centres asymétriques et leur degré d'oxydation (Hemingway.,1992). On distingue deux principaux types de tanins : les tanins condensés ou proanthocyanidines (présents dans le thé, les raisins, les gallotannins, etc.), et les tanins hydrosolubles comme les ellagitannins (trouvés dans des fruits tels que la framboise, la fraise, la grenade) et les gallotannins (Aguilar et al., 2008).

#### – Les tanins du grenadier

Les tanins hydrolysables, en particulier les ellagitannins et gallotannins, sont les composés les plus abondants dans différentes parties du grenadier . En revanche, les tanins condensés sont rarement rencontrés chez cette plante. Les ellagitannins se trouvent principalement dans le péricarpe, l'écorce, les graines et les fleurs (Tanaka et al., 1986 ; Wang et al., 2004, 2006a). Parmi eux, la punicaline et la punicalagine sont les constituants majeurs du péricarpe, également présents dans l'écorce, mais pratiquement absents dans les feuilles. Ces composés dérivent de l'acide ellagique, très présent dans toutes les parties du grenadier, avec une teneur allant jusqu'à 0,1 % dans les fleurs et 0,2 % dans le péricarpe et les feuilles.

La biosynthèse des ellagitannins suit une voie classique : l'acide hexahydroxydiphényldicarboxylique subit une lactonisation pour donner naissance à l'acide ellagique. Celui-ci peut ensuite être méthylé pour produire divers dérivés, tels que :

- acide 3-O-méthylellagique.
- acide 3,3'-di-O-méthylellagique.
- acide 4,4'-di-O-méthylellagique.

- acide 3,3',4'-tri-O-méthylellagique.
- acide 3-O-méthyl-3,4-méthylènedioxyellagique.

Ces dérivés peuvent ensuite se glycosyler avec des sucres pour former des glycosides. En parallèle, plusieurs unités d'acide hexahydroxy-diphényldicarboxylique peuvent se polymériser par estérification entre les groupes carboxyles d'un monomère et les groupes hydroxyles d'un autre (**Wang et al., 2006b**).

Les gallotannins, quant à eux, sont surtout localisés dans les feuilles et sont peu fréquents ailleurs dans la plante. Ils sont constitués de plusieurs unités galloyles, dérivant ainsi de l'acide gallique (**Li HX et al., 2002**). Leur biosynthèse implique également des réactions d'estérification, de lactonisation et de glycosylation, similaires à celles des ellagitannins (**Wang et al., 2006b**).

#### – Les alcaloïdes du grenadier

Les alcaloïdes sont principalement localisés dans l'écorce des tiges et des racines, ainsi que dans le jus de grenade. Deux grandes familles d'alcaloïdes ont été identifiées chez cette plante : les pipéridines et les pyrrolidines. Les pipéridines, caractérisées par un noyau à six chaînons, sont plus abondantes que les pyrrolidines, qui possèdent un noyau à cinq chaînons.

Les principales pipéridines présentes dans l'écorce de tige sont l'isopelletierine, la pseudopelletierine et la N-méthylisopelletierine. Quant à l'écorce de racine, elle contient majoritairement des composés tels que la 2-(2'-hydroxypropyl)- $\Delta^1$ -pipéridine, la 2-(2'-propenyl)- $\Delta^1$ -pipéridine et la norpseudopelletierine (**Neuhofer et al., 1993**).

#### – Triterpènes et stéroïdes

Les triterpènes non glycosylés sont fréquemment présents dans les fleurs et les graines du grenadier. Ces composés, tels que l'acide ursolique, l'acide oléanolique, l'acide maslinique, l'acide punicanolique, la friedéline, l'acide bétulinique et l'acide asiatique, apparaissent généralement sous forme de triterpénoïdes pentacycliques, caractérisés par un groupement carboxyle en position C-28 et une double liaison entre les carbones C-12 et C-13 (**Batta et Rangaswami, 1973 ; Ahmed et al., 1995 ; Krishna et al., 2002 ; Huang et al., 2005b**).

Les stéroïdes, en revanche, ne sont retrouvés que dans les graines. Ils comprennent des stérols tels que le cholestérol, le stigmastérol, le campestérol, le  $\beta$ -sitostérol et le daucostérol, ainsi que des stéroïdes sexuels comme le 17- $\alpha$ -œstradiol, l'estrone, la testostérone et l'estriol

(Heftmann et al., 1966 ; Dean et al., 1971 ; Abd El Wahab et al., 1998 ; Wang et al., 2004 ; Lansky et al., 2005 ; Xie et al., 2008).

### I.2.7. Applications pharmacologiques

De nos jours, la demande en grenade repose essentiellement sur son goût agréable. Cependant, des preuves scientifiques ont mis en évidence ses nombreuses activités thérapeutiques, notamment antiparasitaires, anti-inflammatoires, antioxydantes, antimicrobiennes, anticarcinogènes et anti-athérogènes. Ces effets bénéfiques sont en grande partie dus aux composés phénoliques, tanins, anthocyanines et autres phytoconstitués présents dans la plante, qui possèdent de puissantes propriétés antioxydantes.

Des recherches médicales ont démontré le potentiel thérapeutique des produits dérivés de la grenade. Les extraits de grenade sont aujourd'hui utilisés dans le diagnostic et le traitement de divers troubles comme le cancer, l'inflammation, le diabète, les lésions cutanées induites par les UV et les maladies cardiovasculaires. Les pelures de grenade contiennent des composés phytochimiques uniques tels que les gallotannins, l'acide ellagique, l'acide gallique, les punicalines et punicalagines (Ullmann et al., 2007).

Les phytoconstitués jouent un rôle protecteur contre les rayonnements UV, les pathogènes et les prédateurs herbivores ; ils sont qualifiés de composés non nutritifs produits par les plantes à des fins de défense. La grenade est consommée fraîche ou sous forme transformée (jus, vins, arômes, extraits). Le jus de grenade commercial affiche une activité antioxydante supérieure à celle des autres jus de fruits, du vin rouge et du thé vert, ce qui en fait un produit très recherché sur le marché agroalimentaire.

Les composés phénoliques, en particulier les flavonoïdes, anthocyanines et tanins, constituent le groupe principal de phytoconstitués antioxydants, avec des propriétés biologiques intéressantes et une forte capacité à piéger les radicaux libres (Ullmann et al., 2007).

Les produits dérivés de la grenade présentent un grand intérêt thérapeutique grâce à leurs composés phénoliques tels que les tanins, anthocyanines et flavonoïdes, connus pour leurs propriétés antioxydantes puissantes (Ullmann et al., 2007). Ces substances contribuent à des effets anti-inflammatoires, anticancéreux, antimicrobiens, antiparasitaires et cardioprotecteurs. Les extraits de grenade, notamment ceux de la pelure riche en gallotannins et acides phénoliques, sont utilisés dans la prévention et le traitement de maladies chroniques, telles que le cancer, le diabète, les troubles cardiovasculaires et les lésions cutanées induites

par les UV. Le jus de grenade, en particulier, se distingue par sa très forte activité antioxydante, supérieure à celle du vin rouge ou du thé vert, ce qui en fait un produit de valeur commerciale élevée dans le secteur agroalimentaire (Ullmann et al., 2007).

– **Activité antimicrobienne de la grenade**

Les extraits méthanoliques de pelures de grenade ont démontré une forte activité antimicrobienne contre diverses souches bactériennes telles que *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Listeria monocytogenes*, grâce à la richesse en composés phénoliques et ce, tant in vitro qu'in vivo (Al-Zoreky, 2009).

Par ailleurs, la combinaison de polyphénols issus du jus et du fruit de grenade s'est révélée efficace contre les infections virales d'origine alimentaire. En l'absence de norovirus humains cultivables, des virus substitués comme MS2 (bactériophage à ARN simple brin), norovirus murin (MNV-1) et calicivirus félin (FCV-F9) ont été utilisés, avec des résultats très prometteurs : les polyphénols ont permis une réduction significative de ces virus alimentaires (Aad et al., 2010).

Des études récentes indiquent que la punicalagine, un composé actif majeur, possède une activité antivirale puissante, notamment anti-grippale. De plus, des effets synergiques ont été observés lors de l'association d'extraits polyphénoliques avec l'oseltamivir, conduisant à une meilleure efficacité clinique, moins d'effets secondaires et une toxicité réduite, tout en étant économique (Haidari, Ali, Casscells, & Madjid., 2009).

Enfin, les fractions hexaniques extraites des tiges de grenade ont présenté une forte activité antifongique (March & Olsen., 2010).

– **Activité antioxydante**

L'activité antioxydante de la grenade a été l'un des sujets les plus étudiés au cours des dernières décennies, en raison de son rôle fondamental dans plusieurs effets bénéfiques : régulation lipidique, activité anti-inflammatoire, anti-tumorale et antidiabétique (Lansky et al., 2007). Les substances antioxydantes se trouvent principalement dans les feuilles et les fruits, incluant les graines, le jus et le péricarpe.

Il a été démontré que le jus et l'extrait aqueux des feuilles neutralisent efficacement les radicaux libres (ROS, RNS, superoxyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, radicaux hydroxyles, NO), avec une efficacité supérieure à celle d'autres fruits (Halvorsen et al., 2002 ; Xu et al., 2005 ; Gurpreet et al.,

2006 ; Guo et al., 2007). De plus, le jus inhibe la production de LDL oxydé in vitro (Fuhrman & Aviram., 2001) et réduit ses niveaux chez les rats in vivo (Xu et al., 2005).

Les composés responsables de cette activité sont principalement les composés phénoliques (groupes hydroxyles phénoliques et doubles liaisons) tels que les tanins, flavonoïdes et acides gras insaturés. Une corrélation linéaire significative a été observée entre la capacité antioxydante totale et la teneur en composés phénoliques, soulignant leur rôle clé (Surveswaran et al., 2007).

Les tanins, présents dans presque toutes les parties de la grenade, contiennent des groupes galloyles et hexahydroxydiphényles capables de fournir des protons et de former des radicaux stables (Wang et al., 2005). Le groupe hexahydroxydiphényl est plus puissant que le groupe galloyle (Wei et al., 2000). La nature des liaisons entre les monomères de tanins (hydrolysables vs condensés) influence fortement leur pouvoir antioxydant. Les tanins avec des groupes hydroxyles libres sont plus efficaces, comme le montre l'exemple des dérivés méthylés de l'acide ellagique (Wang et al., 2004). Deux tanins majeurs : l'acide ellagique antioxydant puissant par chélation des ions métalliques (Oswa et al., 1987) et la punicalagine, principale molécule active du péricarpe et du jus, inhibant la peroxydation lipidique (Anand et al., 2004 ; Lansky et al., 2007). Cependant, la punicalagine est peu absorbée dans la circulation sanguine, et ses métabolites microbiens sont ceux détectés (Kulkarni et al., 2004).

Les flavonoïdes de la grenade participent aussi fortement à cette activité par élimination des radicaux libres (Wang et al., 2006b ; Suo et al., 2009). Chez les rats, leur administration orale réduit les peroxydes lipidiques et augmente les enzymes antioxydantes (Sudheesh & Vijayalakshmi, 2005). Des composés comme la catéchine, la quercétine, le kaempférol et l'équol exercent aussi un effet photoprotecteur contre les dommages cutanés induits par les UVB (Park et al., 2010). Les groupes hydroxyles phénoliques situés en C-5/C-7 ou en position ortho sur l'anneau B (comme dans la lutéoline ou la pélargonidine) jouent un rôle central (Noda et al., 2002).

D'autres composés comme les lignanes (ex. : coniféryle et sinapyle glycosylés – Wang et al., 2004) et les acides gras insaturés (Elgareo et al., 1995) contribuent également. L'effet antioxydant est donc dû à une synergie multifactorielle entre plusieurs familles de composés (Seeram et al., 2005)

Différents extraits de grenade (écorce, jus, graines) présentent une forte activité antioxydante grâce à leur richesse en composés phénoliques et flavonoïdes, démontrée par les

méthodes ABTS et DPPH, ainsi que par le test de réduction du fer (**Devatkal, Narsaiah, & Borah, 2010**)(**Johnston et al., 2009**). Même les sous-produits cuits et la poudre d'écorce crue montrent une efficacité notable, notamment pour ralentir l'oxydation lipidique dans la viande de chèvre (**Devatkal, Narsaiah, & Borah, 2010**). Les tanins comme l'acide ellagique et les punicalagines, bien absorbés dans l'organisme, jouent un rôle clé. De plus, les urolithines, métabolites dérivés, possèdent une activité antioxydante liée à leur nombre de groupes hydroxyles et leur lipophilie (**Johnston et al., 2009**).

#### – Effet antihypertenseur de la grenade

Les polyphénols présents dans la grenade, notamment dans son jus, sont les principaux agents responsables de son activité antihypertensive. Ils permettent de réduire l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA) de 36 % et la pression artérielle systolique de 5 % (**Xu et al. 2005 ; Wang et al. 2008**). Une étude clinique a démontré qu'une consommation quotidienne de 50 ml de jus de grenade réduit l'épaisseur intima-média de la carotide et la pression artérielle (**Aviram et al. 2004**). Des composés comme la punicalagine stimulent la production de NO, un vasodilatateur endogène (**Li et Frostermann 2000 ; Ignarro et al. 2006 ; de Nigris et al. 2007**). De plus, l'extrait de péricarpe protège les cellules endothéliales du stress oxydatif, renforçant ainsi cet effet (**Li YF et al., 2006**).

#### – Activité antivirale

Les tanins, principaux polyphénols de la grenade, exercent une activité antivirale notable grâce à leur capacité à précipiter les protéines virales, perturbant ainsi les enzymes virales. L'extrait aqueux du péricarpe riche en tanins inhibe in vitro le HSV-2 et le HBV par inhibition dose-dépendante de l'ADN polymérase (**Zhang et al., 1995, 1997**). Le jus de grenade montre aussi une activité contre le VIH-1 (**Neurath et al., 2004**). Par ailleurs, les polyphénols de la grenade inhibent la réplication du virus de la grippe A/H3N2 et bloquent l'agglutination des globules rouges (**Haidari et al., 2009**), la punicalagine étant identifiée comme le composé le plus actif

#### – Effet anti-inflammatoire

Même si l'inflammation aiguë ou physiologique constitue une réponse bénéfique de l'organisme face aux lésions tissulaires, une inflammation persistante peut favoriser l'apparition de maladies immunitaires telles que la polyarthrite rhumatoïde, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), voire certains cancers, en cas de résolution retardée (**Balkwill et al., 2005**). En effet, l'inflammation chronique est susceptible de

provoquer des altérations précoces associées à la cancérogenèse, en attirant des médiateurs pro-inflammatoires solubles comme le TNF- $\alpha$ , des interleukines (IL-6, IL-8), des facteurs d'activation transcriptionnelle (NF- $\kappa$ B), ainsi que des lipides bioactifs tels que les eicosanoïdes (prostaglandine E2, produits dérivés de la lipoxygénase) (Lansky et al., 2007).

Les composés anti-inflammatoires de la grenade ont été principalement étudiés dans les graines. Les recherches ont révélé que les polyphénols et les acides gras constituent les principaux agents responsables de cet effet. L'extrait obtenu à partir de l'huile de graines pressées à froid, riche en polyphénols et en acides gras, a montré une inhibition de 31 à 44 % de la cyclooxygénase de mouton et de 69 à 81 % de la lipoxygénase de soja, tandis que l'extrait de jus fermenté a permis d'inhiber cette dernière enzyme à hauteur de 21 à 30 % (Schubert et al., 1999).

