الجمـــهوريـــة الجـــزائريـــة الديـمقـراطيـــــــة الشـــعبيـــــة
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعـلـيـم الـعـالـــي والـبـحـث الـعـلـمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة يحـي فارس بالمدية
Université Yahia Farés de Médéa

كـلـيـــة الـــــعـــلـــوم
Faculté de la Science

قســـم العـــلـــوم البـيـــولـــوجـيـة
Département de Sciences Biologiques

Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée

Étudié par :

Rania BLLATRECHE & Chaima MENADI

Thème

EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES METHALIQUE BIOSYNTHETIQUE PAR DES MICROORGANISME

Soutenu le jeudi 23 juin devant le jury composé par :

Mourad LICIR	MAA, UYFM	**Président**
Hakima CHERIFI	Pr, UYFM	**Examinatrice 1**
Khaled OTMANINE	MCB, UHBB	**Examinateur 2**
Mahfoud AINAS	MCB, UYFM	**Co-Rapporteur de Mémoire**
Ahmed AZIZI	MCA, UATL	**Rapporteur de Mémoire**

Année universitaire 2021-2022

EVALUATION DE L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES METHALIQUE BIOSYNTHETIQUE PAR DES MICROORGANISME

RESUME. La technologie verte dans la synthèse des matériaux offre des moyens simples, plus sûrs et rentables de produire des nanoparticules (NP) avec un rendement et une pureté élevés que les voies physicochimiques conventionnelles. Jusqu'à présent, divers microbes et plantes ont été utilisés pour synthétiser les NP. Parmi ceux-ci, les actinomycètes ont été explorés en tant que nano-machineries distinctives pour la synthèse de zinc, d'argent et de plusieurs types de NP métalliques par voie intracellulaire. Les actinomycètes représentent un groupe de microbes attrayant pour les nanomatériaux, principalement en raison de leur capacité unique à produire différents composés bioactifs et enzymes agissant comme de puissants réducteurs. Les NP synthétisées à partir d'actinomycètes ont été largement évaluées pour réaliser de nombreuses applications. La caractérisation des NP synthétisées à partir d'actinomycètes a été réalisée en utilisant des techniques telles que FT-IR, UV-vis, AFM et SAA. Le travail s'est concentré sur l'examen des résultats des travaux de recherche menés sur la synthèse actinobactérienne des NP métalliques, leur caractérisation et leurs applications potentielles dans l'industrie laitières.

MOTS-CLES. Biosynthèses ; Nanoparticules ; Argent ; zinc ; Actinomycète ; Biofilm.

EVALUATION OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF BIOSYNTHETIC METALLIC NANOPARTICLES BY MICROORGANISMS

ABSTRACT. Green technology in materials synthesis offers simple, safer, and cost-effective ways to produce nanoparticles (NPs) in high yield and purity than conventional physicochemical routes. So far, various microbes and plants have been used to synthesize NPs. Among these, actinomycetes have been explored as distinctive nano-machineries for the synthesis of zinc, silver and several types of metallic NPs intracellularly. Actinomycetes represent an attractive group of microbes for nanomaterials, mainly due to their unique ability to produce different bioactive compounds and enzymes that act as potent reductants. NPs synthesized from actinomycetes have been widely evaluated for many applications. Characterization of NPs synthesized from actinomycetes was performed using techniques such as FT-IR, UV-vis, AFM and SAA. The work focused on examining the results of research work carried out on the actinobacterial synthesis of metallic NPs, their characterization and their potential applications in the dairy industry.

KEY WORDS. Biosyntheses ; Nanoparticles ; Silver ; Zinc ; Actinomycete ; Biofilm.

