



UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA

Faculté des sciences de la nature et de la vie Département des sciences biologique

Mémoire de MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Biologie

Spécialité : Biochimie Appliquée

Thème

Bio-activités d'un extrait brut de polysaccharides issus d'une plante médicinale (Astragalus gombiformis)

Présenté par :

SELMI Ghania SMAILI Boutheina

Soutenu publiquement Le 26/06/2022

Devant le jury :

Mr. BOUAL Zakaria **Professeur UKM Ouargla** Président Mr. HENNI Abdellah **MCA Examinateur UKM Ouargla** Mr.OULD EL HADJ Med Didi **Professeur UKM Ouargla Promoteur Mme. BOUZAINE Ghania Doctorante UKM Ouargla** Co-promotrice

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Avant tout, nous remercions Dieu, le tout puissant, de nous avoir accordé la force, le courage et la volonté pour mener à terme ce travail

Nous adressons nos sincères remerciements à **Mr OULD EL HADJ Mohammed Didi** Professeur au Département des Sciences
Biologiques à la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de
l'Université Kasdi Merbah-Ouargla en acceptant l'encadrement.

Aussi nous adressons nos sincères remerciements, avec un grand respect à Mme BOUZAINE Ghania, Doctorat à l'Université Kasdi Merbah-Ouargla, pour l'honneur qu'elle nous a fait et ses encouragements durant la période de réalisation de notre travail. Nous la remercions pour sa souplesse et sa gentillesse.

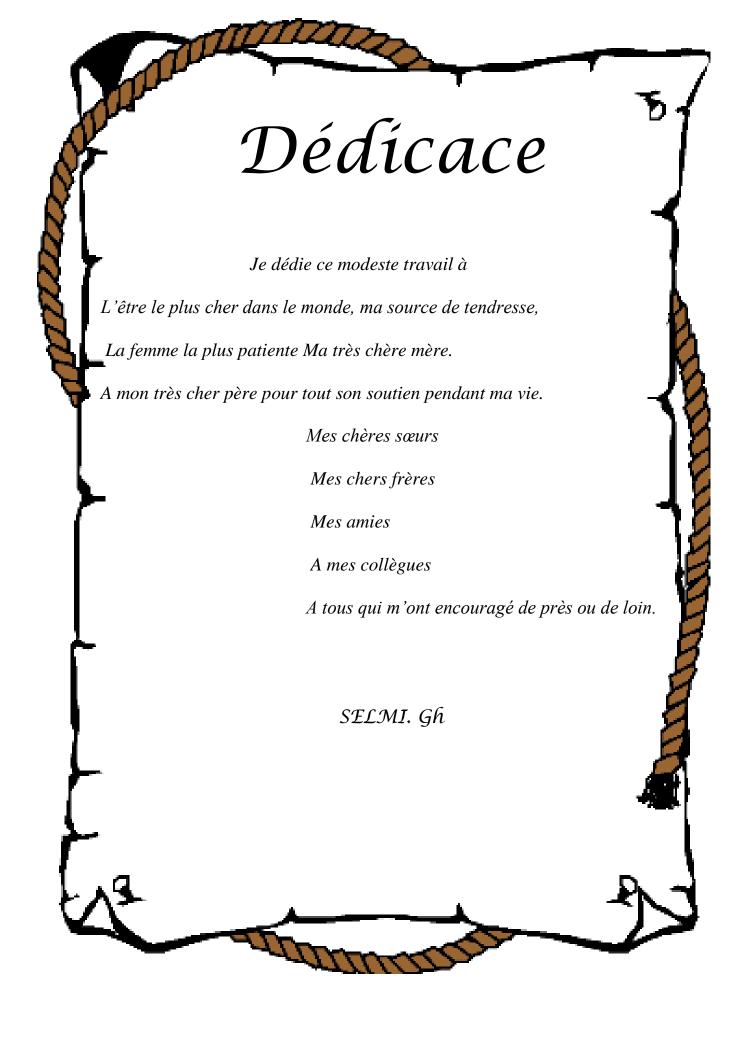
Nous remercions également:

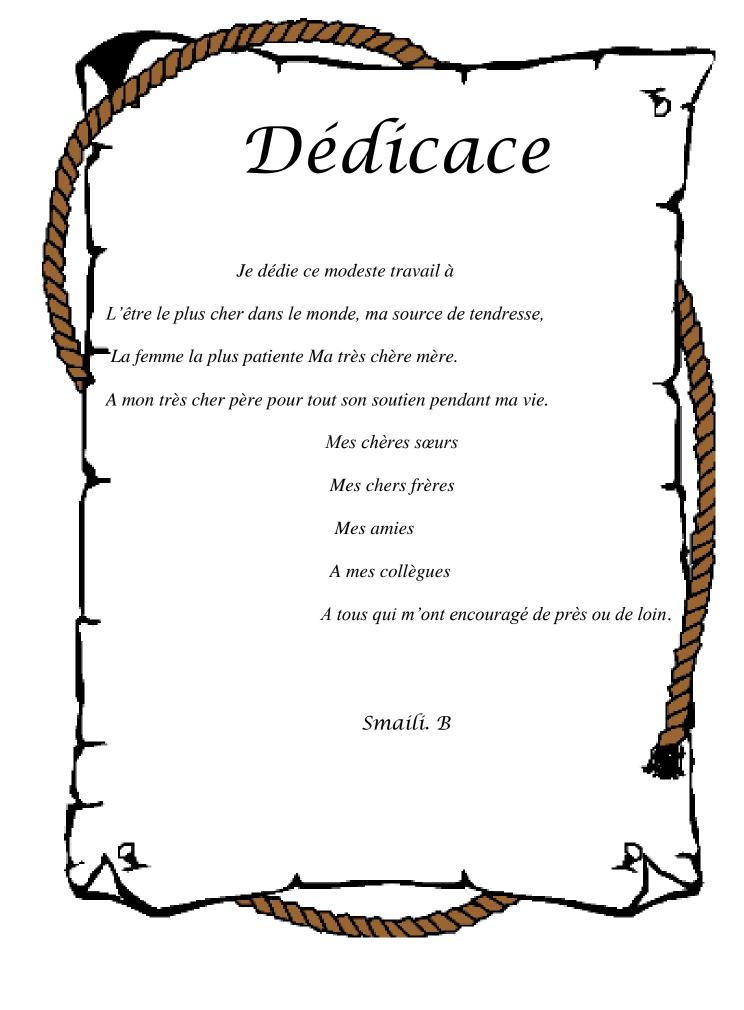
- Mr **BOUAL Zakaria** pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de présider notre jury de soutenance,
 - Mr HENNI Abdellah vous qui avez accepté d'examiner notre travail

Le personnel du laboratoire de CRAPC de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla,

Le personnel de la bibliothèque de la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université Kasdi Merbah-Ouargla.

Enfin, nous remercions tous ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail.





LISTE DES TABLEAUX

N°	Titre	Page
01	Activités biologiques des polysaccharides	6
02	Gamme étalon du glucose	17
03	Rapports frontaux (Rf) des oses étalons dans les deux systèmes de CCM	23

LISTE DES FIGURES

N°	Titre	Page
01	Applications des AgNps.	12
02	Photographie d'Astragalus gombiformis	14
03	Schéma illustrant le protocole d'extraction des polysaccharides	
	hydrosolubles d'Astragalus gombiformis.	15
04	Schéma illustrant le protocole de la biosynthèse AgNPs par l'extrait	
	polysaccharides	20
05	Chromatogramme du système (I).	24
06	Chromatogramme du système (II).	24
07	Spectre UV-Vis des Ag NPs synthétisées par l'extrait d'A.gombiformis.	25
08	Histogrammes des zones d'inhibitions des AgNPs synthétisées avec	
	l'extrait polysaccharidique d A.gombiformis	28
09	photographies des boites de Pétri de l'activité antibactérienne	29

LISTE DES ABREVIATIONS

A Astragalus

AG Extrait polysaccharidique d'Astragalus gombiformis

Ara Arabinose

Ag Argent

Ag NPs Nanoparticules d'argent

NPs Nanoparticules

CCM Chromatographie sur couche mince

FTIR Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Gal Galactose

Glc Glucose

Gal. A Acide galactoroniqua

Glc. A Acide glucuronique

Man Mannose

MEB Microscopie électronique à balayage

Min Minute

Mg Milligramme

Ml Millilitre

mM Milli molaire

μL Microlitre

% Pourcentage

H Heure

°C Degré de Celsius (Unit de Température)