Une autre étude a confirmé que les polyphénols issus de l'huile de graines pressées à froid pouvaient inhiber les voies de signalisation inflammatoire dans des cellules de cancer colorectal (Adams et al., 2006). Quant à l'acide punique, principal acide gras contenu dans les graines de grenade, il est reconnu pour ses propriétés anti-inflammatoires, notamment par sa capacité à inhiber la biosynthèse des prostaglandines (Nugteren et al., 1987).

#### - Effet antidiabétique de grenade

Les fleurs de grenade présentent une activité antidiabétique démontrée dans plusieurs modèles animaux. Leur action repose sur divers mécanismes : amélioration de la sensibilité des récepteurs à l'insuline, augmentation de l'utilisation périphérique du glucose, inhibition de l'absorption intestinale du glucose, et effet antioxydant.

L'extrait méthanolique des fleurs a réduit la glycémie chez les rats diabétiques de type 2 (ZDF), en stimulant l'expression de PPAR- $\gamma$  et en restaurant celle du transporteur GLUT-4 (Tom et al., 2005). L'acide gallique serait le principal composé actif. L'extrait aqueux a également abaissé la glycémie à jeun et corrigé les déséquilibres lipidiques et oxydatifs chez les rats diabétiques (Bagri et al., 2009). De plus, l'extrait hydro-éthanolique a exercé un effet hypoglycémiant chez les rats normaux et diabétiques, en partie par une meilleure utilisation du glucose et une réduction de son absorption intestinale (Jafri et al., 2000). (Enfin, Li et al. 2005) ont montré une amélioration de l'hyperglycémie postprandiale chez des modèles animaux obèses et diabétiques, grâce à l'inhibition de l' $\alpha$ -glucosidase intestinale.

# **CHAPITRE III**

## **La résistance**

### **Bactérienne**

### I-1- Définition Bacterie

Les bactéries (*Bacteria*) sont un domaine d'organismes vivants procaryotes présents dans tous les milieux. Le plus souvent unicellulaires, elles sont parfois pluricellulaires (généralement filamenteuses), la plupart des espèces bactériennes ne vivant pas individuellement en suspension, mais en communautés complexes adhérant à des surfaces au sein d'un gel muqueux (*biofilm*) (Yala D et al.,2021).

Les bactéries présentent de nombreuses formes : sphériques (*coques*), allongées ou en bâtonnets (*bacilles*) et des formes plus ou moins spiralées. L'étude des bactéries est la bactériologie, soit une des nombreuses branches de la microbiologie.

Il existe environ 10 000 espèces connues à ce jour (Krichen, F et al., 2015), (Vijayabaskar, P et al., 2012), mais la diversité réelle du groupe est probablement supérieure. L'estimation du nombre des espèces oscillerait entre 5 et 10 millions (Kontiza, I et al ., 2018), (Candan F et al ., 2023) .Un nombre important de bactéries vit dans le corps humain, d'ordre comparable à la quantité des cellules qui le constituent, mais la masse de ces dernières est plus importante. La plupart de ces bactéries sont inoffensives ou bénéfiques pour l'organisme. Il existe cependant de nombreuses espèces pathogènes à l'origine de beaucoup de maladies infectieuses.

### I-2- Biofilms

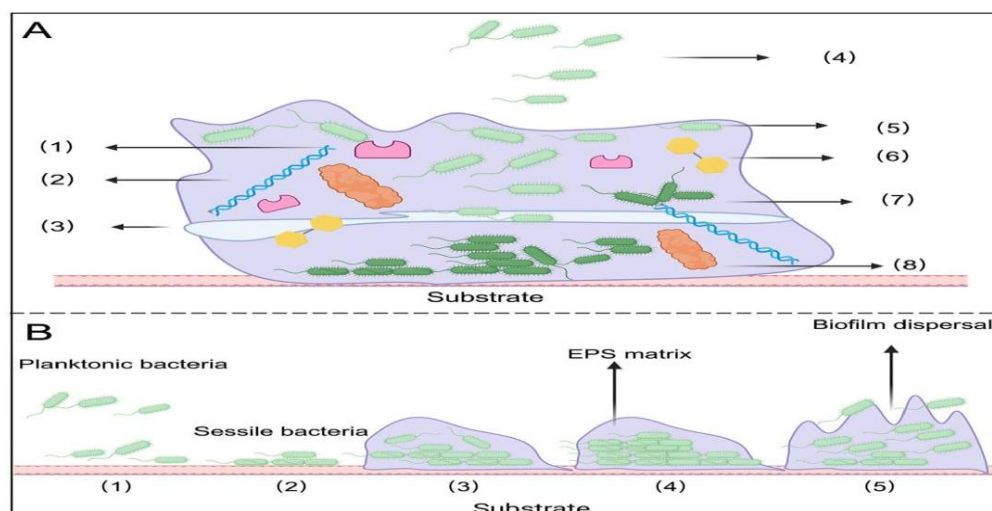
Les biofilms sont définis comme des communautés tridimensionnelles, multi microbiennes et bien organisées, composées d'un ensemble de micro-organismes enrobés dans une matrice polymérique auto-produite, adhérant les uns aux autres sur des surfaces biotiques ou abiotiques. À l'origine, un petit groupe de cellules ou une seule cellule se divise et se différencie pour former une structure dite complexe (O'Toole & Kolter., 1998). La population bactérienne au sein du biofilm peut être homogène ou hétérogène. Bien que les biofilms soient souvent perçus comme potentiellement nuisibles dans les domaines cliniques et divers secteurs industriels, de nombreux biofilms présentent des effets bénéfiques, comme le montrent plusieurs rapports (Ünal Turhan et al., 2019). Les biofilms bénéfiques ont une large gamme d'applications dans les domaines agricoles, médicaux, environnementaux, alimentaires, entre autres, incluant les biofertilisants, les agents antibactériens et antimicrobiens, la filtration, la prévention de la corrosion, le traitement des eaux usées, l'antifouling, les piles à combustible microbiennes, la bioremédiation et la fermentation alimentaire (Ünal Turhan et al., 2019)(Qureshi., 2009).

### I-3- Le processus de formation des biofilms bactériens

La formation des biofilms est un processus complexe et dynamique qui peut être divisé en cinq étapes distinctes (Fig. 1B)(Shanshan et al., 2021). Il est à noter que même les biofilms morts peuvent favoriser l'adhésion d'autres cellules microbiennes et contribuer à la régénération du biofilm.

Le mode de vie en biofilm débute par l'attachement des bactéries à une surface, en commençant par la phase d'adhésion réversible. À ce stade, les bactéries planctoniques s'attachent temporairement au substrat par des interactions électrostatiques, de van der Waals et hydrophobes. La deuxième étape correspond à l'adhésion irréversible, au cours de laquelle les bactéries sécrètent des substances polymériques extracellulaires (EPS), favorisent la croissance de la colonie et forment une couche de nanogel qui entoure les cellules bactériennes.

La troisième étape est marquée par l'augmentation des microcolonies, caractérisée par la formation précoce et la prolifération de petites colonies. Ensuite, à la quatrième étape, appelée phase de maturité complète, le biofilm adopte une structure tridimensionnelle mature. Enfin, au cours de la phase de vieillissement et de diffusion, certaines enzymes dégradent le substrat, permettant aux bactéries de retrouver leur forme planctonique. Ces bactéries planctoniques peuvent alors rechercher de nouveaux nutriments et surfaces, assurant ainsi la perpétuation du cycle du biofilm



A Composition of biofilm. (1) Exopolysaccharides; (2) Deoxyribonucleic acid (DNA); (3) Water channels; (4) Planktonic bacteria; (5) Surface bacteria; (6) Protein; (7) Nutrient deficient bacteria; (8) Enzymes. (B) Schematic diagram of biofilm formation. (1) Reversible attachment stage; (2) Irreversible attachment stage; (3) Microbial colony formation stage; (4) Biofilm maturation stage; (5) Bacterial shedding/diffusion stage (Shanshan et al., 2021)

#### I-4- Propriétés des biofilms bactériens

Électronégativité : la majorité des substances présentes dans les biofilms bactériens sont de nature anionique, ce qui confère à la surface du biofilm une charge négative (**Sharma et al., 2023**).

Hydrophobicité : la couche externe du biofilm contient généralement des lipides, des polysaccharides méthylés et acétylés, ainsi que des protéines, contribuant à son caractère hydrophobe. Cette zone hydrophobe joue un rôle protecteur en isolant les cellules bactériennes des influences extérieures et en empêchant l'invasion de molécules étrangères (**Flemming & Wingender, 2010**).

Acidité : le biofilm génère un microenvironnement anoxique, pauvre en nutriments et acide. Les bactéries situées en surface consomment rapidement l'oxygène, induisant une hypoxie relative à l'intérieur du biofilm. De plus, les processus anaérobies produisent de nombreux métabolites acides, aboutissant à un environnement à pH faible (**Çam & Badilli, 2024**).

Abondance en enzymes : lors de la colonisation bactérienne et de la formation du biofilm, les bactéries sécrètent diverses enzymes, notamment celles capables de dégrader ou modifier les antibiotiques. Ces enzymes peuvent altérer la structure moléculaire des antibiotiques avant qu'ils n'atteignent les cellules bactériennes, réduisant ou annulant ainsi leur efficacité et contribuant à la résistance aux antibiotiques.

Diversité des toxines : les toxines présentes dans les biofilms bactériens comprennent principalement des exotoxines et des endotoxines, toutes deux nuisibles pour l'hôte. Les exotoxines sont des protéines ou peptides sécrétés par les bactéries, pouvant endommager directement les cellules de l'hôte ou perturber leurs fonctions normales. Les endotoxines désignent principalement les lipopolysaccharides (LPS) présents dans la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif. Lors de la lyse bactérienne, les LPS sont libérés, déclenchant une réponse immunitaire susceptible d'entraîner inflammation et fièvre. Par exemple, les biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) contiennent une quantité importante d'endotoxines, capables de provoquer de fortes réactions inflammatoires lors de leur libération.

### I-5- Mécanisme d'élimination des bactéries, méthodes et moyens

Si l'organisme ne disposait pas de défenses contre les infections, il serait rapidement submergé par les micro-organismes. Ces défenses nécessitent un corps vivant et fonctionnant correctement. Un corps mort commence à se dégrader presque immédiatement, car ses défenses ne fonctionnent plus.

Les barrières naturelles et le système immunitaire défendent l'organisme contre les organismes qui peuvent être à l'origine d'infections (**Fabbri, E et al ., 2018**)

La peau, les muqueuses, les larmes, un bouchon de cérumen, le mucus et l'acide gastrique constituent des barrières naturelles. De plus, le débit urinaire normal élimine les germes qui pénètrent dans l'appareil urinaire.

Le système immunitaire utilise les globules blancs et les anticorps pour identifier et supprimer les organismes qui parviennent à traverser les barrières naturelles de l'organisme (**Terracciano, M et al ., 2016**).

### I-6- substances antibactériennes

Les substances antibactériennes sont des agents chimiques ou naturels capables d'inhiber la croissance des bactéries ou de les tuer. Elles sont utilisées pour traiter les infections bactériennes chez l'humain, les animaux, ou dans des applications industrielles, alimentaires et d'hygiène.

#### Catégories principales de substances antibactériennes:

##### 1- Antibiotiques

- Produits naturellement par des micro-organismes ou synthétisés en laboratoire.
- Exemples:
  - ✓ Pénicilline (agit sur la paroi bactérienne)
  - ✓ Tétracycline (inhibe la synthèse des protéines)
  - ✓ Ciprofloxacine (interfère avec l'ADN bactérien)

##### 2- Antiseptiques

- Utilisés sur la peau ou les muqueuses pour prévenir les infections.
- Exemples:
  - ✓ Chlorhexidine
  - ✓ Iode (bétadine)
  - ✓ Alcool éthylique ou isopropylique

## 3- Désinfectants

- Utilisés sur des surfaces ou objets inanimés.
- Exemples:
  - ✓ Eau de Javel (hypochlorite de sodium)
  - ✓ Peroxyde d'hydrogène
  - ✓ Ammonium quaternaire

## 4- Produits naturels

- Certaines plantes ou substances biologiques ont des propriétés antibactériennes.
- Exemples:
  - ✓ Ail (allicine)
  - ✓ Miel de Manuka
  - ✓ Huiles essentielles (ex. : tea tree, origan)

## 5- Peptides antimicrobiens

- Petites protéines produites par des organismes vivants (dont l'humain) pour se défendre contre les infections.
- Exemples : défensines, cathelicidines (**Papari, G et al ., 2016**).

Mécanismes d'action:

- Inhibition de la synthèse de la paroi cellulaire
- Altération de la membrane cellulaire
- Inhibition de la synthèse des protéines
- Inhibition de la synthèse de l'ADN ou de l'ARN
- Perturbation des voies métaboliques bactériennes (**Caicedo, N et al ., 2019**).

**I-7- familles d'antibiotiques**

Les familles d'antibiotiques regroupent les antibiotiques selon leur structure chimique et leur mécanisme d'action. Chaque famille a des spectres d'activité, des indications et des résistances spécifiques.

Voici les principales familles d'antibiotiques:

Tableau: récapitulatif (format simplifié)

Famille	Cible/Mécanisme	Exemples	Spectre principal
Bêta-lactamines	Paroi bactérienne	Amoxicilline, Imipénème	Large, surtout Gram +
Macrolides	Ribosome 50S	Azithromycine	Gram +, intracellulaires
Aminosides	Ribosome 30S	Gentamicine	Gram -
Tétracyclines	Ribosome 30S	Doxycycline	Large spectre
Quinolones	ADN gyrase/topoisomérase	Ciprofloxacine	Gram -, certains Gram +
Sulfamides	Acide folique (inhibition enzymatique)	Bactrim	Gram +/-, Pneumocystis
Glycopeptides	Paroi bactérienne	Vancomycine	Gram + uniquement
Oxazolidinones	Ribosome 50S	Linezolide	Gram + résistants
Lincosamides	Ribosome 50S	Clindamycine	Anaérobies, Gram +
Nitroimidazoles	ADN (effet toxique)	Métronidazole	Anaérobies, parasites

## I-8- Extraits de plantes aux propriétés antibactériennes (Ko et al., 2012)

### 1. Flavonoïdes (dont Quercétine)

- **Quercétine**
  - Famille: flavonols.
  - Sources : oignons rouges, pommes, thé vert, raisins, câpres.
  - **Propriétés :**
    - Antibactérienne (contre *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*).
    - Antivirale, antioxydante, anti-inflammatoire.
  - **Mécanisme :**
    - Perturbation de la membrane bactérienne.
    - Inhibition des enzymes bactériennes.
    - Synergie possible avec certains antibiotiques.
- Autres flavonoïdes : catéchines (thé vert), apigénine (persil), kaempférol (choux)

### 2. Huiles essentielles

- Extraits aromatiques très concentrés issus de plantes.

- **Exemples:**
  - **Origan** (carvacrol, thymol).
  - **Tea tree** (*Melaleuca alternifolia*).
  - **Cannelle** (aldéhyde cinnamique).
- **Propriétés:**
  - Antibactériennes, antifongiques, antivirals.
  - Action sur les membranes bactériennes et biofilms.

### 3. Alcaloïdes

- Composés organiques contenant de l'azote.
- **Exemples:**
  - **Berbérine** (issue de *Berberis vulgaris*, *Hydrastis canadensis*).
    - Actif contre *Staphylococcus*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*.
  - **Quinidine, capsaïcine**
- **Mécanisme:**
  - Altération de la membrane cellulaire bactérienne.
  - Inhibition des protéines de transport ou de synthèse.

