

Synthesis by soft chemistry of size-controlled zinc oxide (ZnO) nanocrystals for antimicrobial applications

Imroi EL-HABIB^{1,2}, Anne ROYNETTE², Houda MORAKCHI-GOUDJIL², Alex LEMARCHAND¹, Christine MIELCAREK², Rabah AZOUANI², Mamadou TRAORE¹

1: Laboratoire des Sciences de Procédés et des Matériaux (LSPM-CNRS), Institut Galilée, Université Sorbonne Paris Nord, 99 Avenue Jean-Baptiste Clément, 93430 Villetaneuse

2: Ecole de Biologie Industrielle (EBI), 49 Avenue des Genottes – CS 90009, F95895 Cergy Cedex

Résumé

This work focuses on the synthesis of ZnO nanoparticles (NPs) by the sol-gel method for antimicrobial applications. The influence of synthesis parameters on the size of NPs is discussed. The addition of water and an alcoholamine (Monoethanolamine MEA) during the synthesis made possible the crystallization of ZnO at low temperature (<110°C). Our experiments have also shown that these reagents exert an influence on the size of the NPs. The NPs after precipitation are recovered in the form of powders then characterized by different techniques: X-ray diffraction (XRD) and Raman spectroscopy. The crystalline domain size are calculated from Scherrer's formula. The antimicrobial potential of these NPs has been studied. The technique applied for this evaluation consists in estimating the minimum inhibitory concentration (MIC) of the NPs by measuring the evolution of the optical density of the bacteria over time. The results showed that the synthesized ZnO NPs show efficacy on the *Escherichia coli* bacteria.

Mots clés : chimie douce, sol-gel, ZnO, nanoparticules, bactéries, antimicrobien

I. Introduction

Les infections nosocomiales (IN) constituent des problèmes sanitaires et financiers majeurs dans le monde entier. En effet, l'Inserm (2017) fait état de 750 000 infections nosocomiales en France chaque année dont 4000 décès [1]. Les bactéries à l'origine de plus de la moitié des infections nosocomiales sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'utilisation accrue des antibiotiques pour le traitement des IN a entraîné le développement de mécanisme de résistance de ces bactéries, causant ainsi l'émergence des infections potentiellement mortelles [2]. Par conséquent, outre la recherche de nouveaux antibiotiques pour le traitement des patients, la mise en place des procédures réglementées de bio-décontamination dans les hôpitaux, il existe un grand intérêt pour le développement de méthodologies préventives pour réduire considérablement le nombre d'infections et les coûts d'hospitalisation. Les revêtements de surface à base de nanoparticules d'oxyde métallique (NPs) se sont révélés être une méthode alternative efficace contre les infections nosocomiales sans provoquer l'apparition de germes résistants [3] [4]. Ces caractéristiques ajoutées aux propriétés physico-chimiques intrinsèques des oxydes métalliques leur permettent de développer plusieurs mécanismes d'action contre les bactéries tels que la libération d'espèces réactives à l'oxygène ; la libération d'ions et le contact direct avec la paroi des bactéries [5]. Ces multiples mécanismes favorisent donc l'absence de mécanisme de résistance de la part des microorganismes. Par ailleurs, la diminution de la taille des NPs exacerbe potentiellement leurs propriétés ou peut en faire apparaître de nouvelles. Ainsi la taille des NPs pourrait avoir une influence importante sur leur activité antimicrobienne [6]. Le contrôle des caractéristiques des particules est donc primordial pour obtenir les propriétés antimicrobiennes souhaitées. Parmi les oxydes métalliques, les NPs d'oxyde de zinc (ZnO) ont en effet montré une excellente activité

antibactérienne. De plus, elles présentent une bonne biocompatibilité et leur fabrication est très facile, peu onéreuse, faisant de ces particules des agents à activité désinfectante particulièrement intéressants [7]. Parmi les nombreuses méthodes d'élaboration de NPs de ZnO, les méthodes chimiques douces en solution et notamment les méthodes sol-gel sont très intéressantes car elles permettent d'obtenir facilement des nanoparticules de ZnO de faibles tailles contrôlées et monodisperses à basse température. Récemment, Dadi et al. ont proposé une méthode d'élaboration de NPs de ZnO sous la forme de suspensions colloïdales par une voie sol-gel modifiée mettant à profit les propriétés d'un agent chélateur, le monoéthanolamine (MEA), pour contrôler la taille des particules[8]. Les suspensions ainsi formées ont alors présenté une très bonne activité antibactérienne. Dans la présente étude, nous poursuivons le développement de la méthodologie de synthèse décrite par Dadi et al. pour l'étendre à l'obtention de poudres de NPs de ZnO de tailles contrôlées. En effet, la récupération des NPs sous forme de poudres permet d'éviter l'influence du solvant de synthèse lors de l'estimation de l'activité antimicrobienne des NPs. Cela facilite également leur formulation lors de la conception des revêtements de surfaces à base de ces NPs. De ce fait, nous avons fait varier les paramètres de synthèse importants, à savoir le taux d'hydrolyse, la quantité de MEA, la température et le solvant, dans le but d'obtenir des poudres de NPs de ZnO cristallines et mettre en évidence l'influence de ces paramètres sur la taille des particules [9],[10]. Les propriétés antibactériennes des poudres produites sont mises en évidence sur la souche bactérienne *E. coli*. Cette dernière fait partie du groupe des 3 bactéries représentant la moitié des germes isolés dans le cadre d'infections nosocomiales et est responsable de 26% de ces infections [1].