Nm Nanomètre

Rf Rapport frontal

Rha Rhamnose

rpm Rotation par minute

Xyl xylose

UV - Vis Ultraviolet visible spectromètre

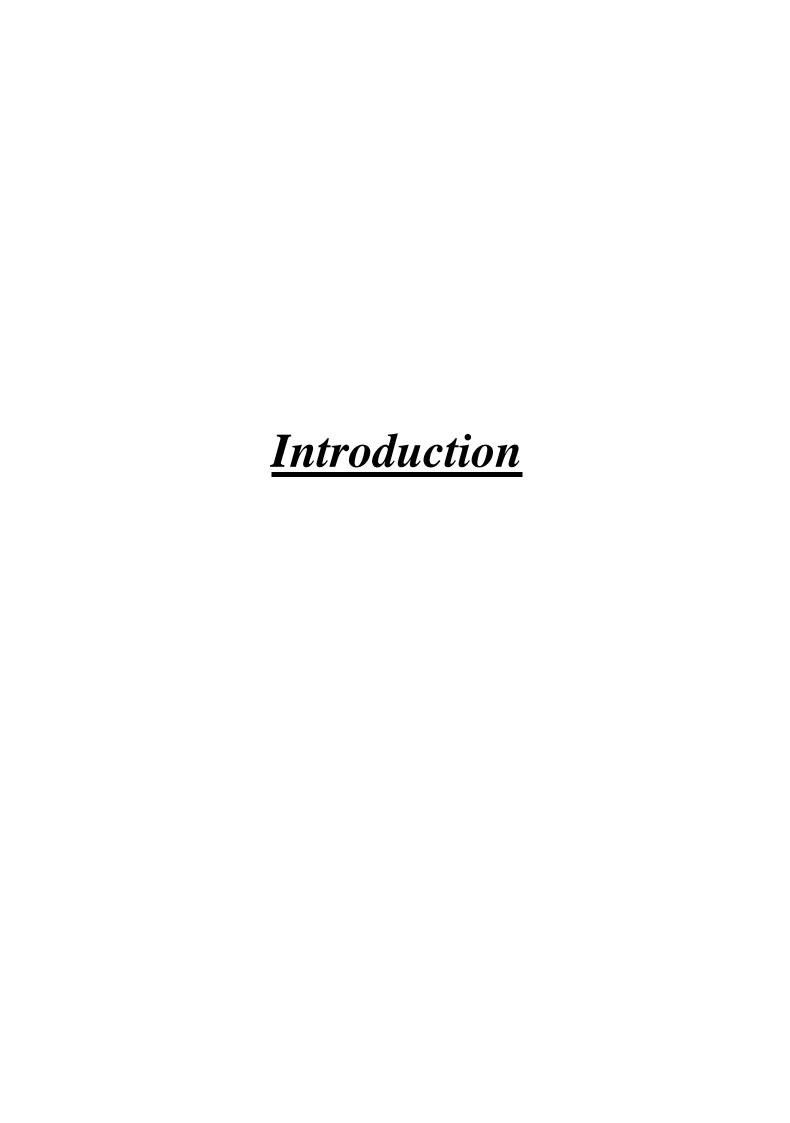
TFA Acide trifluoroacétique

AgNO₃ Nitrate d'argent

Sommaire

Remerciements	
Dédicace	I
Liste des tableaux	III
Liste des figures	IV
Liste des abreviations	V
Introduction	1
Partie bibliographique	
Chapitre I Généralités sur la plante et les polysaccharides	
I.1 Famille de Fabaceae	3
I.1.1 Genre d'Astragalus.	3
I.1.2 Espèce Astragalus gombiformis	3
I.1.2.1 Classification taxonomique	4
I.1.3 Utilisation du genre astragalus en médecine traditionnelle	4
I.2 Polysaccharides	5
Chapitre II Nanoparticules d'argent	
II.1 Nanotechnologie	7
II.2 Nanoparticules d'argent	7
II.3 Méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent	8
II.3.1Méthodes chimique	8
II.3.2 Méthodes physique	8
II.3.3Méthodes biologique	9
II.4 Les caractérisations des nanoparticules d'argent	9
II.4.1 Spectroscopie UV-Visible.	9
II.4.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	10
II.4.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)	10
II.5 Application des nanoparticules d'argent comme agent antimicrobienne	11
II.5.1 Utilisation des nanoparticules d'argent	12

II.5.2Mécanisme d'action des nanoparticules d'argent	
Partie expérimentale	
Chapitre III Matériel et méthode	
III.1 Principe d'étude	
III.2 Matériel d'étude	
III.2.1Matériel biologique.	
III.3 Etude des polysaccharides	
III.3.1 Extraction des polysaccharides	
III.3.2 Calculer le rendement de l'extraction des polysaccharides	
III.4Dosage des oses totaux	
III.5 Caractérisation structurale des polysaccharides	
III.5.1 Chromatographie sur couche mince	
III.6 Biosynthèse des nanoparticules d'argent	
III.6.1 Caractérisation des nanoparticules.	
III.6.1.1 Spectroscopie UV-Visible	
III.6.2 Evaluation de l'activité biologique.	
III.6.2.1 Détermination de l'activité antibactérienne	
Chapitre IV Résultats et discussions	
IV.1 Rendement d'extraction	
IV.2 Composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble.	
IV.3 Caractérisation par chromatographie sur couche mince des polysaccharides	
IV.4Biosynthèse des nanoparticules d'argent	
IV.4.1 Caractérisation des nanoparticules	
IV.4.1.1 Spectroscopie UV-Visible	
IV.4.2 Evaluation de l'activité biologique	
IV.4.2.1 Détermination de l'activité antibactérienne	
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annovos	



Introduction

Les plantes médicinales sont à la fois un produit fini destiné à la consommation et une matière première pour l'obtention des substances bioactives qui sont à l'origine de plusieurs médecines modernes grâce à leur richesse en métabolites, notamment en composés polysaccharidiques dotés de propriétés biologiques bénéfiques. Les «Légumineuses» sont l'un des groupes des plantes les plus importants. Ces plantes sont utilisées pour synthétiser une large gamme de produits naturels, notamment des arômes, des poisons, des colorants ; et ont également une grande importance à des fins médicinales (Ahmad et al., 2016).

L'Astragalus est un genre de la famille des Fabaceae, couramment utilisé comme fourrage pour le bétail et les animaux sauvages. Plusieurs espèces de ce genre sont utilisées dans les aliments, les médicaments et les cosmétiques (**Teyeb** *et al.*, **2012**)

Le genre Astragalus est bien documenté en tant que source de substances biologiquement actives telles que les composés phénoliques et les flavonoïdes (Foudah et al., 2017), mais peu d'études sont intéressées par les polysaccharides de ce genre

Les polysaccharides sont considérés comme des biomacromolécules pour tous les organismes vivants, qui sont structurellement composés de monosaccharides liés par des liaisons glycosidiques (Ullah et al.,2019). Ils peuvent être obtenus à partir de différentes sources comme les algues (alginate), les végétaux (la pectine et les gencives), les microbes (le dextran), et l'animaux (le chitosan) (Mohammed et al.,2021). Les polysaccharides jouent un rôle crucial dans de nombreuses fonctions physiologiques de la vie (Zong et al.,2012) tel que fournir une structure, une protection, une adhérence, ils ont également des rôles cruciaux dans le système immunitaire, la coagulation du sang, la fécondation, la prévention des pathogènes (Ngwuluka, 2018).

De plus, au cours des dernières décennies, les polysaccharides bioactifs ont été étudiés et utilisées dans différentes secteurs en raison de leur biodégradabilité, de leur nature nontoxique et de leur biocompatibilité. Des études ont montré que les polysaccharides possèdent un large éventail de perspectives pharmacologiques telles que les propriétés antixoydantes, antitumorales, antimicrobiennes, anti-obésité, antidiabétiques et hépato-protectrice (**Ullah** *et*

al., 2019), anticancéreux, immun modulatrices, anti-inflammatoire, hypocholestérolémique, gastro-protectrice et neuro-protectrice.

La nanotechnologie joue un rôle important dans tous les domaines de la science et de la technologie, en raison de ses avantages étendus et uniques. Les nanomatériaux sont généralement dans la gamme de 1 à 100 nm (Mandal et al., 2006). Les nanomatériaux peuvent apporter des solutions à tous les défis technologiques, environnementaux et biologiques. Par rapport aux particules en macrogranulométriques, les nanomatériaux présentent des propriétés physiques, chimiques, optiques et biologiques uniques (stabilité physique et chimique, la conductivité élevée, la stabilité a différente pH, l'activité catalytique et antimicrobienne). Parmi les différentes nanoparticules métalliques, l'argent, est reçu une attention importante en raison de leur application incommensurable dans plusieurs divisions de la science, qui comprend la détection, le diagnostic, la catalyse, la photographie, et surtout dans le domaine médical en tant qu'agent antimicrobienne (Renu et al., 2020).

L'objectif ultime de cette étude consiste à la biosynthèse des nanoparticules d'argent à l'aide d'extrait polysaccharidique d'*Astragalus gombiformis* et teste leur activité biologique. Il s'agit de :

- Extraction des polysaccharides hydrosolubles issus de la graine d'Astragalus gombiformis;
- Dosage des oses totaux d'extrait polysaccharidique ;
- ➤ Biosynthèse des nanoparticules d'argent à base d'extrait de plante ;
- Caractérisation des nanoparticules par la spectroscopie UV-Vis :
- Evaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent comparativement à l'extrait aqueux vis-à-vis de quatre souches.

Une conclusion qui résume les points essentiels de cette, achève cette étude.

Partie bibliographique

Chapiter I.-

Géneralité sur la plante investie et les polysaccharides

I.1.-Famille de Fabaceae

La famille des plantes Leguminosa ou Fabaceae comprend les Légumineuses qui sont des plantes à fruits. Dans le monde. Parmi les plus grandes familles de plantes à fleurs, les Légumineuses sont le plus grand groupe de plantes avec 19 400 espèces et sont classés en environs 730 genres. Les genres les plus répandus et les plus importants sont les Astragales qui comptent plus de 2 400 espèces (**Ahmad** *et al.*, **2016**). En Algérie, 53 genres et 339 espèces sont enregistrés (**Lekmine**, **2021**).

Les «Légumineuses» sont l'un des groupes des plantes les plus importants. Ces plantes sont utilisées pour synthétiser une large gamme de produits naturels, notamment des arômes, des poisons, des colorants, et ont également une grande importance à des fins médicinales (Ahmad et al., 2016).

I.1.1.-Genre Astragalus

Astragalus est l'un des plus grands genres de plantes à fleurs de la famille des Légumineuses. Sous forme de herbes annuelles ou vivaces, sous-arbustes ou d'arbustes, les plantes d'Astragalus sont largement distribuées dans les régions tempérées et arides. Ce genre a été estimé contenir 2 000 à 3 000 espèces et plus de 250 sections taxonomiques dans le monde (Li, X et al., 2014). Dans les pays du bassin Méditerranéen, 500 espèces ont été décrites dont une centaine sont localisées en Nord d'Afrique (Dobignard et Chatelain, 2010-2013) et une quinzaine plus spécifiquement au Sahara (Ozenda, 2004). En Algérie, le genre Astragalus est assez bien représenté. En effet, la flore algérienne comporte 40 espèces d'Astragalus (45 taxons en comptant les sous espèces) (Quézel et Santa, 1962).

Certaines plantes du genre Astragalus sont bien connues pour leurs propriétés pharmacologiques, notamment hépatoprotectrices, immunostimulantes et antivirales. Alors que l'utilisation la plus courante de ce genre est comme fourrage pour le bétail et les animaux sauvages, certaines plantes de ce genre ont été reconnues comme étant utilisées dans les aliments, les médicaments, les cosmétiques (Li, X et al., 2014).

Les saponines, les flavonoïdes et les polysaccharides sont considérés comme les principaux constituants actifs d'Astragalus (Li, X et al., 2014).

Chapiter I.- Géneralité sur la plante investie et les polysaccharides

I.1.2.-Espèce Astragalus gombiformis

Astragalus gombiformis Pomel est une espèce de plante sauvage psammophytique du

désert de la famille des Fabacées, qui se trouve principalement dans les zones arides. C'est une

espèce herbacée, sous-arbrisseau ou arbuste qui contribue grandement à l'alimentation des

dromadaires et des chèvres élevés par les agriculteurs. Cette légumineuse fourragère est bien

adaptée aux conditions arides, notamment aux sols sablonneux, et est considéré comme plus

valeur nutritive que de nombreux brouts sauvages et buissons espèce. A. gombiformis est

également traditionnellement utilisé contre les morsures de serpents et scorpions (Guerrouj et

al., 2013).