### 4. Tanins

- Polyphénols astringents présents dans de nombreuses plantes.
- **Sources** : écorces d'arbres, thé, vin, châtaignier
- **Propriétés** :
  - Précipitent les protéines bactériennes.
  - Inhibent la croissance de *Salmonella*, *Listeria*, etc.

### 5. Saponines

- Glycosides naturels à effet tensioactif.
- **Sources** : soja, pois chiche, réglisse, ginseng.
- **Propriétés** :
  - Perturbation des membranes bactériennes.

- Activité antimicrobienne modérée à forte selon la plante.

## 6. Acides phénoliques

- **Exemples** : acide caféique, acide rosmarinique, acide gallique.
- **Sources** : romarin, basilic, thym, thé.
- **Activités** :
  - Antioxydantes et antibactériennes.
  - Inhibition de la croissance bactérienne et des biofilms.

### I-9- Exemple d'utilisation : Synergie avec les antibiotiques (Li et al., 2014)

Certains extraits de plantes (dont la **quercétine**, la **berbérine** ou les **huiles essentielles**) peuvent :

- **Augmenter l'efficacité** des antibiotiques.
- **Réduire la résistance bactérienne.**
- **Cibler les biofilms** (forme résistante des bactéries).

## II. Anomatériaux antibactériens

De nombreux **nanomatériaux** possèdent une activité antibactérienne intrinsèque ou servent de **vecteurs de molécules actives**. Voici les plus connus :

### II.1. Nanoparticules métalliques

#### Argent (AgNPs)

- **Très puissant antibactérien**
- **Mécanismes d'action** :
  - Libération d'ions  $Ag^+$  qui perturbent les membranes bactériennes.
  - Stress oxydatif (ROS).
  - Inhibition de l'ADN et des enzymes.
- **Actif contre** : *E. coli*, *S. aureus*, bactéries résistantes.
- **Utilisation** : pansements, textiles, revêtements médicaux.

#### Zinc (ZnO), Oxyde de zinc

- Génère des **espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

- Bonne photostabilité et compatibilité.
- Actif surtout sous lumière UV.

#### Oxyde de titane (TiO<sub>2</sub>)

- Activité photocatalytique (sous UV).
- Génère des ROS (espèces réactives de l'oxygène).
- Utilisé dans des revêtements, peintures antimicrobiennes.

#### Cuivre (CuNPs)

- Moins cher que l'argent.
- Libère des ions Cu<sup>2+</sup> toxiques pour les bactéries.
- Actif contre *Salmonella*, *E. coli*, *MRSA*.

### II.2. Nanomatériaux carbonés

#### Graphène & oxyde de graphène (GO)

- Tranchants au niveau nanométrique : endommagent les membranes bactériennes.
- Capacité à adsorber et libérer des substances actives.
- Effet synergique avec d'autres agents antibactériens.

#### Nanotubes de carbone (CNTs)

- Propriétés mécaniques et électriques intéressantes.
- Peuvent percer les membranes cellulaires bactériennes.
- Parfois fonctionnalisés pour améliorer leur effet antibactérien.

### II.3. Nanoargiles et nanocomposites

- Utilisés pour **piéger ou libérer des substances antibactériennes**.
- Utiles en emballage alimentaire, médecine régénérative, cosmétique.
- Ex. : nanoclay combinée à la quercétine ou aux huiles essentielles.

### II.4. Nanoparticules polymériques

- Vecteurs de **molécules naturelles** ou **antibiotiques**.
- Exemples :
  - **Nanoparticules de chitosane** (naturellement antibactérien).

- Nanogels ou nanoémulsions pour libération contrôlée.

**Applications des nanomatériaux antibactériens**

<b>Domaine</b>	<b>Utilisation concrete</b>
Médical	Pansements, cathéters, implants, endoprothèses
Cosmétiques	Crèmes, gels, dentifrices
Textiles	Vêtements antibactériens, masques, chaussettes
Emballage	Films alimentaires antimicrobiens
Construction	Peintures, revêtements de surfaces auto-désinfectantes
Eau/environnement	Filtres purifiants, désinfection, membranes

# *Partie Pratique*

---

# **CHAPITRE I**

## **Matériels et méthodes**

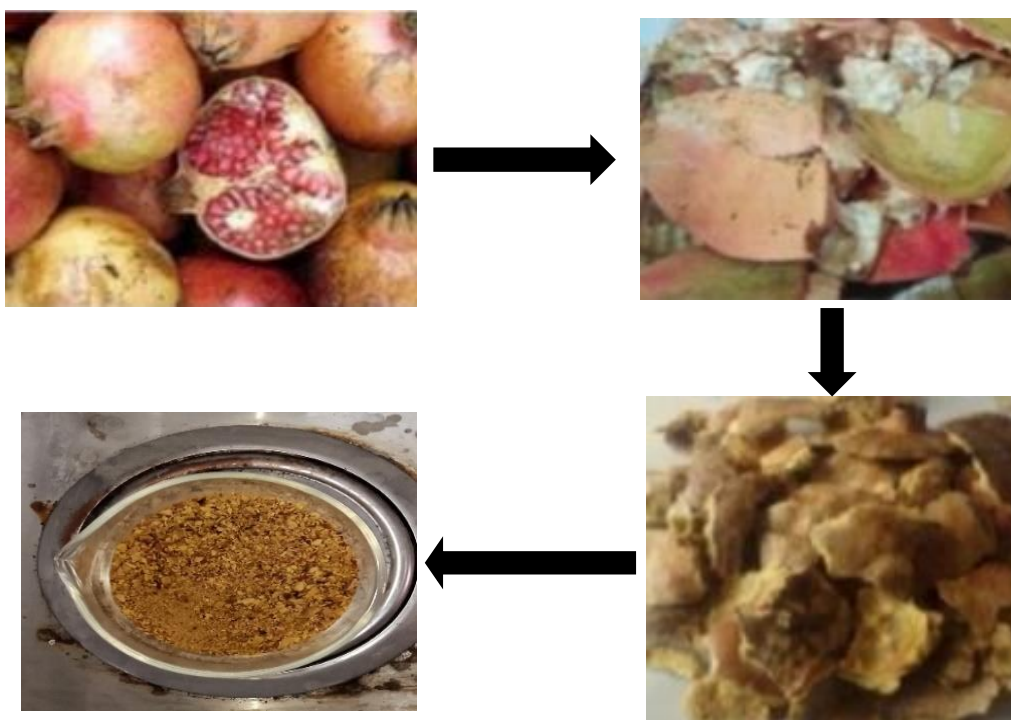
## I. Matériel

### I.1. Matériel végétale

Les écorces de grenade (*Punica granatum*) sont des matières végétales riches en composés polyphénoliques tels que l'acide ellagique et les flavonoïdes, ce qui leur confère des propriétés antioxydantes et antibactériennes. Elles ont été utilisées dans diverses applications environnementales et pharmaceutiques, notamment dans la synthèse de nanoparticules, servant d'agents réducteurs et stabilisants naturels. (Sundararajan et al., 2016)

#### I.1.2. Préparation et conservation de la poudre de fruit de grenade:

Les écorces de fruits restants ont été séchés et broyées jusqu'à l'obtention d'une poudre granulée fine. Cette poudre est nécessaire à la préparation des extraits. Pour éviter toute contamination de la poudre obtenue, celle-ci est conservée à l'air libre et humidifiée.



**Figure -1** : Schéma illustrant les principales étapes de la poudre d'écorces de grenade (*Punica granatum*).

### I.2. Souches bactériennes :

#### I.2.1 Escherichia coli (E. coli):

*Escherichia coli* est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des Enterobacteriaceae. Elle est naturellement présente dans l'intestin humain et animal. Bien que la plupart des souches soient inoffensives, certaines, comme E. coli O157:H7, peuvent

provoquer des maladies graves telles que la diarrhée hémorragique et l'insuffisance rénale. (Todar., 2020)

### **I.2.2 Salmonella :**

Les *Salmonella* sont des bactéries à Gram négatif responsables d'infections alimentaires comme la salmonellose. Elles se transmettent par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, et provoquent des symptômes tels que diarrhée, fièvre et douleurs abdominales (**Centers for Disease Control and Prevention [CDC]., 2023**).

### **I.2.3. Staphylococcus aureus:**

*Staphylococcus aureus* est une bactérie à Gram positif naturellement présente sur la peau et les muqueuses. Elle peut provoquer diverses infections cutanées, intoxications alimentaires, et dans certains cas, des maladies graves comme la septicémie ou la pneumonie. Certaines souches, comme le SARM (*MRSA*), sont résistantes aux antibiotiques (**Tong et al., 2015**).

### **I.2.4. Bacillus subtilis:**

*Bacillus subtilis* est une bactérie à Gram positif en forme de bâtonnet, connue pour sa capacité à former des spores. Elle est largement utilisée comme modèle en microbiologie ainsi que dans l'industrie pharmaceutique. Elle est généralement non pathogène (**Earl et al., 2008**).

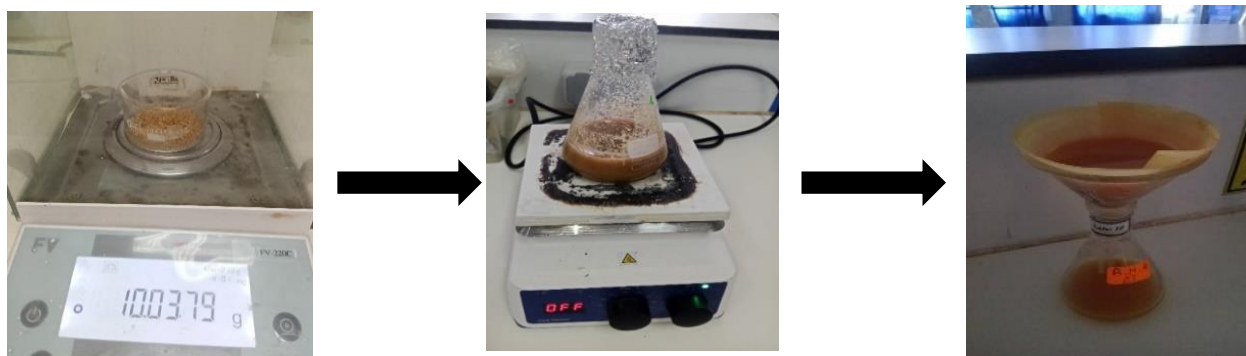
## **II. Méthodes :**

### **II.1. Préparation de l'extrait :**

La macération est un procédé qui consiste à laisser la matière végétale en poudre dans un liquide afin d'en extraire les principes actifs solubles. Il s'agit d'une extraction réalisée à température ambiante. La méthode d'extraction utilisée est de 10 g de poudre de grenade pour 100 ml de solvant (eau distillée). Ensuite, il a été placé dans un agitateur électrique pendant 24 heures à température ambiante.

Après l'étape d'extraction, le liquide extrait a été filtré à l'aide de papier filtre Fisher standard et récupéré les filtres.

Nous séchons l'extrait végétal brut afin d'éliminer le solvant et d'obtenir un extrait concentré et sec. Celui-ci est ensuite conservé dans un récipient hermétique, à l'abri de la lumière et à température ambiante, afin de préserver ses propriétés bioactives.



**Figure -2 :** Les étapes de préparation de l'extrait végétale à partir des écorces de grenade.

## II.2. Criblage phytochimique :

Identification des composés phytochimiques présents dans l'extrait l'écorces de grenade (*punica granaturme*) polyphénols, flavonoïdes, alcaloïdes, terpénoïdes, saponines, tannins, coumarine, glycosides, etc.) selon les méthodes standard (Harborne., 1973) (Trease et Evans, 1989) (Sofowara., 1993) (Bekro et al., 2007).

### II.2.1 : polyphénoles :

2mL de l'extrait ont reçu quelques gouttes d'une solution de  $\text{FeCl}_3$  à 2 % (p/v).  $\text{FeCl}_3$  prend une coloration verdâtre ou bleu-noirâtre en présence de

### II.2.2. Flavonoïde :

1mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 5mL d'ammoniaque diluée et 5 mL de l'extrait à analyser. La présence de flavonoïdes est due à la couleur jaune.

### II.2.3. tanine :

Dans un tube à essai, mélanger 5mL d'extrait avec 1mL d'une solution aqueuse de chlorure ferrique ( $\text{FeCl}_3$ ) à 2 %. La teneur en tanins est indiquée par une teinte verdâtre ou bleu-noirâtre.

### II.2.4. Alcaloïdes :

Pour l'analyse, ajouter 1mL d'extrait dans chacun des deux tubes à essai. Après avoir ajouté quelques gouttes d' $\text{HCl}$  pour acidifier le milieu, remplir le premier tube avec des

gouttes de réactif de Mayer et le second avec des gouttes de réactif de Wagner. La présence d'alcaloïdes se manifeste par la formation d'un précipité blanc ou brun, selon le cas.

### **II.2.5. Terpénoïdes :**

Dans un tube à essai, ajouter 3mL d'acide sulfurique fort, 2 mL de chloroforme et 5mL d'extrait végétal. Les terpénoïdes sont responsables de la couleur brun rougeâtre.

### **II.2.6 Saponines :**

L'extrait aqueux est ajouté à 10 mL d'un tube à essai. Le tube est agité pendant quinze secondes, puis laissé au repos pendant quinze minutes supplémentaires. La présence de saponines est indiquée par une mousse continue de plus de 1 cm.

### **II.2.7. Glycosides cardiaques**

1mL de l'extrait est mélangé à 2mL de chloroforme. Ensuite, du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> est ajouté avec précaution à l'intérieur du tube à essai. La présence d'une portion glycone dans un glycoside cardiaque est indiquée par sa teinte brun rougeâtre.

### **II.2.8. Coumarines**

par l'ajout de quelques mL de NaOH.

### **II.2.9. Quinones**

Un millilitre d'extrait brut est mélangé à de la NaOH diluée. Les quinones sont indiquées par une coloration bleu-vert ou rouge.

### **II.2.10. Stéroïdes**

Cinq gouttes de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pur ont été ajoutées à 1 millilitre d'extrait. La couleur brun rougeâtre indique la présence de stéroïdes.

## **II.3. Quantification des composés phytochimiques**

### **II.3.1. Estimation des composés phénoliques totaux :**

La méthode de Folin-Ciocalteu (Slinkard et Singleton., 1977) a été utilisée pour déterminer la quantité totale de composés phénoliques. 1 mL de réactif de Folin-Ciocalteu à 10 % et 0,2 mL d'extrait d'écorce de grenade ont été ajoutés. Après 4 minutes, 0,8 mL de carbonate de sodium (75g/L) ont été ajoutés.

À température ambiante, après 2 h d'incubation, l'absorbance a été mesurée à 765 nm. L'acide gallique a été utilisé comme étalon pour l'équation d'étalonnage linéaire ; la teneur en composés phénoliques totaux a été exprimée en  $\mu\text{g}$  d'équivalent d'acide gallique par mg d'extrait.

### II.3.2. Estimation des flavonoïdes totaux :

Pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes de l'extrait d'écorce de grenade la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ) a été utilisée (Ahn et al., 2007) ; 1 mL de la solution d' $\text{AlCl}_3$  est mélangé à 1 mL de l'échantillon, le même volume étant utilisé pour l'étalon, et les résultats sont déterminés à l'aide d'une équation d'étalonnage linéaire avec la quercétine comme étalon. Après 30 minutes, l'absorbance à 430 nm est mesurée par rapport au blanc réactif préparé. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g}$  de quercétine par milligramme d'extrait.