II. Matériel et méthodes

Produits chimiques : L'acétate de zinc dihydraté ($\geq 99\%$), le butanol ($\geq 99,5\%$), l'acétone ($\geq 99,5\%$) proviennent de Sigma-Aldrich. L'isopropanol ($\geq 99,5\%$) provient de chez Acros Organics. La monoéthanolamine (MEA) et le polyacrylate de sodium proviennent respectivement d'Emprove et de Cosmedia sp. Les bouillons Muller Hinton et Trypto Caséine Soja ont été achetés respectivement chez DIFCO™ et BioMérieux SA.

Synthèse des nanoparticules de ZnO : Le protocole de synthèse est inspiré du protocole développé par Dadi et al. [8]. Nous avons choisi de travailler avec un volume total fixe de 100 mL. Le dispositif expérimental est constitué d'un ballon réactionnel immergé dans un bain d'huile de silicone reposant sur un agitateur magnétique chauffant, assurant le chauffage, le maintien en température et l'agitation du milieu réactionnel. Dans le ballon réactionnel, de l'acétate de zinc dihydraté est ajouté sous agitation dans de l'isopropanol ou du butanol avec une concentration en zinc souhaitée de 0,1 M. Une solution laiteuse est alors obtenue. Après une première phase d'agitation, le MEA est ajouté au mélange réactionnel facilitant la dissolution complète du précurseur de zinc. La solution devient alors parfaitement translucide. Différents rapports molaires MEA/ Zn^{2+} (0,5, 1 et 2) ont été testés. Après 30 min d'agitation, de l'eau distillée est ajoutée au mélange, avec différents taux d'hydrolyse $h = H_2O/Zn^{2+}$ (5 ; 10). Différents couples températures/temps de vieillissement ont été utilisées en fonction du type de solvant pour étudier l'effet de la température sur la taille des NPs : 22h à 70°C ou 80°C pour l'isopropanol et 16h ou 22h à 94°C ou 110°C pour le butanol. Nous avons choisi ces solvants en raison de leurs températures d'ébullition relativement élevées qui permettent d'apporter suffisamment d'énergie pour former les NPs de ZnO. Les temps de synthèse des échantillons diffèrent en raison de précédentes expérimentations qui étudiaient l'effet de ce paramètre sur le diamètre des particules. Des suspensions blanches et laiteuses sont obtenues à l'issue des différentes synthèses. Les solutions sont ensuite centrifugées à 7500 rpm pendant 10 min à 4°C pour séparer le précipité du solvant de synthèse. Le précipité ainsi récupéré est ensuite lavé puis centrifugé deux fois

avec respectivement de l'isopropanol et de l'acétone (7500 rpm pendant 10 min à 4°C) pour éliminer les résidus organiques de synthèse. Les précipités lavés sont récupérés dans un faible volume d'acétone et laissés séchés à l'air ambiant.

Caractérisation des nanoparticules de ZnO : La structure des nanoparticules de ZnO préparées est caractérisée par des mesures de diffraction des rayons X (DRX) réalisées sur un diffractomètre INEL XRG 3000 en utilisant une source Co ($\lambda K_{\alpha 1}(\text{Co}) = 1,789 \text{ \AA}$) ainsi que par des mesures de spectroscopie Raman réalisées sur un spectromètre de HORIBA Jobin-Yvon HR800 avec une longueur d'onde d'excitation ($\lambda = 633 \text{ nm}$). La taille des nanoparticules de ZnO a été estimée à partir des diffractogrammes des différentes poudres grâce à la loi de Scherrer : $D_p = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$ (1) Avec D_p le diamètre du domaine cristallin, λ la longueur d'onde des rayons X, k la constante de Scherrer ($k = 0,94$), β la largeur à mi-hauteur du pic et θ la position du pic. La largeur et la position des pics de diffraction ont été estimées grâce au logiciel Peakoc.