I.1.2.1.- Classification taxonomique (Quezel et Santa, 1963)

Règne: Plante

Embranchement: Spermatophytes

Sous embranchement : Angiospermes

Classe: Dicotylédones

Sous classe: Dialypétales

Ordre: Rosale

Famille: Fabaceae

Genre: Astragalus

Espèce: Astragalus gombiformis Pomel.

I.1.3.- Utilisation du genre Astragalus en médecine traditionnelle

Les espèces du genre Astragalus sont utilisées en médecine traditionnelle dans le monde

entier comme plante médicinale remèdes pour les ulcères d'estomac, toux, bronchite chronique,

hypertension, gynécologique ,troubles, diabète, piqûres et scorpions toxiques (Bellakhdar,

1997).

Les racines fraîches d'Astragalus lusitanicus Lam sont utilisées comme cataplasme

dans les maladies de genou et de coude (gonflement, arthrite et luxation) (Bellakhdar, 1997).

En Algérie, l'espèce Astragalus gyzensis Bugne sert à soulager les piqûres de serpent (Kherraze, 2010). Alors que la décoction des feuilles et des racines d'Astragalus tenuifolius des fau Maroc est utilisé contre la fatigue et les helminthes (El Rhaffari et Zaid, 2002).

De plus, *Astragalus membraneuse* est une plante chinoise traditionnelle bien connue pour le traitement des maladies neurodégénératives, elle est parmi les plantes toxiques les plus populaires (**Iserin, 2001**).

I.2.- Polysaccharides

Les polysaccharides sont la forme la plus importante de glucides qui existait dans la nature, qui contient des unités de monosaccharides liées par des liaisons glycosidiques. Ce sont soit des résidus de sucres qui sont liés entre eux de manière glycosidique ou liés de manière covalente à d'autres structures comme les peptides, les acides aminés et les lipides. Les homopolysaccharides sont des homoglycanes composés des mêmes monosaccharides, alors que les hétéropolysaccharides sont des hétéroglycanes composés de différents monosaccharides (D'Ayala et al., 2008).

Les polysaccharides naturels peuvent être obtenus à partir de différents sources comme les algues (alginate), les végétaux (pectine et gomme), les microbes (dextran) et les animaux (chitosane) (Mohammed et al., 2021).

Les polysaccharides ont naturellement des propriétés de stockage comme l'amidon ou des propriétés structurales, comme la cellulose, qui assure la stabilisation et la structure physique (**D'Ayala** *et al.*, **2008**). Aussi les polysaccharides peuvent être classés en fonction du polyélectrolyte en polysaccharides à charge positive (chitosan) et en polysaccharides à charge négative (alginate, héparine, et pectine) (**Liu** *et al.*, **2008**).

Les modifications chimiques des polysaccharides comme la sulfation, la phosphorylation et la carboxyméthylation sont des procédures très efficaces pour modifier les propriétés biologiques des polysaccharides (Chen *et al.*, 2016), qui les rendent adaptés aux systèmes d'administration de médicaments dans différentes préparations médicamenteuses (Sinha et Kumria., 2001).

Tableau 1 : Activités biologiques des polysaccharides (Ullah et al., 2019).

Polysaccharides	Origine	Activités biologiques	Mécanismes d'action		
β-glucane	Liches	Anti-obésité	Apport énergétique réduit		
			• Diminution de la faim et augmentation de la satiété et de la plénitude		
Pectine	Végétal	Gastro-protectrice	Augmentation du volume de matières fécales		
			 Modifier la composition des lipides et des lipoprotéines postprandiaux 		
Ficoïdane	Algues marines	Anti –microbienne	• Effets inhibiteurs sur l'entrée des virus comme le VIH dans les cellules		
Carraghénane	Algues marines	Anti-inflammatoire	• Supprime l'activité de la COX-2		
Glucomannane	fibres	Нуро-	Réduction du cholestérol		
de konjac	alimentaires	cholestérolémique	plasmatique		
			• Réduction significative du sérum total, du HDL-C et du LDL-C		

Chapitre II.Nanoparticules d'argent

II.1.- Nanotechnologie

La nanotechnologie est un domaine important de la recherche moderne traitant de la conception, de la synthèse et de la manipulation de structures de particules allant d'environ1 à 100 nm. Les nanoparticules (NP) ont un large éventail d'applications dans des domaines tels que les soins de santé, les cosmétiques, l'alimentation humaine et animale, la santé environnementale, la mécanique, l'optique, les sciences biomédicales, les industries chimiques, l'électronique, les industries spatiales, la délivrance de gènes de médicaments, les sciences de l'énergie et la photoélectrochimie (**Iravani** *et al.*, **2014**).

Les nanomatériaux :

La Commission européenne publie ses recommandations relatives à la définition des nanomatériaux (recommandation 2011/696/UE): « on entend par "nanomatériaux" un matériau naturel, formé accidentellement ou manufacturé contenant des particules libres, sous forme d'agrégat ou sous forme d'agglomérat, dont au moins 50 % des particules, dans la répartition numérique par taille, présentent une ou plusieurs dimensions externes se situant entre 1 nm et 100 nm » (M. Ricaud et O. Witschger, 2012).

II.2.- Nanoparticules d'argent

Les nanoparticules sont des nano-objets dont les trois dimensions (**Glusker, J.1999**). Les nanoparticules (NP) également appelées particules ultrafines (PUF), dont la taille varie de 1 à 100 nm (1 nm = 10-9 M = 0,00000000001 M). Il est donc plus grand que les atomes et plus petit que la cellule.

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

L'argent est un métal de transition doux, blanc et brillantant possédant plusieurs propriétés comme une conductivité électrique et thermique élevée. IL est utilisé sous des formes telles que colloïdes comme lotions. C'est un principal agent thérapeutique en médecine pour les maladies infectieuses et les infections chirurgicales. L'argent a bien beaucoup d'avantage que de facteurs de risque (**Firdhouse et Lalitha 2015**).

C'est l'un des métaux les plus utilisé pour la conception des nanoparticules. Les nanoparticules d'argent pouvant rassembler environ 20-15 000 atomes d'argent, ont montré les mêmes propriétés physico-chimiques et activités biologiques que l'argent, en plus des propriétés uniques des nanoparticules (**Wijnhoven**, **S** *et al.* **2009**), telles que leur petite taille, grande surface par rapport au volume, une conductivité élevée et une variation facile des propriétés de surface.

Certaines applications diverses comprennent des effets antioxydants, anticoagulants, fibrinolytiques, électronique, aérospatiale et panneaux solaires (Borase et al., 2014).

Les nanoparticules ont généralement un large spectre activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains et animaux (Mittal et al., 2013).

II.3. -Méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent

Les AgNps sont synthétisés principalement par des méthodes chimiques, physiques et biologiques :

II.3.1. - Méthodes chimique

Les méthodes chimiques utilisent de l'eau ou des solvants organiques pour préparer les nanoparticules d'argent .Ce processus utilisent habituellement trois composantes principales, comme les précurseurs métalliques, les agents réducteurs et les agents stabilisants.

Les méthodes chimiques utilisent des techniques comme la réduction électrochimique, l'irradiation par laser, la décomposition thermique et la réduction chimique.

L'avantage de la synthèse chimique des nanoparticules est la facilité de production, le faible coût et le rendement élevé ; cependant, l'utilisation d'agents chimiques réducteurs est novice pour les organismes vivants (**Zhang** *et al.*, **2016**).

II.3.2.- Méthodes physique

Dans les méthodes physiques, les nanoparticules sont préparées par évaporation, condensation par l'intermédiaire d'un four tubulaire à pression atmosphérique. Des méthodes physiques, incluant la décharge d'étincelles et la pyrolyse, ont été utilisées pour la synthèse des AgNps.

Les avantages des méthodes physiques sont la vitesse, le rayonnement utilisé comme agent réducteur, et pas de produits chimiques dangereux, mais les inconvénients sont un faible rendement et une consommation d'énergie élevée, contamination par solvant et manque de distribution uniforme (**Zhang** *et al.*, **2016**).

II.3.3.-Méthodes biologique

La méthode de réduction biologique est une méthode de préparation de nanoparticules d'argent utilisant des matériaux naturels comme agents réducteurs, ce qui rend le processus de préparation des nanoparticules d'argent plus respectueux de l'environnement, et les nanoparticules d'argent préparées sont biocompatibles. Le polysaccharide est un nouvel agent réducteur naturel, qui présente les avantages d'une faible toxicité et d'une biodégradabilité. Il ne produit pas de substances toxiques dans le processus de synthèse (Jing et al., 2021).

II. 4. -Les caractérisations des nanoparticules d'argent

Les propriétés physicochimiques des nanoparticules sont importantes pour leur comportement, la distribution biologique, l'innocuité et l'efficacité. Par conséquent, la caractérisation des nanoparticules est importante pour évaluer les aspects fonctionnels des particules synthétisées.

La caractérisation est effectuée à l'aide de diverses techniques analytiques comme la spectroscopie UV-vis, la diffractométrie des rayons X (XRD), Fourier transformer la spectroscopie infrarouge (FTIR), la spectroscopie photoélectronique à rayons X (XPS), la diffusion dynamique de la lumière (DLS), la microscopie électronique à balayage (MEB), la microscopie électronique à transmission (MET) et la microscopie à force atomique (AFM) (Zhang et al., 2016).

II. 4.1.-Spectroscopie UV-Visible

Les propriétés optiques des échantillons dans les domaines de l'UV et du visible ont été étudiées par spectroscopie d'absorption UV-visible.

La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de l'ultraviolet (200-400 nm), du visible (400-750 nm) ou du proche infrarouge (750-1400 nm) (Zaki, et al.,2011).

Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition(s) électronique(s). Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide. Le spectre électronique est la fonction qui relie l'intensité lumineuse absorbée par l'échantillon analysé en fonction de la longueur d'onde. Le spectre est le plus souvent présenté comme une fonction de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde. Il peut aussi être présenté comme le coefficient d'extinction molaire en fonction de la longueur d'onde, le spectre est alors indépendant de la longueur concentration du soluté qui absorbe.

II.4.2.- Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier permet d'obtenir sur la nature des liaisons chimiques et peut être employée pour l'identification de composés. En effet, cette technique caractérisent les transitions vibrationnelles au sein des molécules ou cristaux, produit des spectres comportant des bandes d'adsorption dont la position est caractéristique des liaisons de vibration du composé étudié. Il existe différents types de vibration : l'élongation (symétrique ou antisymétrique), la déformation angulaire, le balancement, le mouvement hors plan ou la torsion. Les plus fréquentes sont l'élongation, la déformation angulaire et le mouvement hors plan (BARANI D, 2020).