تقييم النشاط البيولوجي للجسيمات النانوية المعدنية البيولوجية بواسطة الكائنات الدقيقة

ملخص. توفر التكنولوجيا الخضراء في تصنيع المواد طرقًا بسيطة وأكثر أمانًا وفعالية من حيث التكلفة لإنتاج الجسيمات النانوية (NPs) بإنتاجية عالية ونقاء أكثر من الطرق الفيزيائية والكيميائية التقليدية. حتى الآن، تم استخدام العديد من الميكروبات والنباتات لتجميع .NPs من بين هؤلاء، تم استكشاف الفطريات الشعاعية كآليات نانوية مميزة لتخليق الزنك والفضة وأنواع عديدة من NPs المعدنية داخل الخلايا. تمثل الأكتينوميسيتات مجموعة جذابة من الميكروبات للمواد النانوية، ويرجع ذلك أساسًا إلى قدرتها الفريدة على إنتاج مركبات وأنزيمات نشطة بيولوجيًا مختلفة تعمل كمختزلات قوية. تم تقييم NPsالمركب من الفطريات الشعاعية على نطاق واسع للعديد من التطبيقات. تم إجراء توصيف NPs المركب من الفطريات الشعاعية باستخدام تقنيات مثلSAA، FT-IR ، UV-vis و AFM.ركز العمل على فحص نتائج العمل البحثي الذي تم إجراؤه على التوليف الجرثومي الشعاعي لـ NPs المعدنية، وتوصيفها وتطبيقاتها المحتملة في صناعة الألبان.

الكلمات. التخليق الحيوي؛ الجسيمات النانوية؛ الفطريات الشعاعية والمكورات العقدية؛ التراكمات البكتيرية.

Remerciements

Dieu "الله" merci pour nous avoir donné la santé, la volonté et le courage sans lesquels ce travail n'aurait pas été réalisé.

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et nos remerciements à Mr ***AHMED AZIZI*** *notre promoteur de recherche qui n'a jamais cessé de nous prodiguer conseils, pour avoir dirigé ce travail et pour sons aides pendant toute la durée de réalisation de ce travail et mon Co promoteur Mr* ***MAHFOUD AINAS.***

Nous tenons à exprimer notre gratitude aux membres ***du jury*** *:*

Mr ***LICIR MOURAD****, Mme* ***CHERIFI HAKIMA*** *et Mr* ***OTMANINE KHALED*** *d'avoir accepté de juger ce travail.*

Notre profond remerciement à Mr ***Messaoudi*** *(MCA) en biologies d'université Amar Telidji de Laghouat et ses étudiantes GOUMID SIRINE, HAMDI KAOUTHER et ZEGNINI RACHA.*

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

BELLATRECHE RANIA

MENADI CHAIMAA

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah "ﷻ", **j'ai pu réaliser ce modeste travail**

Que je dédie :

A mon soleil, Ma mère, La plus beau cadeau. Le symbole de la tendresse, du courage, de la responsabilité et de l''amour. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait.

Que DIEU le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour

A ma lune, Mon cher père, école de mon enfance et berceau de ma culture. Qui m'a indiqué la bonne voie en me rappelant que la volonté fait toujours les bonnes. Tes conseils ont toujours ma raison de vivre, mes sources de force, d'inspiration, de courage et d'espoirs. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Que DIEU le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A mon cher mari Nadir Tu m'as toujours encouragé, à faire de mon mieux, ton soutien m'a permis de réaliser le rêve tant attendu. Je prie Dieu le tout puissant de préserver notre attachement mutuel, et d'exaucer tous nos rêves.

A mes chers frères, Ines, Abdelfattah, Douaa, qui m'ont toujours soutenu et encouragé dans mes études. Je demande à Dieu de vous donner la santé, bonheur et le bien-être et de toujours faire de nous un lien les uns pour les autres et un symbole de fraternité.

Aux enfants de la famille Yassin et Yasmine, que Dieu vous donne santé, bonheur et bien-être.

Et bien sur ma belle binôme Bellatrech Rania et sa famille.

A tous mes amies de près ou loin et tous ceux qui connaissant.

MENADI CHAIMA

Dédicaces

Avec l'aide d'Allah "ﷻ", j'ai pu réaliser ce modeste travail que je dédie :

À mon très cher père, Tout l'encre du monde ne pourrait suffire pour exprimer mes sentiments envers un être très cher. Vous avez toujours été mon école de patience, de confiance et surtout d'espoir et d'amour, je tiens à honorer l'homme que tu es. Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour l'estime et le respect que j'ai toujours eu pour toi. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployés pour mon éducation et ma formation. Je t'aime papa et j'implore le tout-puissant pour qu'il t'accorde une bonne santé et une vie longue et heureuse.