### II.3.3. Estimation des tanins condensés :

La quantité de tanins dans les heures supplémentaires de la journée. *Punica granatum* est plus adapté au développement des techniques de Broadhurst et Jones (1978). 0,5 ml de Chantillon avec un mélange de 3,0 ml de vanille (vanilline à 4% p/v dans le méthanol) avant d'ajouter 1,5 ml d'acide chlorhydrique à 8%. Après quelques minutes, l'absorption de la réaction est mesurée à 500 nm en appliquant de l'eau. La valeur de la catéchine est utilisée pour augmenter les quantités d'échantillon et le standard d'absorption. Les résultats sont extraits des kilos en trop divisés en  $\mu\text{g}$  de catéchine.

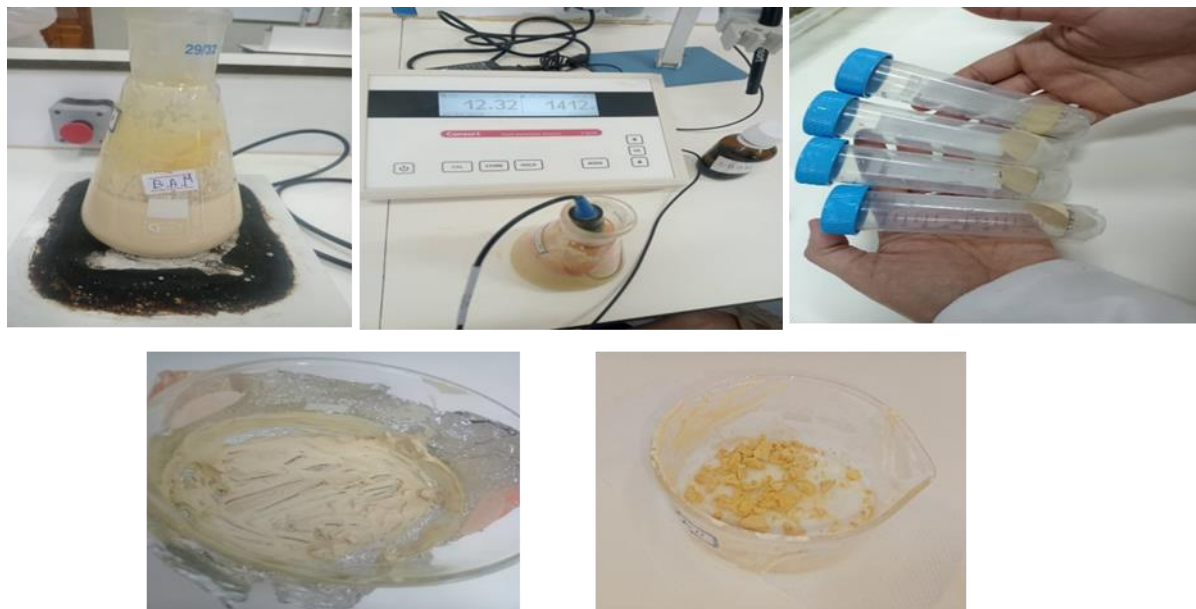
## II.4. Synthèse verte de nanoparticules

### II.4.1. Synthèse écologique de nanoparticules d'oxyde de zinc :

Avec des modifications mineures, des nanoparticules d'oxyde de zinc (NP de  $\text{ZnO}$ ) ont été créées selon une technique précédemment décrite par Azzi M et al. (2024). Cette méthode de synthèse respectueuse de l'environnement consistait à mélanger 5ml d'extrait aqueux d'écore de grenade à 100 ml d'une solution de  $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{CO}_2)_2$  0,5 M. À l'aide d'un agitateur magnétique le mélange a été agité pendant 10 minutes à température ambiante. Dans le même temps, une solution de  $\text{NaOH}$  0.02M a été préparée pour atteindre progressivement un pH de 12 à l'aide d'une pH-mètre. Le mélange obtenu a été agité en continu à 150 tr/min pendant une 2 heure, pendant la période d'incubation. Le sel bioréduit est devenu visible sous forme d'un précipité blanc jaunâtre qui s'est déposé au fond du flacon. Plusieurs redispersions dans

de l'eau déionisée ont été nécessaires à la purification, et une centrifugation a été réalisée à 4000 tr/min pendant 20 minutes. Lavé trois fois avec de l'eau distillée et la quatrième fois avec de l'éthanol. Le produit final, une poudre blanche, a été séché dans un four à 500 °C pendant toute la nuit avant d'être stocké pour une utilisation ultérieure (Azzi et al., 2024) .

**Figure -3** : Préparation des nanoparticules de ZnO à partir des écorces de grenade.



## II.5. Caractérisation des nanoparticules de ZnO :

Il existe plusieurs outils et techniques permettant d'identifier les caractéristiques des nanoparticules de ZnO synthétisées. Ces techniques sont nécessaires et spécifiquement utilisées pour distinguer les nanoparticules de ZnO selon leur aspect, leur taille, leur distribution, leur forme, leur morphologie, leur surface spécifique et toutes les mesures liées à l'évaluation des propriétés physico-chimiques . Nous allons ici aborder les outils et techniques les plus courants et les plus importants utilisés pour la caractérisation des nanoparticules de ZnO.

### II.5.1. Spectrophotomètre UV-Vis (UV-Vis)

Les caractéristiques optiques et l'énergie de bande interdite de ces nanoparticules ont été évaluées en enregistrant les spectres d'absorbance à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible (Shimadzu UV-2450, États-Unis) dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 400 nm pour les ZnO NP. La bande interdite d'énergie ( $E_g$ ) des nanoparticules a été déterminée à l'aide des équations de Tauc (Broadhurst & Jones, 1978).

### II.5.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) en mode réflexion diffuse, réalisée avec un spectromètre de réflexion totale atténuée Thermo Scientific-Nicolet iS5, a été utilisée pour détecter les groupes fonctionnels présents dans les nanoparticules. Les spectres enregistrés s'étendaient de 4 000 à 400  $\text{cm}^{-1}$ , grâce à une approche par pastilles de KBr. (Broadhurst & Jones, 1978) .

### II.5.3. Diffraction des rayons X (DRX)

Pour évaluer la cristallinité et la granulométrie des nanoparticules synthétisées vertes, une analyse par diffraction des rayons X sur poudre (DRX) a été réalisée à l'aide d'un rayonnement K du cuivre avec un diffracteur à rayons X (Mini Flex 600 Rigaku ;  $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$ ), couvrant la plage  $2\theta$  de 25 à 90. En choisissant le pic principal présentant l'intensité la plus élevée, l'équation de Scherrer (équation 02) a été utilisée pour calculer la taille des cristallites.

Où D représente la taille des cristallites, k désigne le facteur de forme (0,9),  $\lambda$  est la longueur d'onde (0,154281 nm,  $\text{CuK}\alpha$ ), h représente la largeur à mi-hauteur (FWHM) et l'angle de diffraction est  $\theta$ . (Broadhurst & Jones, 1978).

## II.6. Activité antioxydante

### Dosage du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) :

Le pouvoir antioxydant réducteur ferrique d'extrait d'écorce de grenade et des nanoparticules a été mesuré selon la méthode d'Oraiza (1986), avec quelques modifications. Des concentrations de 50 à 1000  $\mu\text{g/ml}$  d'échantillons ont été mélangées avec 1 ml de ferricyanure de potassium (1 %) et de tampon phosphate (0,2 M,  $\text{pH} = 6,6$ ). Après ajout de 0,5 ml d'acide trichloracétique (10 % p/v), les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes. Une quantité identique de surnageant et d'eau déionisée, ainsi que 0,125 ml de chlorure ferrique (0,1 %), ont été combinés. Le même procédé a été utilisé pour l'acide ascorbique comme témoin positif.

L'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à 700 nm. L'activité antioxydante totale (FRAP) a été mesurée en milligrammes d'AAE par milligramme d'échantillon (Laouini et al., 2021).

## II.7. Préparation de nanoparticules de zinc enrobées de médicament (quercétine et amoxicilline).

### II.7.1. Préparation de ZnO enrobé de quercétine :

Pour préparer des nanoparticules de zinc chargées de quercétine (ZnO), une solution de quercétine a été préparée en dissolvant 25 mg de quercétine dans 20 ml d'eau/éthanol, et différentes concentrations de ZnO (1, 3 et 5 mg/ml) ont été dispersées sous agitation continue pendant 2 à 4 h à l'aide d'un agitateur magnétique. Ensuite, nous avons utilisé un bain à ultrasons à 42 °C pendant 30 min pour améliorer l'adsorption à la surface des particules. Après avoir centrifugé les échantillons (10 000 à 15 000 tr/min pendant 10 à 20 minutes), nous lavons le sédiment avec de l'eau distillée ou de l'éthanol pour éliminer toute créatine non liée (Sharma et al., 2023).

\* Sécher la poudre chargée de quercétine dans un séchoir sous vide à 40°C pendant 12 à 24 heures (Sharma et al., 2023).



Figure -4 ::\_Préparation de ZnO enrobé de quercétine dans l'abonoriore.

### II.7.2. Préparation de Zn O enrobé d'antibiotique (amoxicilline) :

Pour préparer des nanoparticules de zinc (Zn O) chargées d'amoxicilline, une solution d'amoxicilline a été préparée en dissolvant 25 mg d'amoxicilline pour injection intraveineuse (0,5 mg/ml) dans 50 ml d'eau distillée, et différentes concentrations de Zn O (1, 3 et 5 mg/ml) ont été dispersées sous agitation continue. Ensuite, nous avons utilisé un bain à ultrasons à 42 °C pendant 30 min pour améliorer l'adsorption à la surface des particules. Après avoir centrifugé les échantillons (10 000 à 15 000 tr/min pendant 10 à 20 minutes), nous lavons le sédiment avec de l'eau distillée ou de l'éthanol pour éliminer tout antibiotique non lié.

\*Sécher la poudre chargée d'antibiotiques dans un séchoir sous vide à 40°C pendant 12 à 24 heures (Mohammed et al., 2025).



Figure -5 : : Préparation de ZnO enrobé de amoxicilline dans l'aboratiore

## II.8. Activité antibactérienne

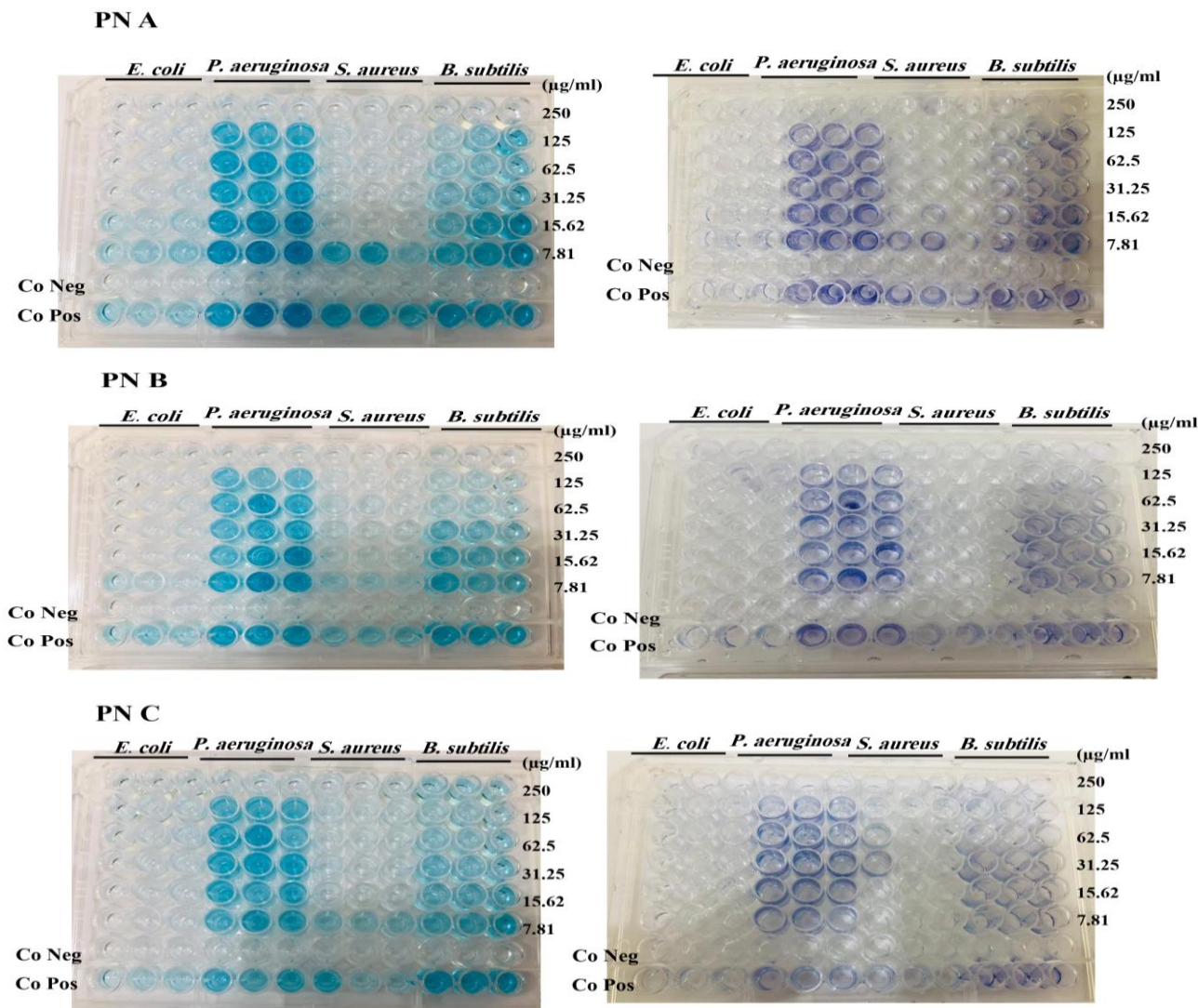
### Effet de nanoparticules sur la formation du biofilm

Afin d'évaluer l'effet de trois nanoparticules différentes (PNA, PNB, PNC) sur la formation de biofilm, des cultures bactériennes en phase stationnaire ont été diluées et transférées dans une plaque microtitrée à 96 puits. Une concentration sous-inhibitrice de chaque nanoparticule, préparée à partir d'une solution mère de 250  $\mu\text{g/mL}$  et diluée en six concentrations décroissantes, a été ajoutée aux puits. La plaque a été incubée à 37°C pendant 24 heures sans agitation.

Pour quantifier les cellules formant le biofilm, le surnageant des cultures a été éliminé, et chaque puits a été lavé deux fois avec une solution tampon phosphate salin (PBS) afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Les puits ont ensuite été séchés à l'air, puis colorés avec 200  $\mu\text{L}$  de cristal violet à 0,1% pendant 30 minutes. Après élimination du colorant, la plaque a été rincée à l'eau distillée. L'intensité de la coloration des cellules fixées (indiquant la biomasse du biofilm) a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque, après addition de diméthylsulfoxyde (DMSO).

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été définie comme étant la plus faible concentration de nanoparticule empêchant la croissance bactérienne visible. Pour déterminer la concentration minimale bactéricide (CMB), 5  $\mu\text{L}$  de chaque suspension diluée ont été déposés sur des milieux MHB, puis incubés à 37°C pendant 12 heures (Guo et al., 2021).

- PNA: ZnO calciné NPs
- PNB: Zn O @ Amoxicilline NPs
- PNC:ZnO@ @QuercétineNPs



**Figure -6:** Effet des nanoparticules de ZnO sur la formation du biofilm bactérien (PNA, PNB, PNC).

## II.9. Activité anti-inflammatoire

### Évaluation comparative de ZnO pour l'inhibition de la dénaturation des protéines induite par la chaleur

L'activité anti-dénaturation de quatre composés d'origine végétale - codés sous le nom de XXXXX — a été évaluée à l'aide d'un test de dénaturation de l'albumine sérique bovine (*albumine sérique bovine*). L'expérience a été réalisée dans des tubes à essai avec un volume final de réaction ne dépassant pas 3,0 mL. Une solution fraîche d'*albumine sérique bovine* à

0,4 % (p/v) a été préparée dans du tampon Tris salin (TBS), et le pH a été ajusté à 6,4 à l'aide d'acide acétique glacé si nécessaire.