II.4.3. -Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est une technique de microscopie permettant de produire des photographies de la surface des particules avec une résolution nanométrique supérieure à celle de la microscopie optique. Elle peut également donner des informations sur les particules. Dans le domaine des sciences des matériaux, il s'agit d'un outil puissant dans lequel l'état de surface présente un intérêt primordial. La technique permet de balayer la surface de l'échantillon à l'aide d'un faisceau d'électrons de quelques nanomètres de diamètre. Cette technique permet également un grossissement extrême et une profondeur de champ accrue pour représenter les caractéristiques morphologiques, et probablement leur examen chimique lorsqu'ils sont associés à un système d'analyse de rayons X (EDS: spectroscopie d'énergie dispersive). La microscopie électronique à balayage basée sur l'analyse des interactions entre électrons et matière (BARANI D, 2020).

II.5. -Application des nanoparticules l'argent comme agent antimicrobienne

II.5.1.-Utilisation des nanoparticules d'argent

Les nanoparticules synthétisées par les différentes méthodes ont été utilisées dans diverses applications de diagnostic.

Les nanoparticules ont généralement un large spectre activité antimicrobienne contre les agents pathogènes humains et animaux. Les nanoparticules d'argent sont déjà largement utilisées comme agents antimicrobiens de produits médicaux et de consommation commerciaux (Mittal et al., 2013).

Les emballages antibactériens sont utilisés pour empêcher la contamination bactérienne dans les produits alimentaires. Si des nano composites antimicrobiens à base d'argent sont incorporés dans des matériaux d'emballage, la contamination microbienne peut être contrôlée en réduisant le taux de croissance des micro-organismes. Des chercheurs ont essayé d'incorporer des nanoparticules d'argent dans les matériaux d'emballage tels que du papier filtre (Mtimet, 2011).

Les AgNps contribuent également à d'autres domaines divers tels qu'un agent antifongique dans l'industrie textile, des nanofiltres pour la purification et la concentration d'un composé d'importance industrielle comme l'acide lactique et la synthèse de nanoparticules bimétalliques et trimétalliques (**Borase** *et al.*, **2014**).

Les applications des nanoparticules sont en émergence dans la protection des cultures et agriculture. Plusieurs types de nanoparticules ont été mis en évidence pour réduire les charges microbiennes dans les effluents d'eaux usées traitées (Mittal et al., 2013).

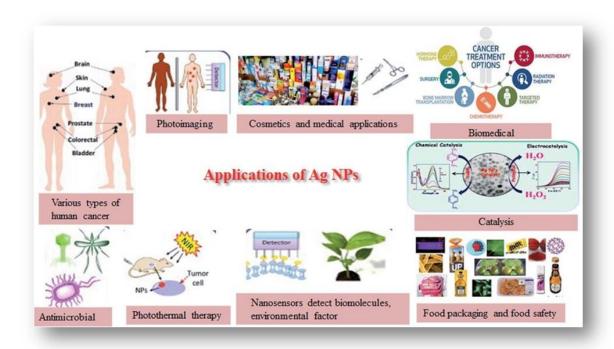


Figure 01: Applications des AgNps

II.5.2.-Mecanisme d'action des nanoparticules d'argent

Le mécanisme des Ag NPs était généralement décrit par des hypothèses. Le mécanisme le plus important pris en considération est la rupture de la paroi cellulaire. Les NP Ag ont la capacité de pénétrer la membrane bactérienne par des interactions chimiques avec le phosphore et le soufre, des bases présentes dans les protéines qui entourent les bactéries. La structure lipidique des micro-organismes est affectée, de sorte que le transport correct des enzymes et des protéines à l'intérieur des bactéries est endommagé. Les bactéries sont ainsi altérées, tandis que des modifications morphologiques commencent à apparaître en raison du fort effet antibactérien. Les mitochondries et les ribosomes sont d'abord endommagés de la membrane, tandis que les protéines de l'intérieur de la cellule et autour de l'ADN commencent à se décomposer en raison de la réactivité de l'argent. Les ions Ag réagissent avec les bases de l'ADN tandis que la réplication est inhibée, les processus de transcription et de traduction sont modifiés, la synthèse des protéines est arrêtée et des interruptions dans les divisions cellulaires apparaissent. Au fil des ans, le mécanisme a été prouvé à l'aide de techniques de microscopie sensibles (Nicolae et al., 2022).

Partie expérimentale

Chapitre III.-Matériels et méthodes

III. -Matériel et méthodes

III.1.- Principe d'étude

L'étude porte sur l'extraction des polysaccharides hydrosolubles issus de la graine d'*Astragalus gombiformis*. Ainsi, la caractérisation partiellement par des méthodes colorimétriques, à savoir la teneur en oses totaux. De même, une analyse qualitative des résidus glycosidiques constitutifs par chromatographie sur couche mince est effectuée après hydrolyse acide et a chaude.

Cette étude vise aussi la biosynthèse des nanoparticules d'argent (AgNps) à l'aide de l'extrait polysaccharidique. Ainsi, nous avons examiné le rôle des nanoparticules synthétisés dans l'amélioration de l'activité biologique, notamment l'activité antibactérienne. La caractérisation des nanoparticules d'argent se fait par : la spectroscopie UV-vis.

III.2. -Matériel de l'étude

III.2. 1.- Matériel biologique

Le matériel biologique, constitué de graines d'Astragalus gombiformis, c'est une plante médicinale de la famille des Fabacées.

Cette espèce a été récoltée au Sahara algérienne dans la région de Timimoune en 2020.

Les graines sont broyées pour faire l'extraction.



Figure 02 : Photographie *d'Astragalus gombiformis*.

III.3.-Etude des polysaccharides

III.3.1.-Extraction des polysaccharides de graine d'Astragalus gombiformis

Dix (10) grammes de graines d'*Astragalus gombiformis* sont prétraité 03 fois par l'acétone durant 2 heures, à température ambiante et sous agitation douce puis filtrées pour éliminer les composés solubles dans l'acétone. Le résidu prétraité est séché une seconde fois à l'abri de la lumière et à la température ambiante. L'extraction des polysaccharides hydrosolubles est faite selon le protocole de Boual *et al.*, (2015) avec quelques modifications. Les graines séchées sont macérées 03 fois dans d'eau distillée pendant 2 heures à 70°C sous agitation douce. Le mélange est filtré sur papier filtre. Puis on fait une centrifugation à 4200 rpm pendant 40min. Les polysaccharides hydrosolubles sont précipités à l'aide de 3 volumes d'éthanol pendant 24 heures à une température de 4°C. Après centrifugation à 2600 rpm pendant 10 min, le culot est récupéré puis lavé 3 fois par l'acétone avant d'être séché par lyophilisation. Le lyophilisat obtenu représente l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles.

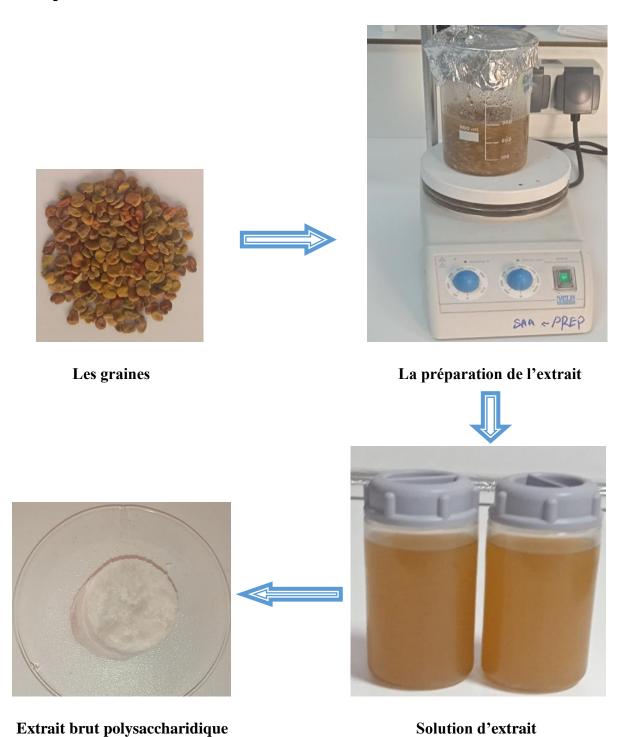


Figure 03 : Schéma illustrant le protocole d'extraction des polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus gombiformis*.

III.3.2.- Calcule le rendement d'extraction des polysaccharides

Le rendement en extrait brut est défini comme étant le rapport entre la masse de l'extrait sec obtenu et la masse du matériel végétal traité. Ce rendement est calculé par la formule :

Rendement d'extraction (%) = (masse des polysaccharides extrait (g))/ (masse de la poudre séché de la plante (g)) ×100

III.4.-Dosage des oses totaux de l'extrait polysaccharidique des graines d'Astragalus gombiformis

III.4.1.- Principe

La teneur en oses totaux dans l'extrait polysaccharidique d'*Astragalus gombiformis* est déterminée selon la méthode du DUBOIS *et al.* (1956) utilisant l'acide sulfurique et le phénol comme réactifs. Les liaisons glycosidiques sont hydrolysées, à chaud, en présence d'acide sulfurique concentré et la déshydratation des unités osidiques conduit à la formation de composés furfurique. Ces derniers interagissent avec le phénol par condensation pour former des composés de coloration orange-jaune absorbant à 490 nm ,dont le glucose est utilisé comme étalon.

III.4.2. Réparation des réactifs et des solutions

Préparation de solution d'extrait polysaccharidique 0,01%

La solution est préparée avec 10 mg de l'extrait brut polysaccharidique dissolute dans 100ml d'eau distillée.

Préparation de solution de glucose 0,01%

La préparation est effectuée par 10 mg du glucose dans 100ml d'eau distillée.

Préparation de gamme d'étalon de glucose 0,002% à 0,01%

Tableau 02 : Gamme d'étalon du glucose

	Blanc	0.002%	0.004%	0.006%	0.008%	0.01%
Eau distillée (ul)	200	160	120	60	40	0
Glc 0,01% (ul)	0	40	80	120	160	200

Préparation de solution du phénol 5%

La solution est préparée avec 2.5g du phénol dans 50ml d'eau distillée.

III.4.3.- Mode opératoire

La teneur en oses totaux est déterminée par la méthode de DUBOIS et al. (1956).