À ma mère, que j'aime plus que tout au monde, qu'elle trouve dans cet humble travail l'expression de toute ma reconnaissance et toute ma gratitude. C'est elle qui m'a toujours accompagné et ne m'a jamais oublié dans ses prières. Tous les éloges que je pourrais exprimé ne sauraient être digne de ce qu'elle représente pour moi.

À mes frères Youcef, Amine, Sifo.

Et ma belle-sœur Salsabil.

Et À mon amie bien-aimée Chaimaa.

Et à tous ceux qui sont dans mon cœur.

BELLATRECHE Rania

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIÈRES	*i*
ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES	*iv*
LISTE DES FIGURES	*xi*
LISTE DES TABLEAUX	*xiii*
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES	3
1.1 GENERALITE SUR LA NANOTECHNOLOGIE	3
1.1.1 Nanotechnologie	3
1.1.2 Nanoscience	3
1.1.3 Nanomètre	3
1.2 LES NANOPARTICULES BIOLOGIQUE	4
1.2.1 L'origine des nanoparticules	5
1.2.2 propriété des nanoparticules	6
1.2.3 Type des nanoparticules	6
1.2.3.1 Organiques	6
1.2.3.2 Inorganiques	7
1.2.3.3 à base carbone	7
1.2.4 Nanoparticules métalliques	8
1.2.4.1 Argent	8
1.2.4.2 Zinc	9
1.3 APPLICATION DES NANOPARTICULES	9
1.3.1 Les domaines d'application	10
1.4 SYNTHÈSE DES NANOPARTICULES BIOLOGIQUES	12
1.4.1 L'approche descendent	13
1.4.2 L'approche ascendante	13
1.4.3 Méthode physique	14
1.4.4 Méthode chimique	15
1.4.5 Méthode biologique	15
1.5 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES	16
1.5.1 spectre UV visible	16
1.5.2 spectre FTIR	17
1.5.3 DRX	17
1.5.4 MEB	17
1.5.5 AFM	17
1.5.6 SAA	18
1.6 ACTIVITE BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES	18

1.6.1 Activité antibactérienne	18
1.6.2 Activité anti virale	18
1.6.3 Activité anti inflammatoire	19
1.6.4 Activité anti cancéreuse	19
1.6.5 Activité antidiabétique	19
1.7 BIOFILM	20
1.8 BACTERIES	21
1.8.1 l'actinomycète	22
1.8.2 Types extracellulaires et intra cellulaires d'actinobactéries	23
CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES	24
2.1. PRODUITS CHIMIQUE	24
2.2. MATERIEL ANALYTIQUE	24
2.3. VERRERIES ET CONOMMABLE	24
2.3.1Protocole expérimentale général	24
2.4 MILLIEU DE CULTURE	25
2.4.1 Composition des milieux	25
2.4.1.1 Milieu GYM	25
2.4.1.2 Milieux Muller-Hinton	25
2.5 BIOSYNTHESE DES NPs PAR LES ACTINOMYCETE	26
2.5.1 Méthode	26
2.5.2 Origine des souches	27
2.6 PROTOCOLE DE SYNTHESE DE NANO ARGENT OU ZINC PAR ISOLAT D'ACTINOMYCETE	27
2.6.1 Préparation de la culture	27
2.6.2 Biosynthèse des nanoparticules à partir de surnagent et de la biomasse	29
2.6.3 caractérisation des nanoparticules	31
2.6.3.1 Analyse spectroscopique par l'infrarouge (FTIR)	31
2.6.3.2 Analyse par spectrophotométrie UV-visible (UV)	32
2.6.3.3 Analyse par microscopie à force atomique (AFM)	35
2.6.3.5 Analyse par spectrométrie d'absorption (SAA)	35
2.6.4 ÉVALUATION L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES NANOPARTICULES	36
2.6.4.1 Préparation de la suspension	37
2.6.42 Evaluation de l'activité antimicrobienne	37
2.6.4.3 Evaluation de l'activité anti biofilm	38
CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION	39
3.1 BIOSYNTHES DES NANOPARTICULES PAR ACTINOMYCETE	39
3.1.1 Virage de couleur des mélanges	39
3.2 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES	41
3.2.1 Analyse par spectrophotométrie UV-visible (UV) des nanoparticules	41