Etude des propriétés antibactériennes : Pour l'étude de l'activité antibactérienne, les poudres précédemment synthétisées sont redispersées dans de l'eau distillée en présence de PAS (Polyacrylate de sodium 0,4w%), jouant le rôle d'agent dispersant, puis soniquées afin d'obtenir des suspensions colloïdales stables. La redispersion des poudres est importante car la technique appliquée pour étudier leur activité antimicrobienne s'effectue en milieu liquide. L'activité antimicrobienne est testée sur la souche *E.coli* (ATCC 8739). La méthode utilisée pour l'évaluer est la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) par la technique de microdilution sur microplaque à 96 puits. Cette technique consiste à suivre la croissance des bactéries au cours du temps en mesurant leur densité optique à 600 nm (Fluostar Omega). Le milieu de culture est le bouillon Muller Hinton. Le PAS en présence de bactéries sans les NPs a servi de témoin positif. Les bactéries seules sans NPs et sans PAS sont les témoins négatifs. La solution mère de NPs (1000 $\mu\text{g/mL}$) en présence du dispersant PAS est diluée en cascade pour obtenir les concentrations à tester (600 ; 400 ; 350 ; 300 ; 200 $\mu\text{g/mL}$). Les solutions et les bactéries sont inoculées dans la microplaque à 96 puits puis incubées à 37°C pendant 18h.

III. Résultats et discussion

Synthèse des nanoparticules de ZnO de tailles variables et contrôlées

Influence de la température : Les échantillons présentés dans cette partie sont synthétisés avec un taux d'hydrolyse de $\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+} = 10$ et un ratio $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$ à un temps de vieillissement de 22h. Ils diffèrent par le type d'alcool utilisé en tant que solvant (isopropanol ou butanol) et par leur température de synthèse. Les diffractogrammes et les spectres Raman des échantillons pulvérulents obtenus sont présentés sur les **figures 1 A** et **1B** respectivement. Les diffractogrammes de la **figure 1A a** et **b** correspondant aux échantillons synthétisés à 70°C et 80°C dans l'isopropanol présentent des nombreux pics notamment à bas angles (entre 10° et 40° en 2 θ) qui sont caractéristiques d'espèces organo-métalliques. Ces espèces pourraient correspondre à de l'acétate de zinc non convertie ou encore à des espèces oligomère d'oxo acétate de zinc [9]. En revanche, les diffractogrammes de la **figure 1A c** et **d** correspondant aux échantillons synthétisés à 94°C et 110°C dans le butanol présentent une allure complètement différente : des pics de diffractions sont observés aux angles 2 θ , 36°, 40°, 42°, 56°, 67°, 75°, 81° correspondant respectivement aux plans réticulaires (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) de la structure hexagonale du ZnO wurtzite. On observe également sur ces deux derniers diffractogrammes que la largeur des pics est relativement importante attestant de la présence de particules de faible taille. Cette observation est confirmée par les calculs des diamètres cristallins à partir de la formule de Scherrer : des tailles de

29,9 nm et 30,4 nm sont respectivement obtenues pour les échantillons synthétisés à 94°C et 110°C dans le butanol. Ces mesures ont été réalisées sur 6 pics de diffractions sur chaque diagramme permettant d’obtenir des tailles selon différentes directions cristallographiques. Les valeurs calculées sont très proches d’un pic à l’autre (intervalle de ± 1 nm) pour les deux échantillons. Nous pouvons donc conclure que les particules sont isotropes et donc sphériques. Ce résultat sera confirmé par des mesures ultérieures de microscopie électronique en transmission MET. Sur le spectre Raman présenté en **figure 1B a** correspondant à l’échantillon synthétisé à 70°C dans l’isopropanol, nous observons uniquement une bande d’intensité modérée à 935 cm^{-1} qui pourrait correspondre au mode de vibration des liaisons C-C, C-N et C-O provenant des différents réactifs de synthèse [11]. Concernant le spectre Raman de la **figure 1B b** de l’échantillon synthétisé à 80°C dans l’isopropanol, nous observons en plus de la bande à 935 cm^{-1} deux autres bandes supplémentaires moins intenses respectivement placées à 309 cm^{-1} et 672 cm^{-1} . Ces dernières bandes pourraient correspondre respectivement à des modes de vibration des liaisons Zn-O et COO^- [12]. Ces deux spectres sont donc caractéristiques d’espèces organométalliques à base de zinc ce qui vient confirmer les résultats de DRX. Sur les spectres Raman (**figure 1B c et d**) correspondant aux échantillons synthétisés à 94°C et 110°C dans le butanol, tout d’abord nous observons des bandes de vibration à 330 cm^{-1} , 380 cm^{-1} et 435 cm^{-1} correspondant aux modes vibratoires caractéristiques du ZnO wurtzite [13]. De plus, la largeur importante de ces bandes atteste la formation de nanoparticules de faible de taille. D’autres bandes sont également observées à 672 cm^{-1} et 935 cm^{-1} de manière similaire aux deux derniers échantillons précédents montrant la présence de groupement organique se trouvant potentiellement à la surface des particules. De ces résultats nous avons mis en évidence que nous ne pouvons pas former des NPs de ZnO à 70°C et 80°C dans l’isopropanol. En effet, nous avons identifié la formation d’espèces intermédiaires qui pourraient correspondre à des espèces organométalliques. Ainsi, pour favoriser la cristallisation des NPs de ZnO, nous avons cherché à augmenter la température de synthèse et pour cela nous sommes passés au butanol qui a un plus haut point d’ébullition. Nous avons mis en évidence la formation de NPs bien cristallisées de ZnO wurtzite à 94°C et 110°C dans le butanol avec des tailles de 29,9 nm et 30,4 nm respectivement dans des conditions similaires à l’isopropanol ($h= 10$, $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$ et $t=22\text{h}$). On note que le passage de la température de synthèse de 94°C à 110°C n’a pas induit un fort grossissement de particules pour des temps de synthèse équivalents.