- Dans des tubes à essai en verre, introduire 200 μl de la solution polysaccharidique ainsi que 200 μl des solutions du glucose constitutive de la gamme d'étalonnage ;
- Ajouter 200 μL de la solution de phénol ;
- Ajouter 1 mL d'acide sulfurique concentré au milieu réactionnel ;
- Vortexer les tubes puis les incuber 5 minutes dans un bain marie sec à 90°C;
- Laisser reposer à température ambiante et à l'obscurité pendant 30 min ;
- Mesurer l'absorbance à 490 nm (Spectrophotomètre UV-Visible.

III.5.- Caractérisation structurale des polysaccharides

Détermination des monosaccharides constitutifs des polysaccharides extraits d'Astragalus est réalisée par Chromatographie sur couche mince. Afin de déterminer la composition osidique d'un polysaccharide, on procède à son hydrolyse.

III.5.1.- Hydrolyse acides des liaisons glycosidiques

10 mg de l'extrait brut de polysaccharides hydrosolubles est hydrolysé par 1 ml d'acide trifluoroacétique 2M, chauffé à 120C° à l'étuve pendant 90min, dans des tubes fermés. Après refroidissement. Ajouter quelques gouttes de méthanol, L'acide est évaporé à l'air ambiante pendant 24h, ajouter 1ml de l'eau distillée. Puis on fait une centrifugeuse à 7000 rpm pendant 5min.Une fois l'hydrolyse effectuée, les monosaccharides libérés, sont analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) (YOUMBAI., 2017).

III.5.2.-Chromatographie sur couche mince

> Préparation phase mobile

Pour le système 1, la phase mobile est constituée d'acétate d'éthyle, pyridine, eau, n-butanol, acide acétique dans les proportions 5-4-4-10-2.

Pour le système 2, la phase mobile est constituée de : Chloroforme, n-butanol, méthanol, acide acétique, eau (4,5-12,5-5-1,5-1,5).

> Phase stationnaire

Des plaques en gel de silice prêtes à l'emploi, sont utilisées comme phase stationnaire, sont de type gel de silice de 0, 25 mm d'épaisseur, sur feuille d'aluminium.

Préparation des hydrolysats et étalons

A chaque 10 mg de glucide étalon (arabinose, galactose, glucose, mannose, rhamnose, xylose, acide galacturonique, acide glucuronique) est ajouté 1ml d'eau distillée.

> Réalisation de chromatographie

Dans un premier stade, on vérifie qualitativement la composition en oses des hydrolysats .On tracée une ligne de dépôt à 1,5 cm du bas de la plaque, puis activée dans l'étuve à 120^0 C pendant 10min.Apres l'activation de la plaque, on dépose une série des étalons(arabinose, galactose, glucose, mannose, xylose, d'acide glucuronique et d'acide galacturonique) ainsi que la solution d'hydrolysat à l'aide d'un applicateur, puis on introduit la plaque dans une cuve étanche dont l'atmosphère est saturée par le mélange de la phase mobile. Le développement du chromatogramme est effectué de façon ascendante jusqu'à le front. Ensuite, les plaques sont séchées à l'air libre et révélées par le NIGRUM (Annexe 2) à l'aide d'un pulvérisateur. Les plaques sont incubées à l'étuve à 105° C jusqu'à l'apparition des spots colorés (ou taches) environ 15mn (BOUAL., 2011 modifié).

> Calcule des facteurs de rétention

Le facteur de rétention (Rf) est calculé pour chaque constituant :

Rf=(La distance parcourue par la substance/La distance parcourue par le solvant)×100

III.6.-Biosynthèse des nanoparticules d'argent

La biosynthèse des nanoparticules d'argent est fait selon le protocole de **Telrandhe** *et al.*, **2017** avec quelques modifications, 100 mL de la solution de nitrate d'argent (AgNO₃) à 10 mM a été préparée et 100 mL de la solution d'extrait polysaccharidique a été ajoutés. Le mélange a été laissé sous agitation à 500 rpm avec chauffage à une température de 80 °C pendant 2h, le changement de la couleur a été vérifié fréquemment, ce qui est un indicateur de la formation de nanoparticules d'argent. Le contenu a été incubé à 80 °C pendant 24 heures. Après la synthèse des AgNPs, la solution contenant des nanoparticules a été centrifugée à 2600 rpm pendant 10 min pour récupérer les AgNPs, Le culot a été lavé par de l'eau distillée plusieurs fois pour éliminer les impuretés et de l'éthanol pour obtenir une poudre d'AgNPs pure.

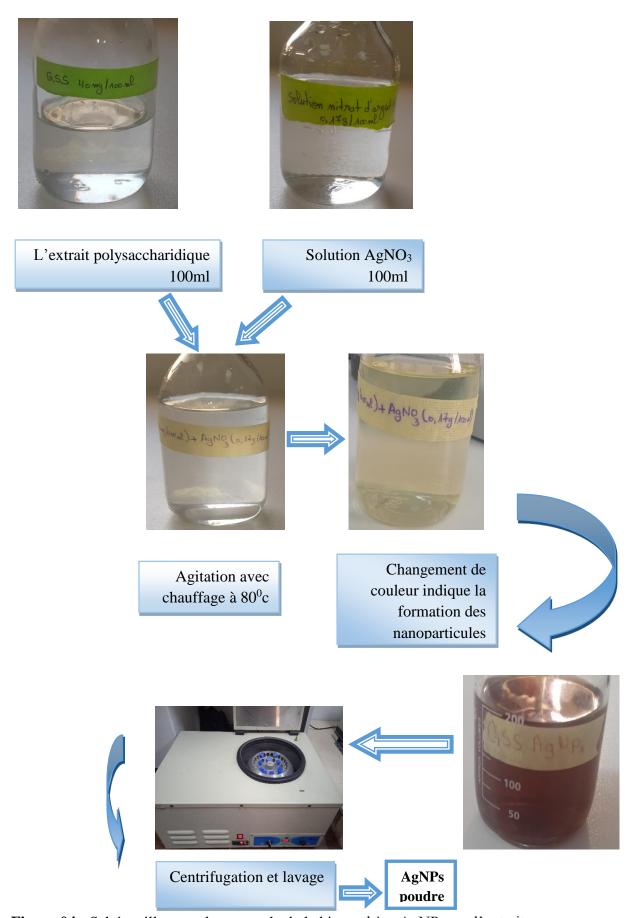


Figure 04 : Schéma illustrant le protocole de la biosynthèse AgNPs par l'extrait

III.6.1.- Caractérisation des nanoparticules

La caractérisation des nanoparticules d'argent se fait par :

III.6.1.1.- Spectroscopie UV-Visible

Les meures spectrophotométrique ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau UV-visible en utilisant une cuve en quartz de 10mm de trajet optique. L'analyse de deux solutions (AgNO₃ et solution de synthèse des nanoparticles d'argent) est effectuée entre 200 et 800nm.

III.6.2. - Evaluation de l'activité biologique

III.6.2.1.-Détermination de l'activité antibactérienne

III.6.2.1.1.-Principe

L'activité antibactérienne consiste à estimer l'inhibition de la croissance bactérienne d'un produit synthétisé par la « méthode de diffusion sur gélose par disques ». L'extrait de plante et les nanoparticules d'argent sont testés pour leur activité antibactérienne vis-à-vis de quatre souches :

- > Escherichia coli,
- Pseudomonas aeruginosa,
- > Staphylococcus aureus,
- > Salmonella typhi.

III.6.2.1.2.-Mode opératoire

L'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent a été évaluée par la technique de diffusion en disque selon la méthode décrite par Sacchetti et al. (2005), Celiktas et al. (2007). Après 18 heures de croissance a 37°C dans un bouillon nutritif (NB, Les germes ont été dilués avec NB pour obtenir une suspension contenant environ 1,5.10⁶ ufc/ml. Un prélèvement à partir de l'inoculum sert à ensemencer sur boites de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton par la technique d'écouvillonnage. Des disques de papier Watman de 6 mm de diamètre, stériles, chargés de 10µl d'extrait sont placés à la surface de la gélose. Les disques des contrôles négatifs sont imprégnés d'eau distillée stérile. Les boîtes de Pétri sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les résultats sont exprimés en diamètres d'inhibition ou en pourcentage d'inhibition produite autour des disques (Benyagoub et al., 2016).

Chapitre IV.Résultats et discussion

IV.- Résultats et discussions

IV.1.- Rendement d'extraction

Le rendement d'extraction est défini comme étant le rapport entre la masse d'extrait sec obtenu et la masse de matériel végétal traité.

Le rendement massique de l'extrait des polysaccharides hydrosolubles d'*Astragalus gombiformis* par rapport à la matière sèche est de 10.5%. Ce rendement est supérieur à celui décrit pour d'autres espèces de l'astragalus comme *A. armatus* 4,2 % (**Boual** *et al.* **2015**) et *d'A. Lehmannianus* 4.8 % signalé par **Mestechkina** *et al.* **(2000).**

Olennikov et Rokhin (2011) montré que le rendement massique des polysaccharides hydrosolubles à partir de graines d'*Astragalus alpinus* et d'*A. tibetanus* est de 0, 59 et 4, 65% respectivement, Ce rendement est inférieur à celui d'*Astragalus gombiformis*.

Le rendement d'extraction des polysaccharides hydrosolubles issus d'Astragalus gombiformis varient suivant diverses conditions telles que l'environnement climatique, la localisation, l'origine géographique et la période de récolte (**Petera, 2016**).

IV.2.-Composition de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble

Le dosage par méthode acide sulfurique-phénol a montré que la teneur en oses totaux de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble d'*Astragalus gombiformis* est de 54 %.

Liyanage *et al.* (2015) ont noté des tenures en oses totaux de 70 % es polysaccharides issus de la gomme de guar. Tandis que ces teneurs en oses totaux sont supérieures de celle d'Astragalus gombiformis

La teneur en oses totaux de l'extrait polysaccharidique hydrosoluble Alhagi maurorum est de 49.21 % signalé par **Chakou** *et al.* (2021), ce teneur est inférieure à celle d' *A. gombiformis*.

Chapitre IV.- Résultats et discussions

La composition chimique des polysaccharides hydrosolubles issus d'*Astragalus* gombiformis varient suivant diverses conditions telles que le procédé d'extraction, l'environnement climatique, l'origine géographique et la période de récolte. (**Petera,2016**).

IV.3. - Caractérisation par chromatographie sur couche mince des polysaccharides

L'identification de la composition en monosaccharides de l'extrait polysaccharidique des graines d'*A.gombiformis* a été étudiée par chromatographie sur couche mince après hydrolyse acide.