3.2.2 Analyse spectroscopique par l'infrarouge (FTIR) des nanoparticules	43
3.2.3 Analyse par microscopie à force atomique (AFM) des nanoparticules	47
3.2.4 Analyse par spectrométrie d'absorption atomique (SAA) des nanoparticules	49
3.3 EFFET ANTIBACTERIEN D'ARGENT ET ZINC	51
3.4 EFFET ANTIBIOFILMN DES D'ARGENT ET ZINC	55
CONCLUSION GENERALE	57
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	58
ANNEXES	61

LISTE DES ABREVIATIONS & NOMENCLATURES

Abréviation	***Signification***
AgNPs	Nanoparticules d'argent.
ZnNPs	Nanoparticules de zinc.
AgNO3	Nitrate d'argent.
Zn (NO 3)2	Nitrate de zinc.
Ag+	L'ion d'argent.
AFM	Microscopie à Force Atomique.
MEB	Microscopie électronique à balayage.
DRX	La diffraction des rayons X.
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier.
UV	UV-Visible.
KnO3	Nitrate de potassium.
k2HpO4	Hydrogénophosphate de potassium.
MgSO4.7H2O	Epsomite.
Fe SO4.7H2O	Mélantérite.
isp2	Gélose à malt ISP-levure.
rpm	Tour par minute.
KBr	Le bromure de potassium.
LB	Lysogeny broth.
D.O	Densité Optique.
µl	Micro litre.
CaCO3	Carbonate de calcium.
NPs	Nanoparticules.
nm	Nanomètre.
ADN	Acide Désoxyribonucléique.
S26	Actinomycète.
E. coli	Escherichia coli.
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa.
s.aureus	Staphylococcus aureus.
k.pnoumenie	Klebsiella pneumonie.
Y. enterocolitica	Yersinia enterocolitica.
mm	Millimètre.
ppm	Partie par million.
Ca	Calcium.
Pd	Palladium.
Ti	Titane.

LISTE DES FIGURES

Numéros	Titres des figures	Pages
1.1	Echelle nanométrique.	4
1.2	Echelle comparative de NPs.	5
1.3	Nanoparticules organiques : a - Dendrimères, b - Liposomes et c– micelles.	7
1.4	Nanoparticules à base de carbone : a - fullerènes, b - graphène, c - nanotubes de carbone, d- carbone nano fibres et e - noir de carbone.	7
1.5	Les applications des nanoparticules.	11
1.6	schéma biosynthèse des nanoparticules, caractérisation et l'application.	12
1.7	Différentes approches de synthèse des nanoparticules métalliques.	13
1.8	Représentation schématique de deux grandes approches de synthèse de Nanoparticule.	14
1.9	Techniques utilisées pour caractérisation des nanoparticules.	16
1.10	Cycle de développement simplifié d'un biofilm.	21
2.1	Mécanisme de synthèse extracellulaire et intracellulaire des AgNPs par les Actinomycètes.	27
2.2	Après l'ensemencement.	28
2.3	Milieu liquide GYM.	28
2.4	Formation des spores.	29
2.5	Lavage des spores.	29
2.6	Avant et après incubation.	30
2.7	Appareil FTIR-8400.	31
2.8	Méthode préparation de l'échantillon.	32
2.9	Appareil d'UV visible scan-lambda.	33
2.10	Bain ultrasons H-D	33
2.11	Après l'agitation et la dilution.	34
2.12	Appareil AFM.	35
2.13	Spectrométrie SAA.	36
2.14	La diffusion en puits.	37
2.17	Une microplaque 96.	38