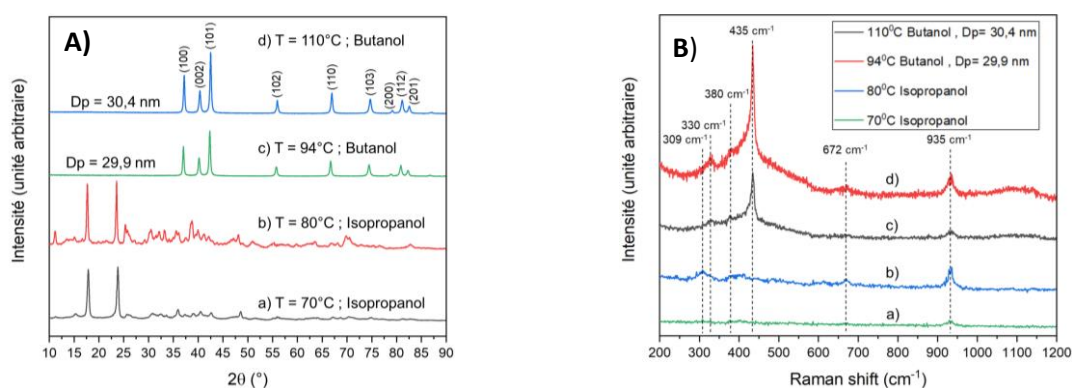


Figure 1: **A** - Diffractogrammes et **B** – Spectres Raman des échantillons obtenus pour a) $T=70^{\circ}\text{C}$; Isopropanol - b) $T=80^{\circ}\text{C}$; Isopropanol - c) $T=94^{\circ}\text{C}$; Butanol - d) $T=110^{\circ}\text{C}$; Butanol.

Influence du ratio $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+}$: Dans cette partie nous comparons des échantillons synthétisés dans le butanol à des ratios $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+}$ différents dans les mêmes conditions de synthèse ($\text{H}_2\text{O}/\text{Zn}^{2+} = 10$; $T= 110^{\circ}\text{C}$). La **figure 2 A** présente les diffractogrammes DRX des échantillons synthétisés avec $t=16\text{h}$ et $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 0,5$; $t=16\text{h}$ et $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 2$; $t=22\text{h}$ et $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 1$; $t=22\text{h}$ et $\text{MEA}/\text{Zn}^{2+} = 2$. En effet, le rôle du MEA dans la réaction peut être multiple : il peut servir d’agent chélateur du Zn, diminuant la