Chaque extrait végétal a été dissous dans de l'eau distillée et testé à six concentrations : 40, 20, 10, 5, 2,5 et 1,25 mg/mL. Pour chaque réaction, 1,0 mL de la solution *d'albumine sérique bovine* a été transféré dans un tube à essai, suivi par l'ajout d'un volume mesuré de la solution d'extrait végétal correspondant à la concentration souhaitée. Le volume total a été ajusté à 2,5 mL avec de l'eau distillée.

Les témoins négatifs étaient constitués uniquement *d'albumine sérique bovine* et d'eau distillée sans extrait, tandis que les témoins positifs ont été préparés en remplaçant l'extrait par de l'aspirine aux concentrations équivalentes, servant ainsi de référence standard. Tous les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 15 minutes, puis soumis à une dénaturation thermique en les chauffant à 55 °C pendant 10 minutes dans un bain-marie. Les échantillons ont ensuite été refroidis à température ambiante pendant 20 minutes.

La turbidité, reflétant le degré de dénaturation des protéines, a été mesurée par lecture de l'absorbance à 660 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible. Une valeur d'absorbance plus faible indiquait une inhibition plus élevée de la dénaturation des protéines, traduisant l'effet protecteur de l'échantillon contre l'agrégation des protéines induite par la chaleur (**Bailey-Shaw et al., 2017**).

Le pourcentage d'inhibition de la dénaturation des protéines a été calculé selon la formule suivante:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Absorbance du témoin} - \text{Absorbance de l'échantillon}}{\text{Absorbance du témoin}} \times 100$$

Où:

- Absorbance du témoin = Témoin négatif (sans XXXXX)
- Absorbance de l'échantillon = Valeur obtenue à partir des échantillons traités avec l'extrait végétal ou l'huile (**Bailey-Shaw et al., 2017**).



**Figure -7 ::** Étapes expérimentales de l'évaluation de l'activité anti-inflammatoire par inhibition de la dénaturation des protéines (d'albumine sérique bovine).

#### II.10. Analyse statistique:

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel Microsoft Excel. Les moyennes des différents paramètres étudiés ont été calculées, et des graphiques ont été élaborés afin de visualiser les variations et les tendances observées au sein des résultats. Cette approche descriptive a permis une interprétation claire et synthétique des données recueillies au cours de l'étude

# **Conclusion générale**

Ces dernières années, l'intérêt pour la nanotechnologie s'est accru en raison des propriétés uniques des matériaux lorsqu'ils sont réduits à l'échelle nanométrique, notamment en termes d'activité chimique, d'efficacité biologique et de multiples applications dans divers domaines tels que la médecine, la pharmacie, l'agriculture et même l'industrie. Parmi ces matériaux, les nanoparticules d'oxyde de zinc (ZnO-NP) ont attiré l'attention des chercheurs en raison de leurs propriétés antibactériennes et anti-inflammatoires, et de leur capacité à interagir avec les cellules de manière efficace.

D'autre part, on observe une tendance mondiale vers l'adoption de méthodes respectueuses de l'environnement pour la préparation des nanomatériaux, comme alternative aux méthodes physiques et chimiques qui peuvent être coûteuses ou nocives pour la santé et l'environnement. L'une de ces méthodes est la « synthèse verte », qui repose sur l'utilisation d'extraits de plantes comme source naturelle d'agents réducteurs et stabilisants pendant le processus de préparation.

Nous avons choisi les écorces de grenade comme source végétale naturelle riche en composés phénoliques et en antioxydants, qui contribuent efficacement au processus de réduction des ions zinc et de leur conversion en nanoparticules. Les pelures de grenade sont également considérées comme des déchets agricoles négligés et peuvent donc être exploitées de manière bénéfique et économique.

Dans cette recherche, nous avons préparé des nanoparticules de zinc à partir d'extrait d'écorce de grenade, et leurs propriétés physiques et chimiques ont été étudiées à l'aide de différentes techniques telles que l'UV-Visible, la diffraction des rayons X (DRX) et la FTIR. Ensuite, nous avons testé la bioactivité de ces particules en évaluant leur activité antibactérienne contre quatre types de bactéries : *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, ainsi qu'en étudiant leur effet anti-inflammatoire.

Ce travail vise à démontrer le potentiel de l'utilisation de matériaux naturels négligés pour préparer des nanoparticules hautement biologiquement actives, ouvrant de nouveaux horizons dans le domaine de la physiothérapie et de la prévention des maladies associées aux bactéries et aux infections.

### **1.Limites techniques et expérimentales**

Absence d'analyses spectroscopiques avancées, telles que:

TEM ou SEM pour l'observation précise de la forme et de la taille des nanoparticules.

DLS (Dynamic Light Scattering) pour déterminer la distribution granulométrique en solution.

Potentiel Zêta pour évaluer la stabilité colloïdale des nanoparticules.

Absence de mesure de la charge de surface des nanoparticules, un paramètre clé pour comprendre leur réactivité biologique.

Les analyses ont été réalisées exclusivement in vitro, sans validation par des essais in vivo sur des modèles biologiques, ce qui limite la portée biologique des résultats obtenus.

### **2.Limites liées aux souches biologiques**

Seules quatre souches bactériennes ont été testées, ce qui:

N'explore pas l'efficacité contre d'autres pathogènes importants, notamment des souches multirésistantes (ex. : *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*).

N'inclut pas l'évaluation de la cytotoxicité sur des cellules normales, indispensable pour vérifier la biocompatibilité.

### **3.Limites dans l'application des nanoparticules de ZnO**

L'encapsulation a été limitée à deux principes actifs seulement (quercétine et amoxicilline), sans comparaison avec d'autres molécules ni évaluation d'un éventuel effet synergique.

Le profil de libération du médicament et l'efficacité d'encapsulation (Loading efficiency) n'ont pas été évalués.

### **4. Limites de généralisation**

Seules les écorces de grenade ont été utilisées comme agent végétal réducteur, sans comparaison avec d'autres sources naturelles pouvant présenter une activité ou une efficacité de synthèse supérieure.

### **5.Limites dans l'étude des propriétés physiques**

La taille des particules n'a pas été déterminée à l'échelle nanométrique de manière précise, et la surface spécifique (analyse BET) n'a pas été mesurée.

### • Perspectives et suggestions pour les travaux futurs:

Dans le prolongement de ce travail, plusieurs pistes de recherche pourraient être envisagées:

Optimiser les conditions de synthèse (pH, température, concentration des extraits) afin d'améliorer la taille, la stabilité et la morphologie des nanoparticules enrobées.

Explorer d'autres extraits végétaux riches en composés bioactifs pour comparer leur efficacité dans la réduction et la stabilisation des nanoparticules.

Étudier le mécanisme d'action des nanoparticules sur les biofilms bactériens, notamment au niveau moléculaire, à l'aide de techniques avancées (microscopie électronique, spectroscopie FTIR...).

Évaluer la cytotoxicité des nanoparticules sur des lignées cellulaires humaines pour garantir leur innocuité en cas d'application biomédicale.

Tester l'efficacité des nanoparticules dans des modèles in vivo, en simulant des infections bactériennes, pour valider leur potentiel thérapeutique.

Intégrer les nanoparticules dans des formulations topiques (gels, crèmes, pansements) ou des matériaux de revêtement antimicrobiens pour des applications pratiques.

Étendre l'étude à d'autres types de micro-organismes comme les champignons ou les bactéries résistantes aux antibiotiques.

# **Références**

# **Bibliographique**

**Références**

1. Á. D. J. Ruíz-baltazar and S. Y. Reyes-lñpez, —Results in Physics Eco-friendly synthesis
2. A.J. Ullmann, J.H. Lipton, D.H. Vesole, P. Chandrasekar. A. Langston, S.R. Tarantolo, H. Greinix, W. Morais de Azevedo, V. Reddy, N. Boparai. (2007). Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *New England Journal of Medicine*. 356(4).
3. Abd ESM, El FNM, Mostafa SF, Hassan AEB (1998) Characterization of certain steroid hormones in granatum L. seeds. *Bulletin of the Faculty of Pharmacy (Cairo University)* 36.
4. Abdelmigid, H. M., Hussien, N. A., Alyamani, A. A., Morsi, M. M., AlSufyani, N. M., & Kadi, H. A.(2022) .
5. Abdelmigid, H. M., Hussien, N. A., Alyamani, A. A., Morsi, M. M., AlSufyani, N. M., & Kadi, H. A. (2022). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using pomegranate fruit peel and solid coffee grounds vs. chemical method of synthesis, with their biocompatibility and antibacterial properties investigation. *Molecules*, 27(4), 1236. <https://doi.org/10.3390/molecules27041236> Hashem, A. H., Salem, S. S., Attia, M. S., Gharib, F. A., & Fouda, A. (2023). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using brown algae extract: characterization, antioxidant, antimicrobial and photocatalytic activities. *Arabian Journal of Chemistry*, 16(1), 104523. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104523> Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Zhang, Y., & Corke, H. (2023). Antioxidant capacity of flavonoid compounds extracted from natural plants and their structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 410, 135402. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135402> Iqbal, J., Abbasi, B. A., Mahmood, T., Kanwal
6. Aboelfetoh, E. F., El-shenody, R. A., & Ghobara, M. M. (2017). Eco-friendly synthesis of silver nanoparticles using green algae (*Caulerpa serrulata*): Reaction optimization, catalytic and antibacterial activities. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(11). <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6033-0>
7. Adams LS, Seeram NP, Aggarwal BB (2006) Pomegranate juice, total pome-granate ellagitannins, and punicalagin suppress inflammatory cell signaling in colon cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 980-985

8. Adrolhosseini, S., Afiz, M. U. H., Bakar, A. B. U., Amchek, T., & Mahdi, M. O. H. D. A. D. (2020). Laser ablation synthesis of gold nanoparticles in tetrahydrofuran. *Journal of Physics: Conference Series*, 10(2), 323-331.
9. Adv. 2016, 6, 86762–86769. [CrossRef]
10. Afrasiabi, S., & Partoazar, A. (2024). Targeting bacterial biofilm-related genes with nanoparticle-based strategies. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1387114.
11. Aguilar, CN., Aguilera-Carbo, A., Robledo, A., Ventura, J., Belmares, R., Martinez, D et Contreras J. 2008. Production de nutraceutiques antioxydants au moyen de cultures à l'état solide de feuilles de zeste de grenade *Punica granatum* et de feuilles
12. Ahmed R, Ifzal SM, Saifuddin A, Nazeer M (1995) Studies on *Punica granatum*. I. Isolation and identification of some constituents from the seeds of *Punica granatum*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 8, 69-71
13. Ahmed, A., Usman, M., Liu, Q., Shen, Y., & Yu, B. (2019). Plant mediated synthesis of copper nanoparticles by using *Camelia sinensis* leaves extract and their applications in dye degradation. *Ferroelectrics*, 549(1), 61-69. <https://doi.org/10.1080/00150193.2019.1592544>
14. Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., & Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101(4), 1383–1392 .
15. Akroum, S. 2011. Etude Analytique et Biologique des Flavonoïdes Naturels. Département de Biologie Animale. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie. Université Mentouri de Constantine
16. Albano S M and Miguel M G (2020). Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. *Industrial Crops and*
17. Alighourchi, H., Barzegar, M and Abbasi, S. 2008. Anthocyanins characterization of 15 Iranian pomegranate *Punica granatum* L. varieties and their variation after cold storage and pasteurization. *European Food Research and Technology*, 2273 ,
18. Amato, F.; Tomaiuolo, R.; Nici, F.; Borbone, N.; Elce, A.; Catalanotti, B.; D'Errico, S.; Morgillo, C.M.; de Rosa, G.; Mayol, L.; et al.
19. Amendola, V., & Meneghetti, M. (2009). Laser ablation synthesis in solution and size manipulation of noble metal nanoparticles. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(20), 3805-3821. <https://doi.org/10.1039/b900654k>

20. Amer, M. W., & Awwad, A. M. (2021). Green synthesis of copper nanoparticles by Citrus limon fruits extract, characterization and antibacterial activity. *Chemistry International*, 7(1), 1-8.
21. and comprehensive evaluation of phenolic compounds in pomegranate *Punica granatum L.* juice by HPLC-MS. *Molecules*, 17, 14821–14840. [CrossRef] [PubMed].
22. antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia L. ssp. longifolia*. *Food chemistry*, 103, 1449-1456:.
23. *Appl. Mater. Interfaces* 2014, 6, 22004–22012. [CrossRef]
24. arrays from inkjet-printed nanoparticle seeds on a flexible substrate. *Langmuir* 2012, 28, 4787–4792 .
25. Aviram M, Rosenblat M, Gaitini D, Nitecki S (2004) Pomegranate juice consumption for 3 years by patients with carotid artery stenosis reduces common carotid intima-media thickness, blood pressure and LDL oxidation. *Clinical Nutrition* 23, 423-433
26. Aziz, N., Faraz, M., Pandey, R., Shakir, M., Fatma, T., Varma, A., Barman, I., & Prasad, R. (2015). Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: Synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. *Langmuir*, 31(42), 11605-11612.
27. Azzi, M., Laib, I., Bouafia, A., Medila, I., Tliba, A., Laouini, S. E., ... & Barhoum, A. (2024). Antimutagenic and anticoagulant therapeutic effects of Ag/Ag<sub>2</sub>O nanoparticles from *Olea europaea* leaf extract: mitigating metribuzin-induced hepato- and nephrotoxicity. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1485525
28. Bagri P, Ali M, Aeri V, Bhowmik M, Sultana S (2009) Antidiabetic effect of *Punica granatum* flowers: effect on hyperlipidemia, pancreatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes. *Food and Chemical Toxicology* 47, 50-54
29. Bailey-Shaw, Y. A., Williams, L. A., Green, C. E., Rodney, S., & Smith, A. M. (2017). In-vitro evaluation of the anti-inflammatory potential of selected jamaican plant extracts using the bovine serum albumin protein denaturation assay. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 47(1), 145-153.
30. Balkwill F, Charles KA, Mantovani A (2005) Smoldering inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell* 7, 211-217
31. Banik<sup>1</sup>, B. K., & Das, A. (2024). Antibacterial Effects of Beta-Lactam Antibiotics with Nanoparticles. *Chemistry and Biology of Beta-Lactams*, 304 .