3.1	Avant et après l'ajout d'AgNO3.	40
3.2	L'aspect du surnageant de la souche S26 avant et après la biosynthèse des nanoparticules d'argent.	40
3.3	Biomasse de S26 avant et après l'ajout de ZnNo.	41
3.4	Spectre UV d'AgNPs surnagent et biomasse.	42
3.5	UV-VIS de ZnNPs de biomasse.	43
3.6	Spectres FTIR d'AgNPs de surnagent	44
3.7	Spectres FTIR d'AgNPs de biomasse.	44
3.8	Spectres FTIR de ZnNPs.	45
3.9	Spectre FTIR de ZnNPs+AgNPs.	46
3.10	Résultats d'AFM de ZnNPs.	47
3.11	Résultats d'AFM d'AgNPs.	47
3.12	Résultats d'AFM d'AgNPs+ZnNPs.	48
3.13	Bulletin d'analyse SAA de biomasse et surnageant.	49
3.14	Bulletin d'analyse SAA de ZnNPs.	50
3.15	l'effet antimicrobien des AgNPs et ZnNPs sur les bactéries : **a)** *P.aeruginosa,* **b)** *k.pnoumenie,* **c)** *s.aureus,* **d)** *E .coli,* **e)***Y. enterocolitica et* ***f)*** *Y. enterocolitica.*	54
3.16	Histogramme d'activité des nanoparticules (Ag, Zn) vis-à-vis le biofilm de K.pneumoniae.	55
3.17	L'activité anti biofilm des nanoparticules d'argent et de zinc contre le biofilm formé par *K. pneumonie.*	56

LISTE DES TABLEAUX

Numéros	Titre des tableaux	Pages
1.1	Les propriétés des nanoparticules.	6
1.2	Les nanoparticules métalliques.	9
1.3	Divers domaines d'application des nanoparticules.	10
1.4	Différent types de nanoparticules métalliques synthétise par actinomycète.	22
2.1	Milieu de culture GYM.	25
2.2	Milieu de culture Muller Hinton.	25
2.3	Classification scientifique d'actinomycète.	26
3.2	résultats d'activité antimicrobienne(en mm) des nanoparticules d'argent et de zinc préparer à partir de la biomasse et surnagent.	52

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La nanotechnologie est en train de devenir un domaine en développement en raison de ses nombreuses applications, ce qui en fait un domaine de recherche approfondie. (Goliska, S.2014) Le développement actuel dépeint une augmentation remarquable de la synthèse de NP à base de métaux ayant des morphologies contrôlées et des caractéristiques frappantes. (Sharma, D, .2015) La taille des NP varie généralement de 10 à 100 nm avec des propriétés souhaitables. Le mot "Nano" est dérivé d'un mot grec signifiant incroyablement petit (Tikariha,S .2012). Les NP métalliques de différents types (Zn, Cu, Mg, Au, Ti et Ag) sont considérées comme les éléments les nanotechnologies qui synthétisent des formes et des tailles séduisantes(Selma,S.2020). Les NP trouvent de nombreuses applications dans différents domaines des sondes biologiques analytiques, de la reprographie, de l'optoélectronique, des instruments d'affichage, (Sastry,S.2012) du traitement de l'eau et de la catalyse photo catalyse, fabrication de capteurs biologiques, analyse ou surveillance de maladies comme les cellules de croissance malignes ou les cellules cancéreuses(Menon,S.2017), antimicrobiens, administration de médicaments, administration de gènes pour le traitement de troubles héréditaires et distinction de métaux ou de réactifs nocifs pour l'environnement, etc(Menon,S. 2017).

Jusqu'à ce jour, différentes voies, y compris physiques, chimiques et biologiques, ont été utilisées pour synthétiser des NP de morphologie, de taille, de forme et de caractéristiques variables. (Akhtar, M.S.2013) Ces techniques aboutissent à la production de NP de haute qualité tout en moment où il est nécessaire d'exploiter les voies de synthèse naturelles ou biologiques à l'échelle commerciale pour une production plus propre, plus sûre, meilleure et moins coûteuse de NP. Au cours des dernières décennies, la synthèse biogénique a suscité une attention considérable parmi les différentes voies de synthèse. La synthèse biologique pour la synthèse des NP métalliques a été réalisée à l'aide d'extraits de plantes entières et de parties de plantes et de micro-organismes tels que des algues, des bactéries, des levures et des actinomycètes, etc. (Tehri, N.2020) Parmi ceux-ci, les bactéries sont considérées comme des candidats idéaux pour la biosynthèse. Les bactéries possèdent un type inhabituel de mécanisme

de résistance aux métaux leur permettant de produire des nanoparticules en réduisant les ions métalliques en particules métalliques. (Ameen, F.2019)