réactivité du système, de base faible grâce à la présence de groupement amine sur sa structure, favorisant ainsi la dissolution du précurseur, et de ligand bidendate grâce à ses groupements amines et hydroxyles (-NH et -OH) en se fixant à leur surface et par conséquent en empêchant leur grossissement [9]. Ces différentes fonctions lui permettraient donc de jouer un rôle non négligeable sur la taille et la structure des NPs. Sur la **figure 2A**, on observe que les pics de diffraction des échantillons, situés aux angles 2θ $37,5^\circ$; 40° ; $42,5^\circ$; 56° ; 67° ; 75° ; 81° correspondant aux plans (100), (002), (101), (102), (110), (103), (112) respectivement, correspondent parfaitement aux pics caractéristiques de la structure cristalline wurtzite du ZnO. De plus, leurs largeurs sont relativement importantes ce qui confirme la formation de NPs de faibles tailles. Le calcul des diamètres cristallins à partir de la formule de Scherrer a encore une fois confirmé ces résultats : les diamètres sont de 20,9 nm ; 36,2 nm ; 30,4 nm et 35 nm respectivement pour les échantillons synthétisés avec $t = 16h$ et $MEA/Zn^{2+} = 0,5$; $t = 16h$ et $MEA/Zn^{2+} = 2$; $t = 22h$ et $MEA/Zn^{2+} = 1$; $t=22h$ et $MEA/Zn^{2+} = 2$. Les tailles des différentes directions cristallographiques impliquées dans le calcul des diamètres moyens cristallins sont relativement proches (intervalle de ± 1 nm). Les particules sont donc isotropes. A partir de l'analyse des diagrammes de diffraction nous remarquons aussi que le diamètre des particules augmente lorsque le ratio MEA/Zn^{2+} augmente. En effet, il passe de 20,9 nm à 36,2 nm lorsque le ratio augmente de 0,5 à 2 pour le couple d'échantillon **a** et **b**, et augmente de 30,4 nm à 35 nm lorsqu'on double la valeur du ratio pour le couple d'échantillon **c** et **d**. De ces résultats nous pouvons déduire que la concentration en MEA a une influence sur la taille des NPs : elle augmente avec le ratio MEA/Zn^{2+} . Son rôle de ligand est alors discutable dans notre procédé. En effet, l'utilisation d'un taux d'hydrolyse élevé ($H_2O/Zn^{2+} = 10$) favoriserait une dissociation réversible du ligand à la surface des particules [13]. Ainsi, l'ajout d'eau annulerait la fonction du MEA en tant que ligand. Nous supposons alors que l'utilisation conjointe d'un fort taux d'hydrolyse en présence de MEA conduit à la mise en place de condition de synthèse favorisant la croissance des NPs de ZnO.

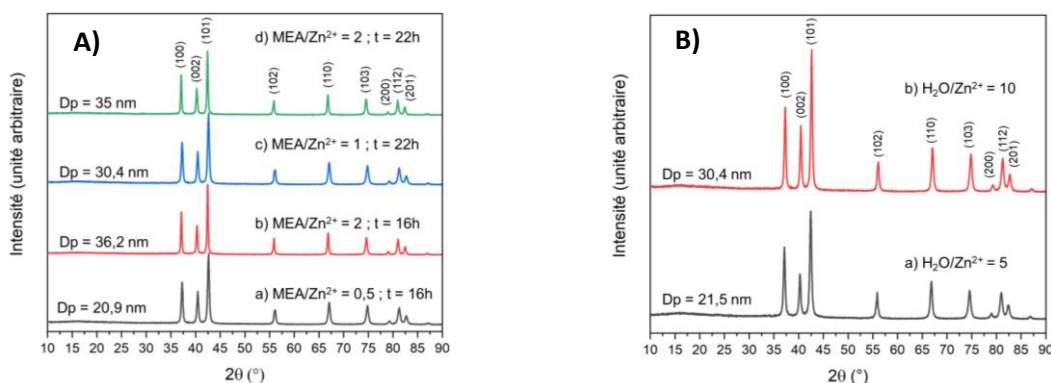


Figure 2 : **A** (Effet du ratio MEA/Zn^{2+})- Diffractogramme des échantillons a) $MEA/Zn^{2+} = 0,5$; $t=16h$ - b) $MEA/Zn^{2+} = 2$; $t=16h$ - c) $MEA/Zn^{2+} = 1$; $t=22h$ - d) $MEA/Zn^{2+} = 2$; $t=22h$. et **B** (Effet du taux d'hydrolyse)- Des échantillons a) $H_2O/Zn^{2+} = 5$ - b) $H_2O/Zn^{2+} = 10$.