32. Banik<sup>1</sup>, B. K., & Das, A. (2024). Antibacterial Effects of Beta-Lactam Antibiotics with Nanoparticles. *Chemistry and Biology of Beta-Lactams*, 304.
33. Barreca, D., Gattuso, E., Bellocco, A., Calderaro, D., Trombetta, A and Smeriglio, N. 2017. Flavanones: Agrumes phytochimique aux propriétés bénéfiques pour la santé. *BioFactors*, 43 4, 495–506. Doit: 10.1002 / biof.1363.
34. Basnet, P., Chanu, T. I., Samanta, D., & Chatterjee, S. (2018). A review on bio-synthesized zinc oxide nanoparticles using plant extracts as reductants and stabilizing agents. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 183, 201-221.
35. Beikzadeh, S., Khani, S., Mohammadi, R., & Amini, M. (2021). Combating biofilm-associated infections: Promising antimicrobial agents and surface modifications. *\*Expert Review of Anti-infective Therapy\**, 19(3), 297-313.
36. Bekro, Y. A., Mamyrbekova, J. A., Boua, B. B., Bi, F. T., & Ehile, E. E. (2007). Etude ethnobotanique et screening phytochimique de *Caesalpinia benthiana* (Baill.) Herend. et Zarucchi (Caesalpiniaceae). *Sciences & nature*, 4(2), 217-225.
37. Bello, S. A., Agunsoye, J. O., & Hassan, S. B. (2015). Synthesis of coconut shell nanoparticles via a top down approach: Assessment of milling duration on the particle sizes and morphologies of coconut shell nanoparticles. *Materials Letters*, 159, 514-519.
38. Belyagoubi, N et Benhammou N. 2011. Activité antioxydante des extraits des composés phénoliques de dix plantes médicinales de l'Ouest et du Sud-Ouest Algérien. Département de Biologie. Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers. Université
39. Benguerba, A. 2008. Etude phytochimique et de la phase Buta. Département de chimie. Faculté des sciences exactes. Université Mentouri Constantine. 104
40. Biaye, M. 2002. Action pharmacologiques des tanins. Département de pharmacie, faculté de médecine, de pharmacie et d'odonto-stomatologie. Université cheikh anta diop. Dakar. Pages: 53.
41. Bouaghi.
42. Bougherra, H. H., Bedini, S., Flamini, G., Cosci, F., Belhamel, K., & Conti, B. (2015). *Pistacia lentiscus* essential
43. Boumezoued, A. (2020). Etude et préparation par Sol-Gel de nanomatériaux à base d'oxydes semiconducteurs et leurs applications [Doctoral dissertation]. Université Larbi ben mhidi, Oum El Bouaghi.
44. Boussafeur M, Hadjéris L, (2012), Elaboration par spray pyrolyse et caractérisations

45. Brinker, C. J., & Scherer, G. W. (1990). Sol-gel science: The physics and chemistry of sol-gel processing. Gulf Professional Publishing.
46. Broadhurst, R. B., & Jones, W. T. (1978). Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29(9), 788–794 .
47. Brody, A. L., Bugusu, B., Han, J. H., Sand, C. K., & McHugh, T. H. (2008). Innovative food packaging solutions. *Journal of Food Science*, 73(8), R107-R116.
48. Caicedo, N.; Leturcq, R.; Raskin, J.P.; Flandre, D.; Lenoble, D. Detection mechanism in highly sensitive ZnO nanowires network
49. Çam, M., Hisil, Y et Durmaz, G. 2009. Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, 112 : 721–726 .
50. Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A and Akpulat H A (2023). Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts
51. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2023). Salmonella .
52. Charge Transfer Properties of F-Doped ZnO: A Spectroscopic Investigation. *J. Phys. Chem. C* 2017, 121, 16012–16020. [CrossRef]
53. Chen, M., Yu, Q., & Sun, H. (2018). Novel strategies for the prevention and treatment of biofilm related infections. *\*International Journal of Molecular Sciences\**, 19(10), 2896.
54. Choi, H., Raghavan, S., Shin, J., Kim, J., & Kim, K.-s. (2024). Bioconjugated zinc oxide–quercetin nanocomposite enhances the selectivity and anti-biofilm activity of ZnO nanoparticles against *Staphylococcus* species. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1-15.
55. Choi, H., Raghavan, S., Shin, J., Kim, J., & Kim, K.-s. (2024). Bioconjugated zinc oxide–quercetin nanocomposite enhances the selectivity and anti-biofilm activity of ZnO nanoparticles against *Staphylococcus* species. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1-15.
56. Conductance Regulator (CFTR) in Calu-3 Cells. *Molecules* 2018, 23, 71. [CrossRef] [PubMed]
57. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *\*Science\**, 284(5418), 1318-1322.
58. de créosote *Larrea tridentata*. *Technologie alimentaire et biotechnologie*, 46 2, 218.

59. de Nigris F, Williams-Ignarro S, Sica V, Lerman LO (2007) Effects of a pomegranate fruit extract rich in punicalagin on oxidation-sensitive genes and eNOS activity at sites of perturbed shear stress and atherogenesis. *Car-diovascular Research* 73, 414-423
60. Dean PDG, Exley D, Goodwin TW (1971) Steroid oestrogens in plants: reestimation of oestrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry* 10, 2215-2216
61. degradation by kinetic adsorption models, *Results Phys.*, vol. 12, pp. 989–995, 2019 ,
62. detection. *Microsys. Nanoeng.* 2015, 1, 1. [CrossRef]
63. Disease-Gene Expression. *Biomed Res. Int.* 2014, 2014, 610718. [CrossRef] [PubMed]
64. diseases, 43(Supplement 2), S95-S99
65. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H., & Adibkia, K. (2014). Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *\*Materials Science and Engineering: C\**, 44, 278-284.
66. doi: 10.1016/j.rinp.2018.12.037.
67. Duhan, J. S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K., & Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11-23. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.03.002>
68. Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269–275.
69. Elbehery, H. (2022). Insecticidal Activity of ZnO NPs Synthesized by Green Method Using Pomegranate Peels Extract on Stored Product Insects. *Egyptian Journal of Chemistry*, 65(4), 135-145 .
70. Elgareo PM, Salazar DM, Amoros A (1995) Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 253-256
71. Elgareo PM, Salazar DM, Amoros A (1995) Total lipids content and fatty acid composition of seed oils from six pomegranate cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 65, 253-256
72. El-Hamamsy, S. M. A., & El-Khamissi, H. A. Z. (2020). Phytochemicals, Antioxidant Activity and Identification of Phenolic Compounds by HPLC of Pomegranate Peel Extracts. *Journal of Applied Chemistry and Biotechnology*.
73. El-Hamamsy, S.M.A. et El-Khamissi, H.A.Z. (2020). Phytochimiques, activité antioxydante et identification des composés phénoliques par HPLC d'extraits d'écorces de grenade. *Journal de chimie appliquée et de biotechnologie* .

74. El-Nemr, SE., Ismail, IA et Ragab, M. 1990. Composition chimique du jus et des graines de grenade. *Food / Nahrung*, 34 7, 601–606. doi: 10.1002 / food.19900340706.
75. Elshayb, O. M., Farroh, K. Y., Amin, H. E., & Atta, A. M. (2021). Green synthesis of zinc oxide nanoparticles: Fortification for rice grain yield and nutrients uptake enhancement. *Molecules*, 26(3), 584.
76. Espitia, P. J. P., Soares, N. D. F. F., Coimbra, J. S. D. R., de Andrade, N. J., Cruz, R. S., & Medeiros, E. A. A. (2012). Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antimicrobial activity and food packaging applications. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1447-1464.
77. Eswari, K. M., Asaithambi, S., Karuppaiah, M., Sakthivel, P., Balaji, V., Ponelakkia, D., Yuvakkumar, R., Kumar, P., & Vijayaprabhu, N. (2022). Green synthesis of ZnO nanoparticles using *Abutilon Indicum* and *Tectona Grandis* leaf extracts for evaluation of anti-diabetic, anti-inflammatory and in-vitro cytotoxicity activities. *Ceramics international*, 48(22), 33624-33634.
78. Evreinoff, V. (1957). Contribution à l'étude du Grenadier - *Journal d'agriculture tropicale et de botanique appliquée* .Pp
79. Exploitation of a Very Small Peptide Nucleic Acid as a New Inhibitor of miR-509-3p Involved in the Regulation of Cystic Fibrosis
80. Extraction, characterization and antimicrobial activity of sulfated polysaccharides from fish skins. *International journal*
81. Fabbri, E.; Tamanini, A.; Jakova, T.; Gasparello, J.; Manicardi, A.; Corradini, R.; Sabbioni, G.; Finotti, A.; Borgatti, M.; Lampronti,
82. Fadavi, A., Barzegar, M., Azizi, MH et Bayat, M. (2005). Note. Composition physicochimique de dix genotypes de grenade (*Punica granatum* L.) cultivés en Iran. *Food Science and Technology International* , 11 (2), 113-119.
83. Feng, S.-H., & Li, G.-H. (2017). Hydrothermal and solvothermal syntheses. In *Modern Inorganic Synthetic Chemistry* (pp. 73-104).
84. Fernandez-Lopez J, Zhi N, Aleson-Carbonell L, Perez- Alvarez J A and Kuri V (2020). Antioxidant and antibacterial activities of natural extracts: application in beef meatballs. *Meat Science*, 69, 371-380.
85. Flavonoid-functionalized ZnO nanoparticles: synthesis and FTIR investigation. *Materials Chemistry and Physics*, 296, 127094. Zhang, Y. et al.(2021) .
86. Fleming, D., & Rumbaugh, K. P. (2017). Approaches to dispersing medical biofilms. *\*Microorganisms\**, 5(2), 15.

87. Fletcher, B.S. et al., Structure of the mitogen-inducible TIS10 gene and demonstration that the TIS10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase, *J. Biol. Chem.*, 267, 4338, 1992.
88. from the marine angiosperm *Cymodocea nodosa*. *Tetrahedron*, 64: 1696
89. Fuhrman B, Aviram M (2001) Flavonoid protect LDL from oxidation and attenuate atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology* 12, 41-48
90. Fytianos, G., Rahda, A., & Kyzas, G. Z. (2020). Nanomaterials in cosmetics: Recent updates. *Nanomaterials*, 10, 979.
91. G. Aad, B. Abbott, J. Abdallah, A. Abdelalim, A. Abdesselam, O. Abdinov. B. Abi, M. Abolins, H. Abramowicz, H. Abreu. (2010). The ATLAS simulation infrastructure. *The European Physical Journal C*. 70(3): 823-874.
92. G. E. J. Poinern, *A Laboratory Course in Nanoscience and Nanotechnology*. 2014.
93. Gardea-Torresdey, J. L., Gomez, E., Peralta-Videa, J. R., Parsons, J. G., Troiani, H., & Jose-Yacamán, M. (2003). Alfalfa sprouts: A natural source for the synthesis of silver nanoparticles. *Langmuir*, 19(4), 1357-1361.
94. gas sensors. *Sens. Actuators B* 2019, 297, 126602. [CrossRef]
95. Ghaemi, F., Amiri, A., Bajuri, M. Y., Yuhana, N. Y., & Ferrara, M. (2021). Role of different types of nanomaterials against diagnosis, prevention and therapy of COVID-19. *Sustainable Cities and Society*, 72, 103046.
96. Gholami-Shabania, M., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Amini, A., Gholami-Shabani, Z., Imani, A., Chiani, M., Riazi, G., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2015). Enzymatic synthesis of gold nanoparticles using sulfite reductase purified from *Escherichia coli*: A green eco-friendly approach. *Process Biochemistry*, 50, 1076-1085.
97. Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M., Kader, A.A., 2000. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4581-4589.
98. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Pomegranate Fruit Peel and Solid Coffee Grounds vs. Chemical Method of Synthesis, with Their Biocompatibility and Antibacterial Properties Investigation. *Molecules*, 27(4), 1236 .
99. Gulluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A& Ozkan, H. (2017). Antimicrobial and

100. Guo CJ, Wei JY, Yang JJ, Xu J, Li YF, Pang W (2007) The comparative study on improvement of antioxidant function in the elderly by consumption of pomegranate or apple juices. *Acta Nutrimenta Sinica* 29, 292-294
101. Guo, H.-N., et al., Novel Hybrid Peptide Cathelicidin 2 (1-13)-Thymopentin (TP5) and Its Derived Peptides with Effective Antibacterial, Antibiofilm, and Anti-Adhesion Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. 22(21): p. 11681.
102. H.-C. Flemming and J. Wingender, The biofilm matrix, *Nat. Rev. Microbiol.*, 2010, 8(9), 623-633.
103. Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *\*Trends in Biotechnology\**, 30(10), 499-511.
104. Halvorsen BL, Holte K, Myhrstad MC, Barikmo I, Hvattum E, Remberg SF, Wold AB, Haffner K, Baugerod H, Andersen LF, Moskaug O, Blomhoff R (2002) A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. *Journal of Nutrition* 132, 461-471
105. Harborne . JB, (1973), *Phytochemical Methods. A Guide to Modern Techniques of plant analysis*, Chapman and Hall Ltd, London, 49-188.
106. -Heftmann E, Ko ST, Bennet RD (1966) Identification of estrone in pomegranate seeds. *Phytochemistry* 5, 1337-1341
107. Hemingway, R.W. 1992. Structural variation in proanthocyanidins and their derivatives. In : *Lpant polyphenols: synthesis, properties, significande*. Hemingway R W, Laks P. E. New York .
108. Hepaksoy, S., Aksoy, U., Can, H.Z and Ui, M.A. 2000. Determination of relationship between fruit cracking and some physiological responses, leaf characteristics and nutritional status of some pomegranate varieties. *Options Méditerranéennes Série A, Séminaires Méditerranéens* 42:87–92.
109. Hirao, T., Kamada, T., Matsumura, H., Tabata, A., & Kamijo, H. (2003). Nanoparticle synthesis by ionizing source gas in chemical vapor deposition. *Japanese Journal of Applied Physics*, 42, L77-L79. <https://doi.org/10.1143/JJAP.42.L77>
110. Huang TH, Yang HQ, Harada M, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li Y (2005b) Pomegranate flower extract diminishes cardiac fibrosis in Zucker diabetic fatty rats: modulation of cardiac endothelin-1 and nuclear factor-kappa B pathways. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 46, 856-862

111. Hulkoti, N. I., & Taranath, T. C. (2014). Biosynthesis of nanoparticles using microbes — A review. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 121, 474-483. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.027>
112. I (2005) Possible synergistic prostate cancer suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. *Investigational New Drugs* 23, 11-20
113. I.; et al. A peptide nucleic acid against microRNA miR-145-5p enhances the expression of the Cystic Fibrosis Transmembrane
114. Iavicoli, I., Leso, V., Beezhold, D. H., & Shvedova, A. A. (2017). Nanotechnology in agriculture: Opportunities, toxicological implications, and occupational risks. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 329, 96-111.
115. Ignarro LJ, Byrns RE, Sumi D, de Nigris F, Napoli C (2006) Pomegranate juice protects nitric oxide against oxidative destruction and enhances the biological actions of nitric oxide. *Nitric Oxide* 15, 93-102
116. Ijaz, I., Gilani, E., Nazir, A., & Bukhari, A. (2020). Detail review on chemical, physical and green synthesis, classification, characterizations and applications of nanoparticles. *Green Chemistry Letters and Reviews*. <https://doi.org/10.1080/17518253.2020.1802517>
117. Interaction of antibiotics with ZnO nanoparticles: structural and FTIR studies. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102310.
118. Intervention of antioxidant system function of aged rats by giving fruit juices with different antioxidant capacities. *Chinese Journal of Preventive Medicine* 39, 80-83
119. Iqbal, J., Abbasi, B. A., Ahmad, R., Mahmood, T., Kanwal, S., Ali, B., Khalil, A. T., Shah, S. A., Alam, M. M., & Shinwari, Z. K. (2020). Biogenic synthesis of green and cost effective iron nanoparticles and evaluation of their potential biomedical properties. *Journal of Molecular Structure*, 1199. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.126979>
120. J.G. March, J.P. Olsen. (2010). *Rediscovering institutions*. Simon and Schuster: pp.
121. Jafri MA, Aslam M, Javed K, Singh S (2000) Effect of Punica granatum Linn. (flowers) on blood glucose level in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 309-314
122. Janne, J. et al., Genetic approaches to the cellular functions of polyamines in mammals, *Eur. J. Biochem.*, 271, 877, 2004.
123. Jayakumar, A., Heera, K. V., Sumi, T. S., Joseph, M., Mathew, S., Praveen, G., Nair, I. C., & Radhakrishnan, E. K. (2019). Starch-PVA composite films with zinc-oxide