Dans ce contexte, des progrès significatifs dans la biosynthèse des NP à l'aide d'actinomycètes sont apparus comme une phase écologique, fiable, rentable et vitale de la chimie verte qui relie la nanotechnologie à la biotechnologie microbienne. Les actinomycètes sont des bactéries aérobies, à Gram positif et filamenteuses. De nombreux membres des Actinomycètes sont largement connus pour leur capacité unique à produire des métabolites secondaires avec divers types de propriétés biologiques, notamment antimicrobiennes, anticancéreuses, antiparasitaires, antioxydants et antibiosalissures, etc. (Zotchev, S.2011)

Cet travaille est une revue complète de la synthèse biologique des NP métalliques à l'aide d'actinomycètes, de la caractérisation et des applications potentielles dans divers domaines.

Pour cela, l'étude a été structurée en trois chapitres :

- ***Le premier chapitre*** comporte une étude bibliographique sur les différents aspects du sujet notamment sur : les nanoparticules et leurs propriétés, usage et type - L'état de l'art sur les différentes méthodes de synthèse les nanoparticules. *;*
- ***Le deuxième chapitre*** est consacré à l'étude expérimentale et comporte : une présentation du matériel, des protocoles expérimentaux et des méthodes analytiques utilisés dans la réalisation de cette étude. Les essais porteront en premier lieu sur la synthèse des nanoparticules de zinc et d'argent. Par la suite, une étude sera consacrée pour la caractérisation de cette nano à l'aide de plusieurs instruments Et enfin, sur son application en biofilm.
- ***Le troisième chapitre*** porte sur la présentation et la discussion des résultats des essais expérimentaux.

Enfin, une **conclusion générale** incluant des perspectives de l'étude clôtureront ce travail.

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1. SYNTHÈSES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 GENERALITE SUR LA NANOTECHNOLOGIE

1.1.1 NANOTECHNOLOGIE

La nanotechnologie désigne la science qui consiste à concevoir, produire et exploiter des structures et des appareils ayant une ou plusieurs composantes d'environ 100 nanomètres ou moins en contrôlant la forme et la taille (Muhammad R et al., 2018). A ces échelles, la matière acquiert des propriétés inattendues et souvent différentes de celles des mêmes matériaux à l'échelle micro ou macroscopique (Chuto G et al., 2010).

La nanotechnologie est devenue l'une des technologies les plus prometteuses avec une application potentielle dans tous les domaines de la science (Aswarya D et al., 2019) à savoir médicale, pharmaceutique, environnemental, énergétique (Mohamed H.F.A et al., 2019) cosmétique, agricole, séquençage d'ADN, diagnostic et biomoléculaire (Debnathe, 2018).

1.1.2 Nanoscience

La nanoscience est l'étude des matériaux à l'échelle nanométrique qui présentent des propriétés, des fonctions et des phénomènes remarquables en raison des capacités d'interagir avec l'environnement en dépit de ses petites dimensions. Les matériaux de l'échelle nano assument souvent des propriétés inhabituelles qui différent des groupes plus gros du même matériel (Muddinet O.S et al., 2015).

1.1.3 Nanomètre

Le nanomètre (1nm=10-9m, soit un milliardième de mètre) est l'unité reine du monde des nanosciences et des nanotechnologies voir la figure1.1.

Un nanomètre, c'est environ :

- 500 000 fois plus fin que l'épaisseur du trait de stylo à bille.
- 30 000 fois plus fine que l'épaisseur du cheveu.
- 100 fois plus petit que la molécule d'ADN (Azzedine B, 2015).