Les figures 5 et 6 présentent les chromatogrammes obtenus pour les deux systèmes (I, II), et le Tableau 3 montre les rapports frontaux des oses étalons.

Tableau 03: Rapports frontaux (Rf) des oses étalons dans les deux systèmes de CCM

Type d'ose	Système I	Système II
D-galactose	35,29	40,88
D-mannose	43,79	46,54
Extrait polysaccharidique		
	36,6	40,88
	45,75	47,17

Pour les deux systèmes (I, II), par comparaison des rapports frontaux de l'extrait polysaccharidique avec ceux des étalons, il est apparu que les polysaccharides d'*Astragalus gombiformis* sont constitués principalement de galactose et de mannose.





Figure 05 : Chromatogramme du système (I). Figure 06 : Chromatogramme du système(II).

L'extrait brut des polysaccharides d'*Astragalus gombiformis* est composée principalement de galactose et de mannose ce qu'indique la présence d'un galactomannan

Ces résultats correspondent avec les recherches précédentes sur les polysaccharides extraits de graines d'espèces d'Astragalus comme *Astragalus armatus* est composé de deux monosaccharides : le mannose et le galactose (**Boual** *et al*, **2015**).

Olennikov et Rokhin (2011) qui ont signalé que *A. tibetanus* et *A. alpinus* sont constituent en majorité de mannose et galactose.

Mestechkina *et al.* (2000) montrent que *A. lehmannianus* est composée de deux monosaccharides qui sont mannose et galactose.

La proportion des monosaccharides constitutifs des polysaccharides d'Astragalus gombiformis est influencée par les procédés d'extraction et de la zone géographiques de récolte, la pluie, la température, la nature du sol et le taux d'humidité (**Petera, 2016**).

IV.4.-Biosynthèse des nanoparticules d'argent

La biosynthèse des nanoparticules d'argent a été effectuée par l'extrait polysaccharidique d'A.gombiformis appliqué comme agent bioréducteur. La synthèse des AgNps a commencé en ajoutant l'extrait polysaccharidique à la solution d'AgNO3. La formation d'AgNps a été approuvée par un changement de coloration de la solution incolore qui devenue brun foncé. Cela indique que l'extrait polysaccharidique pourraient être responsables de la bioréduction des ions Ag (Sharifi-Rad, M., et al., 2020).

IV.4.1.-Caractérisation des nanoparticules

IV.4.1.1.-Spectroscopie UV-Visible

La formation AgNPs a été confirmée en détectant la bande d'absorption caractéristique de la résonance plasmonique de surface (SPR) en utilisant la spectroscopie **UV-vis** (**Ma, Y** *et al.*, **2017**). L'absorbance spectrale UV des AgNPs synthétisés a été observée à 431 nm. Cette bande d'absorption est due à la stimulation des électrons libres dans les orbitales externes d'AgNPs. En général, les nanoparticules d'argent de diamètres (10-40 nm) donnent de larges pics dans le visible (**Khan, M** *et al.*, **2020**).

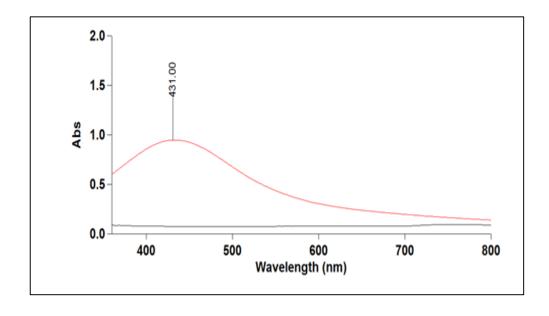


Figure 07 : Spectre UV-Vis des Ag NPs synthétisées par l'extrait d'*Astragalus gombiformis*.

IV.4.2. - Evaluation d'activité antimicrobienne

Nous avons testé l'activité antibactérienne des AgNPs et de l'extrait polysaccharidique sur quatre souches bactériennes. Il s'agit de Escherichia coli , Pseudomonas aeruginosa ,Salmonella typhi et Staphylococcus aureus .

La zone d'inhibition a été utilisée comme critère pour déterminer les effets antibactériens des AgNPs contre les 4 souches.

Les nanoparticules synthétisées à partir de l'extrait polysaccharidique ont montré une bonne activité antibactérienne vis-à-vis de toutes les bactéries utilisées dans la présente étude. Les résultats (**Fig. 08**) obtenus des diamètres des zones d'inhibition avec différentes concentrations d'AgNPs.

Les nanoparticules synthétisés avec une concentration plus élévée (10mg/ml) ont montré une forte inhibition de la croissance Escherichia coli 14 mm. Elles ont également inhibé la croissance de Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Salmonella typhi avec des zones d'inhibition respectivement de 13,13,13 mm. Mollick et al., 2015, montrent que les nanoparticules d'argent ont une forte activité antibactérienne vis- à-vis Escherichia coli.

D'autre part, les nanoparticules synthétisés avec une faible concentation (0,312 mg/ml) ont montré aussi une inhibition de la croissance d'Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus et Salmonella typhi avec des zones d'inhibition de 7 mm pour les 4 souches.

Ces résultats sont proches à celui décrit pour d'autres études sur la biosynthése des nanoparticules d'argant à base d'extrait des polysaccharidique d'astragalus comme les nanopaticules synthétisés à base d'extrait des polysaccharidique d'Astragalus membranaceus avec une concentration plus élévée (2 mg/ml) montré une zone d'inhibition de la croissance de Escherichia coli, Psedomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus 12,33, 13,17 et 12,33 respectivement singlée par **Ma** *et al.*, **2017.**

De plus , les nanopaticules synthétisés à base d'extrait des polysaccharidique d' Astragalus membranaceus avec une fabile concentration (0,5 mg/ml) qui montrent aucun zone d'inbition contre de Escherichia coli, Psedomonas aeruginosa et Staphylococcus aureus , ceci

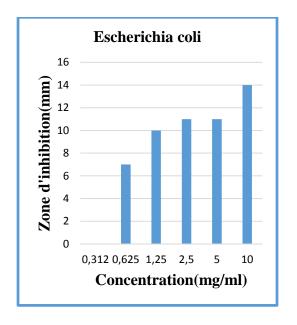
Chapitre IV.- Résultats et discussions

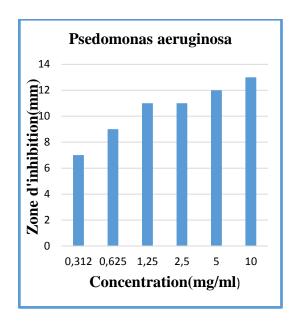
qu'indique les d'Ag NPs synthétisés dans cette étude donne le meilleur d'efficacité antibactérienne.

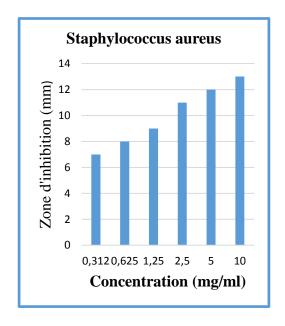
L'activité antimicrobienne plus élevée des AgNPs synthèses était possiblement associée à leur surface relativement grande, ce qui les rend plus disponibles pour les interactions de surface et améliore leurs effets bactéricides . Il pourrait également être dû à la morphologie sphérique et la petite taille des AgNPs qui leur permettent de traverser facilement la bactéries paroi cellulaire et détruire les cellules. (Sharifi-Rad, M., et al., 2020).

Ce résultat indique que les bactéries Gram-négatives sont plus sensibles que les bactéries Gram-positives (Franci, G et al .,2015). Cette sensibilité différente des souches bactériennes pourrait être associée aux différences dans leur structure de paroi cellulaire. Les parois cellulaires du Gram positif les bactéries sont composées d'une épaisse couche de peptidoglycane (environ 20 à 80 nm). Tandis que la couche des bactéries Gram négatif est plus mince (environ 7 à 8 nm), situé entre les deux couches de l'espace périplasmique et recouvert d'une membrane externe formée par les composants des liposaccharides ayant la charge négative. Ainsi, les AgNPs, ayant la charge relative positive, pourraient être mieux attachés à leur surface de paroi cellulaire et pénétrer (Monedeiro et al., 2019).

En outre, la liaison des AgNPs aux protéines dans la paroi cellulaire bactérienne pourrait causer ses dommages et être responsable de la fuite du contenu cellulaire, entraînant finalement la mort bactérienne(Seong et al., 2017). Après la pénétration des AgNPs dans la paroi cellulaire, ils pourraient également entrer dans le cytoplasme des bactéries et interagir avec les biomolécules et les structures intercellulaires, tels que l'ADN, les protéines, les enzymes et les ribosomes. Ces processus peuvent endommager les structures intracellulaires et à la mort cellulaire(You et al., 2012).







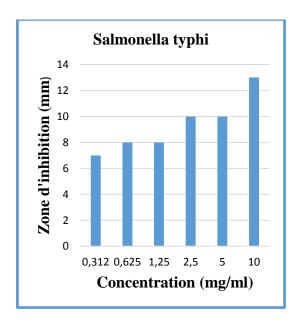
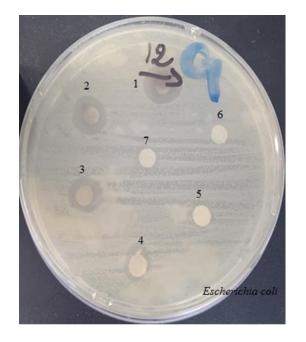
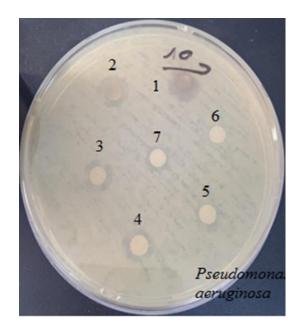
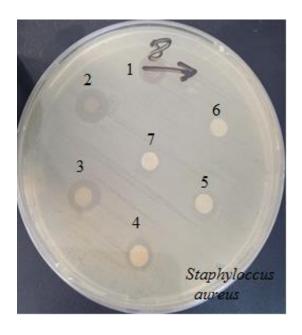


Figure 08 : Histogrammes des zones d'inhibitions des AgNPs synthétisées avec l'extrait Polysaccharidique d' *A.gombiformis*

Chapitre IV.- Résultats et discussions







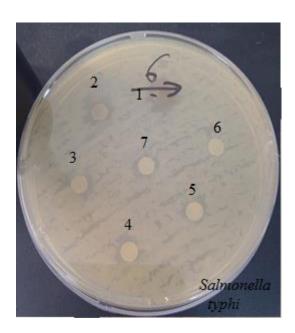


Figure 09 : photographies des boites de Pétri de l'activité antibactérienne

- 1. Solution mére d'AgNPs (10mg/ml), 2. Solution AgNPs (5mg/ml)
- 3. Solution AgNPs (2,5 mg/ml), 4. Solution AgNPs (1,25mg/ml)
- 5. Solution AgNPs (0,625mg/ml), 6. solution AgNPs (0,312mg/ml), 7. Eau distillée

Conclusion

Conclusion

L'objectif principal de ce travail est de proposer de nouvelles voies de biosynthèse des nanoparticules d'argent (AgNps) en vue de remplacer l'utilisation des réducteurs chimiques et physiques, A cet effet, nous avons choisi une plante médicinale qui est *Astragalus gombiformis* pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent.