Influence du taux d'hydrolyse H_2O/Zn^{2+} : Nous étudions sur cette partie l'influence du taux d'hydrolyse sur la taille des NPs. De ce fait, nous comparons deux échantillons élaborés dans le butanol à $110^\circ C$ avec un ratio $MEA/Zn^{2+} = 1$ et un temps de vieillissement de 22 h. Ils diffèrent de par le taux d'hydrolyse employé lors de leur synthèse ($h=5$ ou 10). La **figure 2B** présente les diffractogrammes des échantillons élaborés dans ces conditions. On observe que les échantillons sont bien cristallisés et présentent les pics caractéristiques du ZnO wurtzite. On remarque également que la largeur des pics, relativement importante, est bien caractéristique des particules de faibles tailles. On remarque qu'en doublant le taux d'hydrolyse la largeur des pics se rétrécit. La taille des NPs augmente donc avec le taux d'hydrolyse. Leurs diamètres cristallins calculés à partir des diagrammes sont de $21,5 \pm 0,9$ nm et $30,4 \pm 0,9$ nm à des taux d'hydrolyses respectifs de 5 et 10. Les

tailles calculées selon les différentes directions cristallographiques sont relativement proches (intervalle de ± 1 nm). Les particules sont toujours isotropes. L'augmentation de la taille des particules avec le taux d'hydrolyse peut s'expliquer par le fait que les métaux très électropositifs tels que le Zn sont très réactifs à l'eau. Ainsi, l'ajout d'eau dans la réaction augmente la vitesse de croissance des particules. On note néanmoins que malgré le fort taux d'hydrolyse les particules sont bien cristallisées, montrant ainsi le rôle d'agent chélatant du MEA venant modérer les réactions d'hydrolyse condensation.

Activité antimicrobienne des nanoparticules de ZnO

Cette partie traite de l'activité antimicrobienne de NPs de ZnO de 35 nm synthétisées dans le butanol à 110°C avec $a=2$ et $h=10$, sur une souche d'*E.coli*. Les **figures 3 A** et **B** présentent les évolutions des densités optiques de la population bactérienne en présence du dispersant PAS seul sans les NPs et des différentes concentrations de NPs en suspension, respectivement. La **figure 3A** montre une évolution de la densité optique des bactéries en absence et en présence de PAS sans les NPs. En comparaison au profil de croissance de la population dans un milieu de culture sans additif, l'ajout de 2400 µg/ml de PAS entraîne un allongement de la phase de latence, une pente de la phase exponentielle de croissance plus faible et une DO maximale inférieure. La présence de PAS entraîne donc une inhibition de la croissance des *E. coli*.

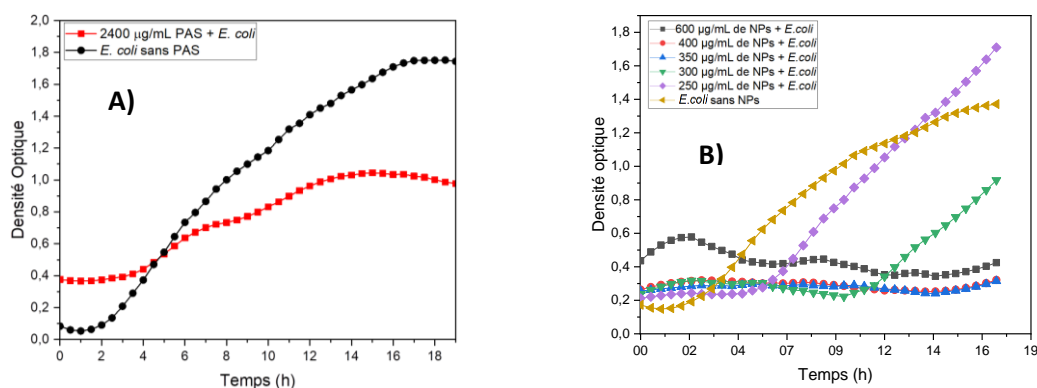


Figure 3 : **A-** Activité antimicrobienne du témoin positif, le polyacrylate de sodium PAS et **B-** Des NPs de 35 nm à des concentrations allant de 600 µg/mL à 250 µg/mL, sur *E.coli*.

Sur la **figure 3B**, nous n'observons pas de variation de la densité optique des bactéries lorsqu'elles sont en contact avec des concentrations en NPs de 600 ; 400 et 350 µg/mL ce qui traduit une absence de croissance bactérienne. En revanche, lorsque la concentration diminue à 300 µg/mL nous observons une multiplication des bactéries après une augmentation de la durée de la phase de latence par rapport au témoin négatif correspondant à une croissance bactérienne sans NPs. Par ailleurs, il faut noter que la concentration du dispersant dans les suspensions de NPs lorsqu'elles sont à 600 µg/mL est égale à celle du témoin positif testé avec le dispersant seul sans NPs, c'est-à-dire 2400 µg/mL. De ce fait, nous pouvons conclure que les NPs à une concentration de 600 µg/mL ont une activité antimicrobienne contre *E.coli*. Pour les autres concentrations en NPs, la concentration en PAS diffère d'un échantillon à l'autre. Par conséquent, nous ne pouvons pas conclure avec certitude quant à l'activité antimicrobienne des autres concentrations en NPs de ZnO. Nous pouvons néanmoins retenir que les NPs de ZnO de 35 nm dispersées à l'aide du PAS ont une activité antimicrobienne contre *E.coli* et qu'elle diminue avec leur concentration. Leur concentration minimale inhibitrice (CMI) est de 350 µg/mL. Le pourcentage d'inhibition à 300 µg/mL est de 50 % par rapport au contrôle négatif. Celui du PAS seul à 2400 µg/mL sans NPs est de 66 %. Le **tableau 1** récapitule les temps de latence, les vitesses spécifiques de croissance, les temps de génération ainsi que les pourcentages d'inhibition des différents échantillons. La conversion des densités optiques en