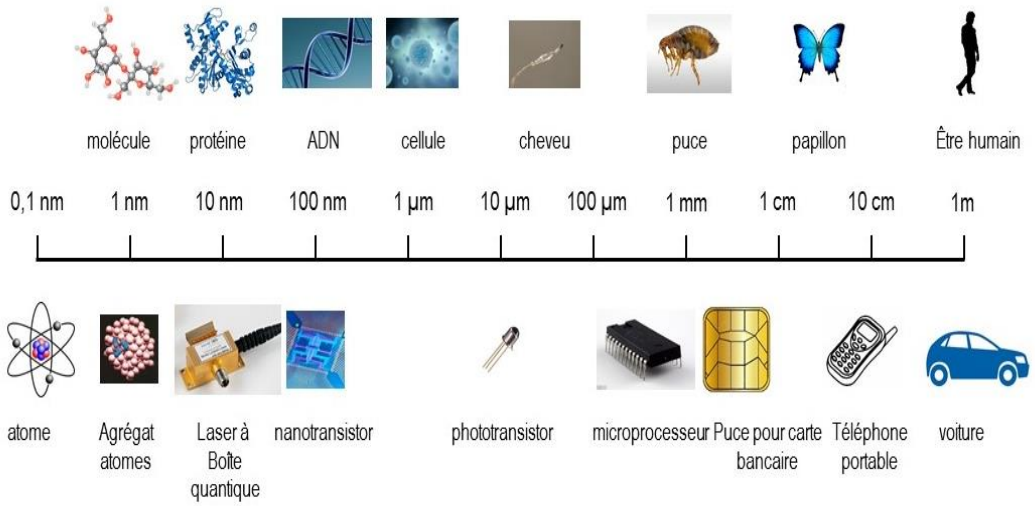


Fig.1.1 : Echelle nanométrique (Barani M et all., 2018).

1.2 LES NANOPARTICULES BIOLOGIQUES

Une nanoparticule est un agglomérat des millions d'atomes métalliques qui forment une molécule Appelées aussi particules ultrafines (PUF), qui sont des nano-objets dont les trois dimensions (Courtois Bet al., 2021). 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, voir la figure 1.2 (Balashanmugam et al., 2019).

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 (Ricaud M et al., 2019).

Le nanomatériau a la taille suivante : 1nm ≤ taille ≤ 100nm (Ricaud M et al., 2019).

Les nanoparticules existent dans la nature et peuvent être créées à partir de divers produits, tels que le carbone ou des minéraux tels que l'argent, sont trop petits pour être vus à l'œil nu et même les avec microscopes de laboratoire conventionnels (Ricaud M et al., 2019).

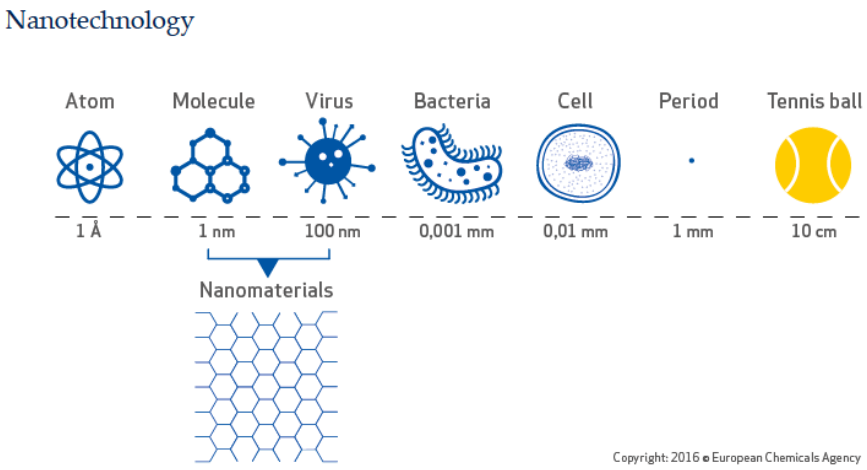


fig.1.2 : Echelle comparative des NPs (Semih Otles, 2013).

1.2.1 L'origine des nanoparticules

Selon leurs origines, les nanoparticules sont classées en deux catégories :

- Les nanoparticules naturelles **:** Les nanoparticules sont présentes dans l'environnement depuis des milliards d'années, comme le noir de carbone et d'autres particules inorganiques sont toutes les particules issues des activités terrigènes, des activités volcaniques, des feux de forêt, des activités marines et des composés organiques (transformations gaz) (Charrakh et al., 2019).
- Les nanoparticules artificielles **:** Les nanoparticules **(NPs)** d'origine anthropogénique sont divisées en deux sous-familles différentes :

  -Les nanoparticules accidentelles **(NPA)** sont dérivées des activités humaines et ont été découvertes accidentellement dans l'environnement (Murr et al., 2008).