L'extraction des polysaccharides hydrosolubles comme des composés actifs a été réalisée par la méthode de macération à chaude en utilisant l'eau comme solvant d'extraction. Cette méthode d'extraction a permis de donner un rendement qui est de 10.5%. Ensuite, la teneur en oses totaux été déterminer par dosage colorimétrique et qui est égale à 54%.

D'autre part. L'extrait polysaccharidiques est analysé par chromatographie sur couche mince par deux systèmes de séparation qui permet une étude rapide et simple des hydrolysats des polysaccharides étudiés dans le but de les caractériser. L'analyse a montré la présence mannose et galactose. Ce, indique la présence d'un galactomannane.

Une autre partie de cet extrait est utilisée en tant qu'agent réducteur des ions métalliques d'Ag dans le milieu aqueux.

La caractérisation des nanoparticules d'argent synthétisées a été réalisée en associant des méthodes de caractérisation :

- ▶ L'étude optique montre que l'apparition du pic UV-vis à 431 nm dans le spectre d'absorption confirme la formation des Ag NPs et sa forte intensité avec une largeur rétrécie indiquant la petite taille des Ag NPs.
 - Les Ag NPs synthétisées ont montré une activité antibactérienne contre les bactéries Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa et Salmonella typhi. Cependant, une activité bien prononcée a été observée contre E. coli.



Référence bibliographique



Ahmad F., Anwar F., & Hira S., 2016.- Review on medicinal importance of Fabaceae family. Pharmacologyonline, 3, 151-157.

Ajitha B., Reddy Y A K., & Reddy P S., 2014.-Biogenic nano-scale silver particles by Tephrosia purpurea leaf extract and their inborn antimicrobial activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 121, 164-172.



B. O. U. A. L., **Abdellah K E M A S S I.**, **& Didi O E H M.**, **2011.**- Caractérisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des feuilles d'Asphodelus tenuifolius Cavan (Liliaceae): effet prébiotique des oligosaccharides issus de l'hydrolyse des polysaccharides. Algerian Journal of Arid Environment "AJAE", 1(2).

Boual Z., Pierre G., Delattre C., Benaoun F., Petit E., Gardarin C., & El Hadj M D O .,2015.- Mediterranean semi-arid plant Astragalus armatus as a source of bioactive galactomannan. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 5(1), 10-18.

Barani d., 2020. -Optimisation des conditions opératoires de synthèse verte de nanoparticules de ZnO à l'aide d'extrait des feuilles de Phoenix Dactylifera. L. Thèse de doctorat. Université Mohamed Khider-Biskra.

Bellakhdar J., 1997.- La Pharmacopée Marocaine Traditionnelle, Ibis Press, Paris, France.

Benyagoub E., Boulanouar A., Ahmed M S., Nebbou N., & Bouloufa A., 2016.- Essai d'évaluation de l'activité antibactérienne de la gomme arabique d'Acacia tortilis (Forssk) contre quelques souches bactériennes pathogènes Evaluation test of antibacterial activity of the Arabic gum of Acacia tortilis (Forssk) against some pathogenic bacterial strains. Bulletin de la Société Royale des Sciences de Liège

Borase H P., Salunke B K., Salunke R B., Patil C D., Halls worth J E., Kim B S., & Patil S.V., 2014. -Plant extract: a promising biomatrix for ecofriendly, controlled synthesis of silver nanoparticles. Applied biochemistry and biotechnology, 173(1), 1-29.

Boual Z., Chouana T., Kemassi A., Hamid O udjanaA., Daddi Bouhoun M., Michaud P., & Ould El Hadj M D., 2015.- Étude physicochimique et biologique des polysaccharides hydrosolubles de Plantago notata Lagasca (Plantaginaceae). Phytothérapie, 13(6), 396-402



Celiktas O., Hames E., Bedir E., Vardar S., 2007.- Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of Rosmarinus officinalis depending on location and seasonal variations. Food Chemical, 100: 553-559

Chakou F Z., Boual Z., Hadj M D O E., Belkhalfa H., Bachari K., Alaoui-Talibi E., & Michaud P.,2021.- Pharmacological Investigations in Traditional Utilization of Alhagi maurorum Medik. In Saharan Algeria: In Vitro Study of Anti-Inflammatory and Antihyperglycemic Activities of Water-Soluble Polysaccharides Extracted from the Seeds. Plants, 10(12), 2658.

Chen Y., Yao F., Ming K., Wang D., Hu Y., & Liu J., 2016. -Polysaccharides from traditional Chinese medicines: extraction, purification, modification, and biological activity. Molecules, 21(12), 1705.



D'Ayala G G., Malinconico M., & Laurienzo P., 2008.- Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. Molecules, 13(9), 2069-2106.

Dobignard A., Chatelain C., 2010-2013. - Index synonymique et bibliographique de la flore. Conservatoire and Jardin Botaniques, Genève

DUBOIS M., GILLES K A., HAMILTON J K., PEBERS P A., et SMITH F., 1956.-Colorimetric method for determination of sugar and relayed substances. Analytical Chemistry, 28,350-356



El Rhaffari L., & Zaid A., 2002.- Pratique de la phytothérapie dans le sud-est du Maroc (Tafilalet): Un savoir empirique pour une pharmacopée rénovée. Des sources du savoir aux médicaments du futur, 1, 293-318

El-Naggar N. E. A., & Abdelwahed N. A., 2014.- Application of statistical experimental design for optimization of silver nanoparticles biosynthesis by a nanofactory Streptomyces viridochromogenes. Journal of Microbiology, 52(1), 53-63.

F

Firdhouse M. J., & Lalitha P., 2015. -Biosynthesis of silver nanoparticles and its applications. Journal of Nanotechnology, 2015

Foudah A I., Soliman G A., Abdel-Rahman R F., Alankuş-Çalışkan Ö., & Yusufoglu H., 2017.-Antioxidant and hepatoprotective effects of Astragalus echinops and Astragalus logopodioides ethanolic extracts on paracetamol-induced liver injury in rats. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 14(5), 31-40.

Franci G., Falanga A., Galdiero S., Palomba L., Rai M., Morelli G., & Galdiero M., 2015.-Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. Molecules, 20(5), 8856-8874.



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

Guerrouj K., Pérez-Valera E., Chahboune R., Abdelmoumen H., Bedmar E J., & El Idrissi M M., 2013. -Identification of the rhizobial symbiont of Astragalus glombiformis in Eastern Morocco as Mesorhizobium camelthorni. Antonie Van Leeuwenhoek, 104(2), 187-19



Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S V., & Zolfaghari B., 2014. -Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. Research in pharmaceutical sciences, 9(6), 385.



Jing Y., Li J., Zhang Y., Zhang R., Zheng Y., Hu B., & Zhang D., 2021.- Structural characterization and biological activities of a novel polysaccharide from Glehnia littoralis and its application in preparation of nano-silver. International Journal of Biological Macromolecules, 183, 1317-1326



Khan M., Khan A U., Alam M J., Park S., & Alam M., 2020.-Biosynthesis of silver nanoparticles and its application against phytopathogenic bacterium and fungus. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 100(12), 1390-1401

Kherraze M E., Lakhdari K., Kherfi Y., Benzaoui T., Berroussi S., Bouhanna M., Sebaa A. 2010. - Atlas Floristique De La Vallée De l'Oued Righ Par Ecosystème.



Lekmine S., 2022. - Phytochemical characterization and biological activities of plant extracts. Thèse de doctorat.

Li X., Qu L., Dong Y., Han L., Liu E., Fang S., & Wang T., 2014. - A review of recent research progress on the astragalus genus. Molecules, 19(11), 18850-18880.

Liu Z. Jiao Y., Wang Y., Zhou C., & Zhang Z., 2008.- Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. Advanced drug delivery reviews, 60(15), 1650-1662

Liyanage S., Abidi N., Auld D., Moussa H., 2015. -Chemical and physical characterization of galactomannan extracted from guar cultivars (Cyamopsis tetragonolobus L.). Industrial Crops and Products, 74, 388-396.

Ma Y., Liu C., Qu D., Chen Y., Huang M., & Liu Y., 2017. - Antibacterial evaluation of sliver nanoparticles synthesized by polysaccharides from Astragalus membranaceus roots. Biomedicine & Pharmacotherapy, 89, 351-357.

Mandal D., Bolander M. E., Mukhopadhyay D., Sarkar G., & Mukherjee P., 2006.- The use of microorganisms for the formation of metal nanoparticles and their application. Applied microbiology and biotechnology, 69(5), 485-492.

Mittal A. K., Chisti Y., & Banerjee U. C., 2013. - Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. Biotechnology advances, 31(2), 346-356.

Mestechkina N. M., Anulov O. V., Smirnova N. I., & Shcherbukhin V. D., 2000. - Composition and structure of a galactomannan macromolecule from seeds of Astragalus lehmannianus bunge. Applied Biochemistry and Microbiology, 36(5), 502-506.

Mohammed A. S. A., Naveed M., & Jost N., 2021. -Polysaccharides; classification, chemical properties, and future perspective applications in fields of pharmacology and biological medicine (a review of current applications and upcoming potentialities). Journal of Polymers and the Environment, 29(8), 2359-2371.

Mollick MMR., Rana D., Dash SK., Chattopadhyay S., Bhowmick B., Maity D., Mondal D., Pattanayak S., Roy S., Chakraborty M., 2015.- Studies on green synthesized silver nanoparticles using Abelmoschus esculentus (L.) pulp extract having anticancer (in vitro) and antimicrobial applications. Arabian journal of chemistry

Monedeiro F., Pomastowski P., Milanowski M., Ligor T., & Buszewski B.,2019. Monitoring of bactericidal effects of silver nanoparticles based on protein signatures and VOC emissions from Escherichia coli and selected salivary bacteria. Journal of clinical medicine, 8(11), 2024.