- nanoparticles and phytochemicals as intelligent pH sensing wraps for food packaging application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 136, 395-403.
124. Jayakumar, R., Yusoff, A. R. M., Hadibarata, T., Palvannan, T., Sathishkumar, P., & Vennila, K. (2016). Phyto synthesis of silver nanoparticles using *Alternanthera tenella* leaf extract: An effective inhibitor for the migration of human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 651-659.
125. Jiang, H., Wang, H., & Wang, X. (2011). Facile and mild preparation of fluorescent ZnO nanosheets and their bioimaging applications. *Applied Surface Science*, 257(15), 6991-6995.
126. Jiang, N., Doseff, A.I and Erich, G. 2016. Flavones: From Biosynthesis to Health Benefits. Academic Editor: Ulrike Mathesius. Jung, B et Curtay, J.P. 2010. La grenade, aliment-plus. Ed .marco pietteur , P : 09- 10.
127. Jiang, Y., Zhang, L., Wen, D., & Ding, Y. (2016). Role of physical and chemical interactions in the antibacterial behavior of ZnO nanoparticles against *E. coli*. *Materials Science and Engineering C*, 69, 1361-1366.
128. Kathirvelu, S., D'Souza, L., & Dhurai, B. (2009). UV protection finishing of textiles using ZnO nanoparticles. *Indian Journal of Fibre & Textile Research*, 34, 267-273.
129. Kayani, Z. N., Umer, M., & Riaz, S. (2015). Characterization of copper oxide nanoparticles fabricated by the sol–gel method. *Journal of Electronic Materials*, 44(3), 3704-3709. <https://doi.org/10.1007/s11664-015-3867-5>
130. Khan, A. U., Malik, N., Khan, M., Cho, M. H., & Khan, M. M. (2018). Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 41(1). <https://doi.org/10.1007/s00449-017-1846-3>
131. Khan, M. N., Khan, T. A., Khan, Z., & AL-Thabaiti, S. A. (2015). Green synthesis of biogenic silver nanomaterials using *Raphanus sativus* extract, effects of stabilizers on the morphology, and their antimicrobial activities. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38, 2397-2416.
132. Khandel, P., & Kumar, S. (2018). Mycogenic nanoparticles and their bio-prospective applications: Current status and future challenges. *Journal of Nanostructure Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s40097-018-0285-2>
133. Kharissova, O. V., Dias, H. V. R., Kharisov, B. I., Pérez, B. O., & Pérez, V. M. J. (2013). The greener synthesis of nanoparticles. *Trends in Biotechnology*, 31(4), 240-248.

134. Kim, M., Osone, S., Kim, T., Higashi, H., & Seto, T. (2017). Synthesis of nanoparticles by laser ablation: A review. *KONA Powder and Particle Journal*, 34, 80-90. <https://doi.org/10.14356/kona.2017009>
135. Kitture, R., Chordiya, K., Gaware, S., Ghosh, S., More, P. A., Kulkarni, P., Chopade, B. A., & Kale, S. N. (2015). ZnO nanoparticles-red sandalwood conjugate: A promising anti-diabetic agent. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(6), 4046-4051.
136. Ko, S.H.; Ko, S.H.; Lee, D.; Hotz, N.; Yeo, J.; Hong, S.; Nam, K.H.; Grigoropoulos, C.P. Digital selective growth of ZnO nanowire
137. Kontiza, I., Stavri, M., Zloh, M., Vagias, C., Gibbons, S& Roussis, V. (2018). New metabolites with antibacterial activity
138. Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., & Hall-Stoodley, L. (2017). Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *\*Nature Reviews Microbiology\**, 15(12), 740-755.
139. Krichen, F., Karoud, W., Sila, A. d., Abdelmalek, B. E., Ghorbel, R., Ellouz-Chaabouni, S& Bougatef, A(2015) .
140. Krishna V, Sharma S, Pareek RB, Singh P (2002) Terpenoid constituents from some indigenous plants. *Journal of the Indian Chemical Society* 79, 550-552
141. Kumar, B. et al. (2021). Thermal treatment and structural characterization of green ZnO nanoparticles. *Journal of Nanoscience*, 34(2), 115–122. Prakash, J. et al. (2022). Plant-mediated synthesis of nanoparticles and their biomedical applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 45–59. El-Baz, F. K. et al.(2023) .
142. Kumar, B., Smita, K., Seqqat, R., Benalcazar, K., Grijalva, M., & Cumbal, L. (2016). In vitro evaluation of silver nanoparticles cytotoxicity on Hepatic cancer (Hep-G2) cell line and their antioxidant activity: Green approach for fabrication and application. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 159, 8-13.
143. Kushwaha, A., Singh, V. K., Bhartariya, J., & Singh, P. (2015). Isolation and identification of *E. coli* bacteria for the synthesis of silver nanoparticles: Characterization of the particles and study of antibacterial activity. *European Journal of Experimental Biology*, 5, 65-70.
144. Lansky EP, Jiang W, Mo H, Bravo L, Froom P, Yu W, Harris NM, Neeman
145. Lansky, E et Newman R. 2007. *Punica granatum* pomegranate and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*.109: 177–206.

146. Laouini SE, Bouafa A, Soldatov AV, Algarni H, Tedjani ML, Ali GAM, Barhoum A (2021) Green ont synthétisé des nanoparticules Ag/Ag<sub>2</sub>O à l'aide d'extraits aqueux de feuilles de Phoenix dactylifera L. et de leur photodégradation de colorant azoïque. *Membranes* 11(7):468
147. Legua, P., Melgarejo, P., Martínez, M., Hernández, F. 2000. Evolution of sugars and organic acid content in three
148. Levin G.M. (2006) Pomegranate (1st Edn), Third Millennium Publishing, East Libra Drive Tempe, AZ, 1-129.
149. Lewis, K. (2007). Persister cells, dormancy and infectious disease. *\*Nature Reviews Microbiology\**, 5(1), 48-56.
150. Li H, Frstermann U (2000) Nitric oxide in the pathogenesis of vascular dis-ease. *Journal of Pathology* 190, 244-254
151. Li HX, Wang Z, Liu YZ (2002) Progress in studies on chemical constituents and pharmacological effects of Punicaceae. *Chinese Traditional and Herbal Drugs* 33, 765-769
152. Li YF, Guo CJ, Yang JJ (2005) Effects of pomegranate peel extracts on anti-oxidant capacity and lipid metabolism in hyperlipidemic mice. *Journal of Nutrition* 27, 483-486
153. Li YF, Guo CJ, Yang JJ (2006) Comparison of the protective effects on vascular endothelial cells in oxidative stress between extracts from pomegranate peel and pulp. *Chinese Journal of Clinical Rehabilitation* 33, 81-83
154. Li, X.; Wang, Y.H.; Zhao, C.; Liu, X. Paper-based piezoelectric touch pads with hydrothermally grown zinc oxide nanowires. *ACS*
155. Li, X.; Zhao, C.; Liu, X. A paper-based microfluidic biosensor integrating zinc oxide nanowires for electrochemical glucose
156. Liang, Y., Wang, H., Casalongue, H.S., Chen, Z., & Dai, H. (2010). TiO<sub>2</sub> nanocrystals grown on graphene as advanced photocatalytic hybrid materials. *Nano Research*, 3(10), 701-705. <https://doi.org/10.1007/s12274-010-0033-5>
157. Lugscheider, E., Bärwulf, S., Barimani, C., Riester, M., & Hilgers, H. (1998). Magnetron-sputtered hard material coatings on thermoplastic polymers for clean room applications. *Surface and Coatings Technology*, 108, 398-402.
158. M. Haidari, M. Ali, S.W. Casscells, M. Madjid. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*. 16(12): 1127-1136.

159. Madsen, J. S., Burmølle, M., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *\*FEMS Immunology & Medical Microbiology\**, 65(2), 183-195.
160. Mandal, R. P., Sekh, S., Sen Sarkar, N., Chattopadhyay, D., & De, S. (2016). Algae mediated synthesis of cadmium sulphide nanoparticles and their application in bioremediation. *Materials Research Express*, 3(5), 1-11. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/3/5/055007>
161. Manjamadha, V. P., & Muthukumar, K. (2016). Ultrasound assisted green synthesis of silver nanoparticles using weed plant. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39, 401-411.
162. Maria, B. S., Devadiga, A., Kodialbail, V. S., & Saidutta, M. B. (2015). Synthesis of silver nanoparticles using medicinal *Zizyphus xylopyrus* bark extract. *Applied Nanoscience*, 5, 755-762.
163. Mariadoss, A. V. A., Saravanakumar, K., Sathiyaseelan, A., & Vishven, K. (2022). Enhancement of anti-bacterial potential of green synthesized selenium nanoparticles by starch encapsulation. *Microbial Pathogenesis*, 167, 26-28.
164. Mars M. (2000). Pomegranate plant material genetic resources and breeding: a review. *Seminaires Mediterraneens* 42: 55-62.
165. Martínez-Carmona, M., & Vallet-Regí, M. (2020). Advances in laser ablation synthesized silicon-based nanomaterials for the prevention of bacterial infection. *Nanomaterials*, 10(8), 1-18. <https://doi.org/10.3390/nano10081443>
166. Melgarejo, P., Salazar, D.M and Artes, F. 2000. Organic acids and sugarscomposition of harvested pomegranate fruits. *Eur. Food Res. Technol.* 211, 185-190
167. Mena, P., Calani, L., Dall'Asta, C., Galaverna, G., García-Viguera, C., Bruni, R., Crozier, A and Del Rio, D. 2012. *Rapid*
168. Menon, S., Rajeshkumar, S., & Kumar, V. (2017). A review on biogenic synthesis of gold nanoparticles, characterization, and its applications. *Resource-Efficient Technologies*, 3(4), 516-527. <https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.08.002>
169. Mihranyan, A., Ferraz, N., & Stromme, M. P. (2012). Current status and future prospects of nanotechnology in cosmetics. *Progress in Materials Science*, 57, 875-910.
170. Minegishi, K., Koiwai, Y., Kikuchi, Y., Yano, K., Kasuga, M., & Shimizu, A. (1997). Growth of p-type zinc oxide films by chemical vapor deposition. *Japanese Journal of Applied Physics*, 36, 53-55.

171. Mir, N., Saif, M., Dubey, F. (2008). Synthesis and characterization of metallic copper nanoparticles via thermal decomposition. *Polyhedron*, 27(17), 3514-3518.
172. Mizukoshi, Y., Oshima, R., Maeda, Y., & Nagata, Y. (1999). Preparation of platinum nanoparticles by sonochemical reduction of the Pt(II) ion. *Langmuir*, 15(8), 2733-2737.
173. Mohammadgholi Pour, M. B., Doudi, M., Ahadi, A. M., & Amiri, G. R. (2024). Investigating the interaction of zno nanoparticles with flagellum and fimbriae in multi-drug resistant uropathogenic bacteria encoding fli and fim genes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 55(3), 2727-2738 .
174. Mohammed, H. A., Laouini, S. E., Meneceur, S., Azzi, M., Salmi, C., Hasan, G. G., ... & Abdullah, J. A. A. (2025). Biosynthesis and Characterization of Cefazolin-Loaded Magnesium Oxide/Polyethylene Glycol Nanocomposites: Antimicrobial Efficacy, Anticoagulant Potential, and In Vivo Toxicity Studies. *ChemistrySelect*, 10(3), e202404984.
175. Morton J. (1987) *Fruits of warm climates*. Miami, FL.
176. Muhammad, W., Ullah, N., Haroon, M., & Abbasi, B. H. (2019). Optical, morphological and biological analysis of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using *Papaver somniferum* L. *RSC Advances*, 9(51), 29541-29548. <https://doi.org/10.1039/c9ra04424h>
177. N. Al-Zoreky. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica granatum* L.) fruit peels. *International journal of food microbiology*. 134(3): 244-248.
178. Nel, A., Xia, T., Mädler, L., & Li, N. (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627.
179. Neuhofer H, Witte L, Gorunovic M (1993) Alkaloids in the bark of *Punica granatum* L. (pomegranate) from Yugoslavia. *Pharmazie* 48, 389-391
180. Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L (2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 166-171
181. Noda Y, Kaneyuka T, Mori A, Packer L (2002) Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 166-171
182. Nouri, L., et al. (2020). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Punica granatum* peel extracts .

183. Nugteren DH, Christ-Hazelhof E (1987) Naturally occurring conjugated octadecatrienoic acids are strong inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins* 33, 403-417
184. Nurul Aini, A., Al Farraj, D. A., Endarko, E., Rubiyanto, A., Nur, H., Al Khulaifi, M. M., Hadibarata, T., & Syafiuddin, A. (2019). A new green method for the synthesis of silver nanoparticles and their antibacterial activities against gram-positive and gram-negative bacteria. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 66(7), 705-712. <https://doi.org/10.1002/jccs.201800412>
185. of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 87, 215-220.
186. of biological macromolecules, 75, 283-289.
187. of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles : Evaluation of their catalytic activity in methylene blue
188. Ohira, T., & Yamamoto, O. (2012). Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics. *Chemical Engineering Science*, 68(1), 355-361.
189. oil has repellent effect against three major insect pests of pasta. *Industrial Crops and Products*, 63: 249-255.
190. Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. et Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparaison des capacités antioxydantes et des cytotoxicités de certaines pelures de fruits. *Chimie alimentaire* , 103 (3), 839-846 .
191. Okumura, M., Tsubota, S., & Haruta, M. (2003). Preparation of supported gold catalysts by gas-phase grafting of gold acetylacetonate for low-temperature oxidation of CO and of H<sub>2</sub>. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 199(1-2), 73-84.
192. O'Neill, J. (2016). \*Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations\*. Review on Antimicrobial Resistance.
193. O'Toole GA, Kolter R (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30(2):295-304. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01062.x>
194. Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., ... & Zbořil, R. (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65-71.
195. Papari, G.P.; Silvestri, B.; Vitiello, G.; de Stefano, L.; Rea, I.; Luciani, G.; Aronne, A.; Andreone, A. Morphological, Structural, and

196. Park HM, Moon E, Kim AJ, Kim MH, Lee S, Lee JB, Park YK, Jung HS, Kim YB, Kim SY (2010) Extract of *Punica granatum* inhibits skin photoaging induced by UVB irradiation. *International Journal of Dermatol-ogy* 49, 276-282
197. Partie pratique
198. Patra, J. K., Das, G., & Baek, K. H. (2016). Phytomediated biosynthesis of silver nanoparticles using the rind extract of watermelon (*Citrullus lanatus*) under photo catalyzed condition and investigation of its antibacterial, anticandidal and antioxidant efficacy. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 200-210.
199. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *\*Journal of Nanobiotechnology\**, 16(1), 71.
200. Peulen, T. O., & Wilkinson, K. J. (2011). Diffusion of nanoparticles in a biofilm. *\*Environmental Science & Technology\**, 45(8), 3367-3373.
201. polysaccharide from the brown marine algae *Sargassumswartzii*. *Chin. J. Nat. Med*, 10 : 421-428.
202. pomegranate genotypes *Punica granatum* L..
203. Poyrazoğlu, E., Gökmen, V., & Artık, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica granatum* L.) grown in Turkey. *Journal of food composition and analysis*, 15(5), 567-575.
204. Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: Mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International Nano Letters*, 2(32), 1-10.
205. Prasad, T. N. V. K., Sudhakar, P., & Sreenivasulu, Y. (2012). Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *Journal of Plant Nutrition*, 35(6), 905-927.
206. Prasek, J., Drbohlavova, J., Chomoucka, J., Hubalek, J., Jasek, O., Adamc, V., & Kizek, R. (2011). Methods for carbon nanotubes synthesis—review. *Journal of Materials Chemistry*.(40) ,
207. Prerna, Kumari, P., Kumar, N., Kumar, M., Tyagi, M., & Kumar, R. (2020). Morphological and optical characterization of sol-gel synthesized Ni-doped ZnO nanoparticles. *Integrated Ferroelectrics*, 205(1), 1-13. <https://doi.org/10.1080/10584587.2019.1674992>