UFC/mL est effectuée à l'aide d'une équation d'étalonnage $DO = f(X)$ établie au sein du laboratoire pour la souche *E. coli* (ATCC 8739) selon les conditions opératoires, avec X la biomasse en UFC/mL. On peut ainsi déduire les vitesses spécifiques de croissance μ_x et les temps de génération G à l'aide des formules suivantes : $\mu_x = \frac{\ln(X_2) - \ln(X_1)}{t_2 - t_1}$ (2) ; avec X_2 et X_1 la biomasse à la fin et au début de la phase exponentielle de croissance en UFC/mL respectivement et t_2 et t_1 leur temps de croissance correspondant et $G = \frac{\ln(2)}{\mu_x}$ (3). Les pourcentages d'inhibitions sont obtenus à l'aide de la formule suivante : % Inhibition = $\frac{DO_f^{Ec} - (DO_f^{NPs+Ec} - DO_{Témoin}^{Nps sans Ec})}{DO_f^{Ec}}$ * 100 (4) ; avec DO_f^{Ec} la densité optique finale du témoin négatif avec les bactéries seules, DO_f^{NPs+Ec} la densité optique finale du mélange NPs en présence de bactéries et $DO_{Témoin}^{Nps sans Ec}$ la densité optique des NPs seules sans la présence des bactéries. Les résultats du **tableau 1** confirment ceux énoncés précédemment. En effet, le PAS seul à 2400 µg/mL entraîne une inhibition de la croissance des bactéries à 66% avec une augmentation de la durée de la phase de latence de 2h30 min par rapport au témoin négatif. Tandis que pour une même concentration en PAS en présence de NPs à 600 µg/ml aucune croissance de la population bactérienne n'est observée. Toutes les autres concentrations en NPs supérieures ou égales à 350 µg/ml au contact des bactéries n'ont engendré aucune croissance bactérienne, le pourcentage d'inhibition est de 100%. Pour les concentrations faibles de 250 et de 300 µg/ml de NPs, il y a un allongement de la phase de latence en fonction de la concentration des NPs en comparaison du témoin *E. coli* (4h30 pour 250µg/ml et 10h00 pour 300µg). De plus, les paramètres d'état des phases exponentielles en présence des NPs montrent une reprise de la croissance des microorganismes avec une légère variation des valeurs par rapport au témoin *E. coli*. Le pourcentage d'inhibition pour une concentration de 350µg/ml de NPs est de 50 %.

Tableau 1: Tableau comparatif des paramètres d'inhibition du témoin négatif (*E.coli*), du témoin positif (PAS + *E.coli*) et des concentrations (250-600 µg/mL) de NPs de ZnO de 35 nm en présence des bactéries.

	Temps de latence (h)	Vitesse spécifique de croissance μ_x (h^{-1})	Temps de génération G (h)	Pourcentages d'inhibition (%)
<i>E. coli</i>	02h00	0,3	2h19	/
<i>E. coli</i> +2400 µg/mL PAS	04h30	0,09	7h22	66
<i>E. coli</i> + 250 µg/mL de NPs de ZnO 35 nm	06h30	0,17	4h11	Absence d'inhibition
<i>E. coli</i> + 300 µg/mL de NPs de ZnO 35 nm	12h00	0,22	3h13	50
<i>E. coli</i> + >350 µg/mL de NPs de ZnO 35 nm	/	/	/	100