Mtimet I., 2011.- Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent. Thèse de doctorat, Rouen, INSA



Ngwuluka NC., 2018.- Responsive polysaccharides and polysaccharides-based nanoparticles for drug delivery. Elsevier, Amsterdam

Nicolae-Maranciuc A., Chicea D., & Chicea L. M., 2022. -Ag Nanoparticles for Biomedical Applications—Synthesis and Characterization—A Review. International Journal of Molecular Sciences, 23(10), 5778



Olennikov DN., & Rokhin AV., 2011.-Polysaccharides of Fabaceae. VI. Galactomannans from seeds of Astragalus alpinus and A. Tibetanus. Chemistry of Natural Compounds, 47(3), 343-34

Ozenda P., 2004.- Flore du Sahara. Ed. Centre national de la recherche scientifique, Paris, 622 pages

Oves M., Aslam M., Rauf M. A., Qayyum S., Qari H. A., Khan M. S., & Ismail I. M., 2018.-Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of Phoenix dactylifera. Materials Science and Engineering: C, 89, 429-443



Petera B., 2016.- Extraction et caractérisations (structurale et physico-chimique) de polysaccharides hydrosolubles issus de cladoces de Cereus triangularis (Thèse de doctorat, Université Blaise Pascal-Clermont-Ferrand II).



Quézel P., Santa S. 1963.- Nouvelle Flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales.CNRS, Paris, 2éme vol. 1170 p.



Renu S., Shivashangari K. S., & Ravikumar V., 2020.- Incorporated plant extract fabricated silver/poly-D, l-lactide-co-glycolide nanocomposites for antimicrobial-based wound healing. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 228, 117673.

Ricaud M., & Witschger O., 2012.- Les nanomatériaux : Definitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prevention. Technical Report ED 6050, INRS



Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Mansredini S., Radice M., 2005.-Comparative evaluation of 11 essentials oils of different origin as functional antioxydants, antiradicals and antimicrobial in food. Food Chemistry, 91: 621-632.

Sharifi-Rad M., Pohl P., Epifano F., & Álvarez-Suarez J. M., 2020. - Green synthesis of silver nanoparticles using Astragalus tribuloides delile. Root extract: Characterization, antioxidant, antibacterial, and anti-inflammatory activities. Nanomaterials, 10(12), 2383.

Sinha V. R., & Kumria R., 2001.-Polysaccharides in colon-specific drug delivery. International journal of pharmaceutics, 224(1-2), 19-38.

Seong M., & Lee D G., 2017.-Silver nanoparticles against Salmonella enterica serotype typhimurium : role of inner membrane dysfunction. Current microbiology, 74(6), 661-670



Telrandhe R., Mahapatra D. K., & Kamble M. A.,2017.- Bombax ceiba thorn extract mediated synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of anti-Staphylococcus aureus activity. International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis, 376-379.

Teyeb H., Houta O., Najjaa H., Lamari A., Neffati M., Douki W., & Najjar M. F., 2012. -Biological and chemical study of Astragalus gombiformis. Zeitschrift für Naturforschung C, 67(7-8), 367-374.



Ullah S., Khalil A. A., Shaukat F., & Song Y., 2019. -Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. Foods, 8(8), 304.



Wijnhoven S W., Peijnenburg W J., Herberts C A., Hagens W I., Oomen A G., Heugens E. H., & Geertsma R. E., 2009.- Nano-silver—a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology, 3(2), 109-138.



YOUMBAI Asma., MEHELLOU Zineb., BOUAL Zakaria1., MICHAUD Philippe., et OULD EL HADJ Mohammed Didi., 2017.- Caracterisation partielle des polysaccharides hydrosolubles des gommes resines de ferula communis l. (apiaceae): activites biologiques. Polysaccharides de plantes de milieux arides (POLYSAC 2017)

You C., Han C., Wang X., Zheng Y., Li Q., Hu X., & Sun H., 2012.- The progress of silver nanoparticles in the antibacterial mechanism, clinical application and cytotoxicity. Molecular biology reports, 39(9), 9193-9201



Zaki S., MF El Kady., and Desouky Abd-El-Haleem., 2011.- Biosynthesis and structural characterization of silver nanoparticles from bacterial isolates. Materials research bulletin 46.10 (2011): 1571-1576.

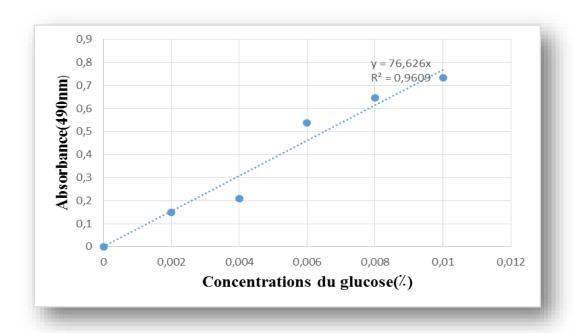
Zhang X F., Liu Z G., Shen W., & Gurunathan S., 2016.- Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. International journal of molecular sciences, 17(9), 1534.

Zong A., Cao H., & Wang F., 2012.- Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. Carbohydrate polymers, 90(4), 1395-1410.

Annexes

Annexes

Annexe 1: Courbe d'étalonnage des oses totaux



Annexe 2 : Préparation des solutions utilisées au cours de l'expérimentation

Solution	Préparation	
	$C = P \times D \times 10 / MM$	
	MM : Masse molaire de TFA= 114,02 g.mol ⁻¹	
Solution d'acide trifluoroacétique TFA à 2 M	P : Pureté = 99%	
	D: Densité = 1,5351	
	C: Concentration	
	$C1 = P \times D \times 10 / M = (99) \times (1,5351) \times (10) / 114,02 =$	
	13,32 M	
	La préparation de 5 ml de solution TFA 2 M est se faite	
	selon la loi :	
	$CV = C1V1 \rightarrow V = C1V1/C$	
	$V = (5ml) \times (2M) / 13,32 M = 0,75 ml de TFA$	
Préparation de Nigrume	Composé de deux solutions :	
	A : 2g diphénylamine dans 50 ml d'acétone	
	B : 8 ml d'acétone complété jusqu'à 50 ml par l'aniline.	
	Après que les deux solutions A et B sont mélangées, 10 ml d'acide orthophosphorique	
	à 85% est ajouté à la solution obtenue	
Préparation de solution AgNO ₃	C=m/MV m=CMV	
	M=169,87g/mol	
	C=10Mm	
	V=100ml	
	m=169,87× 0,01× 0,1=0,17g d'AgNO ₃	

<u>Résumé</u>

Bio-activites d'un extrait brut de polysaccharides issus d'une plante médicinale

Résumé: le processus de biosynthèse pour la production des nanoparticules est considéré comme un processus durable, respectueux de l'environnement, non toxiques. Les nanoparticules biosynthétiser sont biocompatibles avec une grande utilisation dans les différents domaines surtout comme agent antibactérien. L'objectif de ce travail c'est la caractérisation des nanoparticules d'argent biosynthétisées à partir d'extrait polysaccharidique d'Astragalus gombiformis. L'extraction des polysaccharides hydrosolubles par macération donner un rendement de 10.05%, L'étude de la composition chimique de l'extrait polysaccharidique montre 54% d'oses totaux. Les analyses chromatographiques en utilisant deux systèmes de chromatographie sur couche mince révèlent que les polysaccharides d'A.gombiformis sont constitués principalement de galactose, et de mannose, cela indique la présence d'un galactomanane. L'extrait polysaccharidique est utilisé en tant qu'agent réducteur pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent. Les AgNPs synthèses ont été caractérisées par : spectroscopie UV-Vis. La présente étude a permis de noter une importante activité antibactérienne pour les nanoparticules d'argent biosynthétisées contre E. coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa et Salmonella.

Mots clés: polysaccharides, Astragalus gombiformis, nanoparticules d'argent, biosynthèse, activité antibactérienne.

Bioactivities of a raw extract of polysaccharides from a medicinal plant

Abstract: the biosynthesis process for the production of nanoparticles is considered to be sustainable, environmentally friendly, non-toxic process. Biosynthetic nanoparticles are biocompatible with great use in different fields especially as an antibacterial agent. The objective of this work is the characterization of silver nanoparticles biosynthesized from polysaccharide extract of Astragalus gombiformis. The extraction of water-soluble polysaccharides by maceration gives a yield of 10.05%. The study of the chemical composition of the polysaccharide extract shows 54% of total carbohydrate. Chromatographic analyses using two thin-layer chromatography systems reveal that the polysaccharides of A.gombiformis consist mainly of galactose, and mannose, indicating the presence of a galactomanane. The polysaccharide extract used as a reducing agent for the biosynthesis of silver nanoparticles. The synthesised AgNPs were characterized by: UV-Vis spectroscop. The present study noted an important antibacterial activity for silver nanoparticles biosynthetic against Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa andSalmonella typhi.

<u>Key words:</u> polysaccharides, Astragalus gombiformis, silver nanoparticles, biosynthesis, antibacterial activity

الأنشطة الحيوية لمستخلص خام من السكريات المتعددة من نبات طبي gombiformis.A

الملخص

تعتبر عملية التمثيل الحيوي لإنتاج الجسيمات النانوية عملية مستدامة وصديقة للبيئة وغير سامة. تتوافق الجسيمات النانوية الحيوية مع الاستخدام الكبير في مجالات مختلفة خاصة كعامل مضاد للبكتيريا. الهدف من هذا العمل هو توصيف جسيمات الفضة النانوية التي صنعها حيويًا من مستخلص متعدد السكريات من Astragalus gombiformis. يعطي المردود الكتلي السكريات المتعددة القابلة للنوبان في الماء عن طريق النقع عائدًا بنسبة متعدد السكريات من دراسة تركيبة السكريات المستخلصة ان السكريات الكلية نسبة 54٪. أظهرت دراسة تركيبة السكريات المتعددة المستخلصة باستعمال الكروماتوغرافية على الصفائح الرقيقة أن السكريات المتعددة لـ Agombiformis تتكون بشكل أساسي من الجالاكتوز والمانوز، مما يشير إلى وجود galactomanane. يستخدم مستخلص متعدد السكريات كعامل مختزل للتخليق الحيوي لجسيمات الفضة النانوية. تميزت Pseudomonas aeruginosa Salmonella typhi Staphylococcus aureus Escherichia coli

الكلمات المفتاحية: السكريات المتعددة، A.gombiformis ، جسيمات الفضة النانوية مضاد بكتيرى