- 208.** Products, 1-6 Sharma, C.; Awasthi, S.K. Versatility of peptide nucleic acids (PNAs): Role in chemical biology, drug discovery, and origins of life *Chem. Biol. Drug Des.* 2017, 89, 16–37. [CrossRef].
- 209.** Quester, K., Avalos-Borja, M., & Castro-Longoria, E. (2013). Biosynthesis and microscopic study of metallic nanoparticles. *Micron*, 54-55, 1-27. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2013.07.003>
- 210.** Qureshi N (2009) Beneficial biofilms: wastewater and other industrial applications. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW (eds) *Biofilms in the food and beverage industries*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead, Cambridge, pp 474-498.
- 211.** Rafique, M., Sadaf, I., Rafique, M. S., & Tahir, M. B. (2017). A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45(7), 1272-1291. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792>
- 212.** Rahal, J. J (2020). Novel antibiotic combinations against infections with almost completely resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. *Clinical infectious*
- 213.** Raj, S., Jose, S., Sumod, U. S., & Sabitha, M. (2012). Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4, 186-193.
- 214.** Rajeshkumar, S., & Rinitha, G. (2018). Nanostructural characterization of antimicrobial and antioxidant copper nanoparticles synthesized using novel *Persea americana* seeds. *Open Nano*, 3, 18-27. <https://doi.org/10.1016/j.onano.2018.03.001>
- 215.** Rajeshkumar, S., Malarkodi, C., Paulkumar, K., Vanaja, M., Gnanajobitha, G., & Annadurai, G. (2014). Algae mediated green fabrication of silver nanoparticles and examination of its antifungal activity against clinical pathogens. *International Journal of Metals*, 2014, 8.
- 216.** Rautela, A., Rani, J., & Debnath, M. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles from *Tectona grandis* seeds extract: Characterization and mechanism of antimicrobial action on different microorganisms. *Journal of Analytical Science and Technology*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40543-018-0163-z>
- 217.** Ravichandran et al., 2022 (*Applied Nanoscience*).El-Naggar et al., 2023 (*Journal of Molecular Liquids*).Majeed et al., 2021 (*Materials Science in Semiconductor Processing*)

218. rdogan, O., Abbak, M., Demirbolat, G. M., Birtekocak, F., Aksel, M., Pasa, S., & Cevik, O. (2019). Green synthesis, characterization, anti-bacterial and cytotoxic effects of zinc oxide nanoparticles using aqueous extract of artichoke leafs. *Duzce Medical Journal*, 21(1), 19-26. <https://doi.org/10.18678/dtfd.482351>
219. Reddy, K. M., Feris, K., Bell, J., Wingett, D. G., Hanley, C., & Punnoose, A. (2007). Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. *Applied Physics Letters*, 90(21), 213902.
220. Rolim, W. R., Pelegrino, M. T., de Araújo Lima, B., Ferraz, L. S., Costa, F. N., Bernardes, J. S., Rodrigues, T., Brocchi, M., & Seabra, A. B. (2018). Green tea extract mediated biogenic synthesis of silver nanoparticles: Characterization, cytotoxicity evaluation and antibacterial activity. *Applied Surface Science*. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2018.08.203>
221. S. Çam and İ. Badilli, The effect of NaCl, pH, and phos-phate on biofilm formation and exopolysaccharide pro-duction by high biofilm producers of Bacillus strains, *Folia Microbiol.*, 2024, 69(3), 613-624.
222. S. Sharma, J. Mohler, S. D. Mahajan, et al., Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment, *Microorganisms*, 2023, 11(6), 1614.
223. Sabir, S., Arshad, M., & Chaudhari, S. K. (2014). Zinc oxide nanoparticles for revolutionizing agriculture: Synthesis and applications. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-4.
224. Salah, N., Habib, S. S., Khan, Z. H., Memic, A., Azam, A., Alarfaj, E., Zahed, N., & Al-Hamed, S. (2011). High-energy ball milling technique for ZnO nanoparticles as antibacterial material. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 863-869. <https://doi.org/10.2147/ijn.s18267>
225. Sathiyaraj, S., Suriyakala, G., Almaary, K. S., Chen, T.-W., & Kaviyarasu, K. (2021). Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*, 14(12), 1842-1847.
226. Scherrer, P. (1918). Bestimmung der Grosse und der inneren struktur von kolloidteilichen mittels Rontgenstrahlen, nachrichten von der von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Gottingen. *Mathmatisch-Physikalische Klasse*, 98-100.
227. Schubert SY, Lansky EP, Neeman I (1999) Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 66, 11-17

228. Sebeia, N., Jabli, M., & Ghith, A. (2019). Biological synthesis of copper nanoparticles, using Nerium oleander leaves extract: Characterization and study of their interaction with organic dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 105, 36-46. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.04.023>
229. Seeram NP, Lee R, Heber D (2004) Bioavailability of ellagic acid in human plasma after consumption of ellegitannins from pomegranate (*Punica grana-tum*) juice. *International Journal of Clinical Chemistry* 348, 63-68
230. Shaban, M., et al. (2018). Antibacterial activity of pomegranate peel extracts against multidrug-resistant bacteria
231. Shah, M., Fawcett, D., Sharma, S., & Tripathy, S. K. (2015). Green synthesis of metallic nanoparticles via biological entities. *Materials*, 8(11), 7278-7308. <https://doi.org/10.3390/ma8115377>
232. Shah, P., & Gavrin, A. (2006). Synthesis of nanoparticles using high-pressure sputtering for magnetic domain imaging. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 301(1), 118-123.
233. Sharma, R., Basist, P., Alhalimi, A., Khan, R., Noman, O. M., & Alahdab, A. (2023). Synthesis of quercetin-loaded silver nanoparticles and assessing their anti-bacterial potential. *Micromachines*, 14(12), 2154. <https://doi.org/10.3390/mi14122154>
234. Sharma, V., Anderson, D., & Dhawan, A. (2012). Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS-triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis*, 17(8), 852-870.
235. Shukla, A. K., & Iravani, S. (2017). Metallic nanoparticles: Green synthesis and spectroscopic characterization. *Environmental Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0618-2>
236. Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1), 49-55.
237. Sofowara A. (1989). Medicinal plants and Traditional medicine in Africa, Spectrum Books Ltd, Ibadan, Nigeria, 1993, 191-289. GE Trease ; WC Evans, Pharmacognosy, , 11, 45-50
238. Solid phase synthesis of a thrombin binding aptamer on macroporous silica for label free optical quantification of thrombin. *RSC*
239. Stewart, P. S., & Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *\*The Lancet\**, 358(9276), 135-138.

240. structurales de couches minces d'oxyde de zinc, Université Larbi ben mhidi .Oum El
241. Sudheesh S, Vijayalakshmi NR (2005) Flavonoids from *Punica granatum*-potential antiperoxidative agents. *Fitoterapia* 76, 181-186
242. Sundararajan, B., Ramesh, S., & Mathivanan, N. (2016). *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 16, 264
243. Surveswaran S, Cai YZ, Corke H, Sun M (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry* 102, 938-953
244. Suyundikov, B., et al. (2024). Détermination des activités antioxydantes et antimicrobiennes de l'extrait d'écorce de grenade et de sa composition phytochimique. *BIO Web of Conferences*, 69, 01038.
245. Sweidan, N., et al. (2023). Phytochemical analysis, antioxidant, and antimicrobial activities of Jordanian Pomegranate peels. *PLoS ONE*, 18(11), e0295129.
246. Syed, A., Saraswati, S., Kundu, G. C., & Ahmad, A. (2013). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Humicola* sp. and evaluation of their cytotoxicity using normal and cancer cell lines. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 114, 144-147.
247. Tanaka T, Nonaka G, Nishioka I (1986) Tannins and related compounds XI. Revision of the structure of punicalin and punicalagin, and isolation and characterization of 2-O-galloylpunicalin from the bark of *Punica granatum* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 34, 650-655
248. Terracciano, M.; de Stefano, L.; Borbone, N.; Politi, J.; Oliviero, G.; Nici, F.; Casalino, M.; Piccialli, G.; Dardano, P.; Varra, M.; et al.
249. Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 6(2), 257-262. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.07.002>
250. Todar, K. (2020). *Todar's Online Textbook of Bacteriology: Escherichia coli* .
251. Tom HW, Huang GP, Bhavani PK, Li GQ, Yamahara J, Roufogalis BD, Li YH (2005) Anti-diabetic action of *Punica granatum* flower extract: activation of PPAR- $\gamma$  and identification of an active component. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207, 160-169
252. Tong, S. Y. C., Davis, J. S., Eichenberger, E., Holland, T. L., & Fowler Jr, V. G. (2015). *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), 603–661 .

- 253.** Ünal Turhan E, Erginkaya Z, Korukluoğlu M, Konuray G (2019) Beneficial biofilm applications in food and agricultural industry. In: Malik A, Erginkaya Z, Erten H (eds) Health and safety aspects of food processing technologies. Springer, Cham, pp 445-469. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8_15).
- 254.** Vanin dos Santos Lima, M., Calixto da Silva, L., Pinto da Silva, L., Nascimento, T. G., Mendonça Junior, F. J. B., Petrônio da Silva, F., Wanderley, A. G., & Militão, G. C. G. (2022). Green synthesis of silver nanoparticles using *Ilex paraguariensis* extracts: Antimicrobial activity and acetylcholinesterase modulation in rat brain tissue. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 15(1), 126-136. <https://doi.org/10.1080/17518253.2021.2024896>
- 255.** Verbic, A., Gorjanc, M., & Simoncic, B. (2019). Zinc oxide for functional textile coatings: Recent advances. *Coatings*, 9, 550.
- 256.** Verma, V. C., Kharwar, R. N., & Gange, A. C. (2010). Biosynthesis of antimicrobial silver nanoparticles by the endophytic fungus *Aspergillus clavatus*. *Nanomedicine*, 5(1), 33-40.
- 257.** Vijayabaskar, P., Vaseela, N& Thirumaran, G. (2012). Potential antibacterial and antioxidant properties of a sulfated
- 258.** Vrielynck, L. (1996). Structures et propriétés spectroscopiques de la flavone, de la 3 hydroxy-et de la 5 hydroxy-flavone: étude des liaisons hydrogène intra-et inter-moléculaires (Doctoral dissertation, Lille 1).
- 259.** Wang RF, Wang W, Wang L, Liu RN, Ding Y, Du LJ (2006a) Constituents of the flowers of *Punica granatum*. *Fitoterapia* 77, 534-537
- 260.** Wang RF, Xiang L, Du LJ, Wang W (2006b) The constituents of *Punica gra-natum*. *Asia-Pacific Traditional Medicine* 3, 61-70
- 261.** Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, Ma C, Du LJ (2004) Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegra-nate). *Journal of Natural Products* 67, 2096-2098
- 262.** Wang RF, Xie WD, Zhang Z, Xing DM, Ding Y, Wang W, Ma C, Du LJ (2004) Bioactive compounds from the seeds of *Punica granatum* (pomegra-nate). *Journal of Natural Products* 67, 2096-2098
- 263.** Wang XL, Xing DM, Ding Y, Chen YY, Meng Z, Du LJ (2005) Determina-tion and pharmacokinetic study of brevifolin in rat after ig administration of pomegranate leaf extract. *Chinese Pharmacological Bulletin* 21, 369-372

264. Wang XY, Gao XL, Mai EM (2008) Advances in pharmacological studies of *Punica granatum* L. *China Medical Herald* 5, 13-15
265. Wang, RF., Ding, Y., Liu, RN., Xiang, L, Du, L.J. 2010. Pomegranate: Constituents, bioactivities and pharmacokinetics. *Fruit Vegetable Cereal Sci Biotechnol.* 4: 77-87.
266. Wei AC, Li XH, Wu XL (2000) Advances in the investigation of natural oxidant. *Zhengzhou Gong Xue Yuan Xue Bao* 21, 62-67
267. Wong, Y. W. H., Yuen, C. W. M., Leung, M. Y. S., Ku, S. K. A., & Lam, H. L. I. (2006). Selected applications of nanotechnology in textiles. *AUTEX Research Journal*, 6(1), 1-10.
268. Xie YY, Morikawa T, Ninomiya K, Imura K, Muraoka O, Yuan D, Yoshikawa M (2008) Medicinal flowers. XXIII. New taraxastane-type triterpene, punicanolic acid, with tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitory activity from the flowers of *Punica granatum*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 56, 1628-1631
269. Xu J, Guo CJ, Yang JJ, Wei JY, Li YF, Pang W, Jiang YG, Cheng S(2005)
270. Yala D, Merad A S, Mohamedi D and Ouar Korich M N (2021). Classification et mode d'action des antibiotiques.
271. Yamamoto, T., & Mazumder, J. (1996). Synthesis of nanocrystalline NbAl<sub>3</sub> by laser ablation technique. *Nanostructured Materials*, 7(3), 305-312.
272. Yang, B., & Chen, D. (2017). Synthesis of CuO nanoparticles for catalytic application via ultrasound-assisted ball milling. *ChemistrySelect*, 11(1), 39-44. <https://doi.org/10.1002/slct.201702878>
273. Yang, J., Zang, C., Sun, L., Zhao, N., & Cheng, X. (2011). Synthesis of graphene/Ag nanocomposite with good dispersibility and electroconductibility via solvothermal method. *Materials Chemistry and Physics*, 129(1-2), 270-274. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.04.002>
274. Yoshida, M., Thiriet-Rupert, S., Mayer, L., Beloin, C., & Ghigo, J.-M. (2022). Selection for nonspecific adhesion is a driver of FimH evolution increasing *Escherichia coli* biofilm capacity. *MicroLife*, 3, uqac001 .
275. Z. Shanshan, S. Jing, W. Jiajun, et al., Formation of Bacterial Biofilm and Anti-Biofilm Activity of Antimicrobial Peptides, *Chin. J. Anim. Nutr.*, 2021, 33(12), 6631-6640.
276. Zarei, M., Azizi, M et Bashir-Sadr, Z. 2011. Évaluation des caractéristiques physicochimiques du fruit de la grenade *Punica granatum* L. au cours de la maturation. *Fruits*, 66 2, 121-129.

277. Zerouel, S., & Zouakri, N. (2022). Suivi de la formation de biofilm par *Escherichia coli* soumise à une exposition métallique: cas du zinc.
278. Zhang, X., Lai, Z., Liu, Z., Tan, C., & Huang, Y. (2015). A facile and universal top-down method for preparation of monodisperse transition-metal dichalcogenide nanodots. *Angewandte Chemie*, 54(18), 5425-5428.
279. Zhang, X., Whitney, A. V., Zhao, J., Hicks, E. M., & Van Duyne, R. P. (2006). Advances in contemporary nanosphere lithographic techniques. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(7), 1920-1934.
280. Zhao, X., Hilliard, L. R., Mechery, S. J., Wang, Y., Bagwe, R. P., Jin, S., & Tan, W. (2004). A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(42), 15027-15032.
281. Zhu, C., Shi, J., Xu, S., Ishimori, M., Sui, J., & Morikawa, H. (2017). Design and characterization of self-cleaning cotton fabrics exploiting zinc oxide nanoparticle-triggered photocatalytic degradation. *Cellulose*, 24, 2657-2667.