IV. Conclusion

Dans le cadre de cette étude nous avons élaboré un protocole de synthèse de NPs pulvérulentes de ZnO dans la continuité des travaux de Dadi et al.[8]. Nous avons intégré un taux d'hydrolyse élevé afin de garantir la précipitation des NPs. Nous avons mis en évidence l'importance de la température dans la formation et la cristallisation des NPs de ZnO. En effet, nous n'obtenons pas de NPs de ZnO à faible température (70 et 80°C) dans l'isopropanol. Les résultats ont aussi montré que le ratio MEA/ Zn^{2+} ainsi que le taux d'hydrolyse exercent une influence sur la taille des NPs avec une tendance proportionnelle. Les études portant sur l'activité antimicrobienne des NPs obtenues montrent une

efficacité sur la bactérie *E.coli* à 600 µg/ml. Elles indiquent également une corrélation entre le potentiel antimicrobien de ces NPs mises en suspension en présence du PAS avec leurs concentrations. En effet, l'action biocide augmente avec la concentration des NPs. Par ailleurs, les résultats obtenus poussent à approfondir la recherche sur l'activité antimicrobienne du PAS à d'autres concentrations correspondantes aux concentrations en PAS contenues dans les autres concentrations des suspensions de NPs testées dans cette étude. Ils nécessitent également d'optimiser la concentration minimale en PAS nécessaire pour stabiliser les suspensions colloïdales de NPs à faibles concentrations et éventuellement d'effectuer des tests sur d'autres dispersants qui n'ont pas d'impact sur la croissance des microorganismes. A la suite de ces résultats préliminaires, des études pour mettre en évidence l'influence de la taille des NPs sur l'activité antimicrobienne et sur leur intégration dans des revêtements de surface « couche mince » pour lutter contre les infections nosocomiales ont été initiées.

Références bibliographiques

- [1] « Infections nosocomiales · Inserm, La science pour la santé » Inserm.
<https://www.inserm.fr/dossier/infections-nosocomiales>
- [2] Perelshtein, I.; Lipovsky, A.; Perkas, N.; Tzanov, T.; Arguirova, M.; Leseva, M.; Gedanken, A, Making the hospital a safer place by sonochemical coating of all its textiles with antibacterial nanoparticles, *Ultrason. Sonochem.*, 2015, vol. 25, p. 82-88
- [3] *Nanobiotechnology: An Ocean of Opportunities*. Apple Academic Press, 2020, p. 1-21.
- [4] Dhanasegaran, K.; Djearmane, S.; Liang, S.; Wong, L.; Kasivelu, G.; Lee, P.; Lim, Y, Antibacterial properties of zinc oxide nanoparticles on *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Sci. Iran.*, 2021, vol. 28, 6.
- [5] Beyth, N.; Hourri-Haddad, Y.; Domb, A.; Khan, W.; Hazan, R, Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, 2015, vol. 2015, p. e246012.
- [6] Dizaj, S.; Lotfipour, F.; Barzegar-Jalali, M.; Zarrintan, M.; Adibkia, K, Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C*, 2014, vol. 44, p. 278-284.
- [7] Medina-Ramírez, I.; Díaz de León-Macias, C.; Pedroza-Herrera, G.; González-Segovia, R.; Zapien, J.; Rodríguez-López, J, Evaluation of the biocompatibility and growth inhibition of bacterial biofilms by ZnO, Fe₃O₄ and ZnO@Fe₃O₄ photocatalytic magnetic materials, *Ceram. Int.*, 2020, vol. 46, p. 8979-8994.
- [8] Dadi, R.; Azouani, R.; Traore, M.; Mielcarek, C.; Kanaev, A, Antibacterial activity of ZnO and CuO nanoparticles against gram positive and gram negative strains, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.*, 2019, vol. 104, p. 109968.
- [9] Znaidi, L, Sol-gel-deposited ZnO thin films: A review, *Mater. Sci. Eng. B*, 2010, vol. 174, p. 18-30.
- [10] Znaidi, L.; Illia, G.; Guennic, R.; Sanchez, C.; Kanaev, A, Elaboration of ZnO Thin Films with Preferential Orientation by a Soft Chemistry Route, *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 2003, vol. 26, p. 817-821.
- [11] Kurtaran, S.; Kavlak, D.; Kürkçüoğlu, G, Vibrational Frequencies and Structural Determination of Triethanolamine and Diethanolamine by Density Functional Theory Calculations, *Turkish Physical Society*, 2008, INIS-TR-131.
- [12] Yang, M.; Crerar, D.; Irish, D, A Raman spectroscopic study of lead and zinc acetate complexes in hydrothermal solutions, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 1989, vol. 53, p. 319-326.
- [13] Yoshikawa, M.; Inoue, K.; Nakagawa, T.; Ishida, H.; Hasuike, N.; Harima, H, Characterization of ZnO nanoparticles by resonant Raman scattering and cathodoluminescence spectroscopies, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, vol. 92, p. 113-115.
- [14] Mirijam, Z.; Galina, M.; Kolb, U.; Neder, R., Room-temperature sol-gel synthesis of organic ligand-capped ZnO nanoparticles, *J Nanopart Res* 17, 2015, 200.