  -Les nanoparticules artificielles **(NPM)** sont, toutefois, des produits synthétisés par l'homme pour des applications spécifiques. Dans la dernière catégorie, les NPs les plus connues sont : les nanotubes de carbone (CNT) et les fullerènes ; les nanoparticules d'or et de fer ; les oxydes d'argent et de titane ; les nanoparticules à base de polymère (comme le polyéthylène diol) (Ju-Nam et Lead., 2013).

1.2.2 Propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules, jonction entre l'échelle atomique et le matériau, ont des particularités structurales très spécifiques. Les principales propriétés des nanoparticules sont : optiques, électriques, catalytiques, thermiques, magnétiques, mécaniques ou encore biologiques.

Tab1.1 : Les propriétés des nanoparticules (Ealia, S.A.M et M. Saravanakumar., 2017).

Les propriétés	Les exemples
Optique	la couleur de la nanoparticule. capacités de pénétration, d'absorption et de réflexion de la lumière.
Structurel	des structures cristallines et amorphes, des formes comme sphérique et cylindrique.
Mécanique	élastique, ductile, de traction forces et flexibilité.
Electrique et magnétique	conductivité, semi-conductivité et résistivité.
Biologique	La réactivité et la sensibilité aux facteurs environnementaux tels que l'air, l'humidité, la chaleur et la lumière du soleil, etc.

1.2.3 Type des nanoparticules

1.2.3.1 Organiques

les dendrimères, micelles, liposomes et ferritine, etc. sont communément connus sous le nom de nanoparticules organiques ou les polymères. Ces nanoparticules sont biodégradables, non toxiques et certaines particules telles que les micelles et les liposomes ont un noyau creux ; également connu sous le nom de nano capsules et sont sensibles à la chaleur et rayonnement électromagnétique tel que la chaleur et la lumière voir la figure 1.3 (D.K. Tiwari et al., 2014).

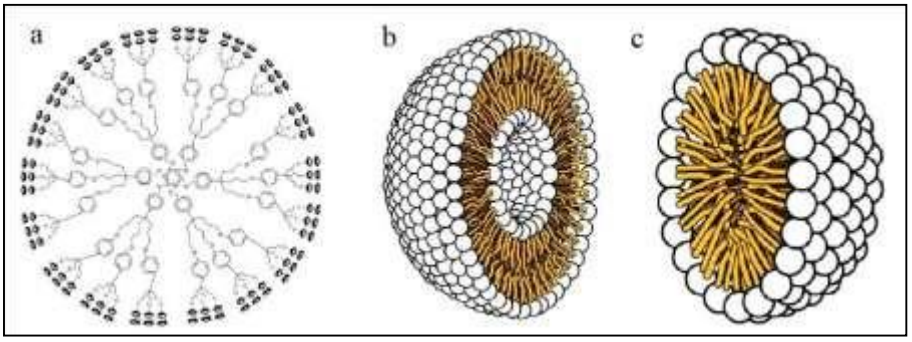


Fig1.3 : Nanoparticules organiques : a - Dendrimères, b - Liposomes et c– micelles (S.A.M. Allia et M. Saravanakumar., 2017).

1.2.3.2.1 Inorganique

Les nanoparticules inorganiques sont des particules qui ne sont pas composées de carbone. À base de métal (aluminium (Al), cadmium (Cd), cobalt (Co), cuivre (Cu), or (Au), fer (Fe), plomb (Pb), argent (Ag) et le zinc (Zn). Et d'oxyde métallique (oxyde de fer (Fe2O3), Oxyde d'aluminium (Al2O3) Oxyde de titane(TiO2)…etc.), les nanoparticules sont généralement classées comme nanoparticules inorganique (C.Y. Tai et al., 2017).

1.2.3.3 à base carbone

Les nanoparticules constituées entièrement de carbone sont connues sous le nom de carbone. Ils peuvent être classés en fullerènes graphène, nanotubes de carbone (CNT), nano fibres de carbone et noir de carbone et parfois du charbon actif en taille nanométrique et sont présentés dans la figure1.4 (S. Bhaviripudi et al., 2007).

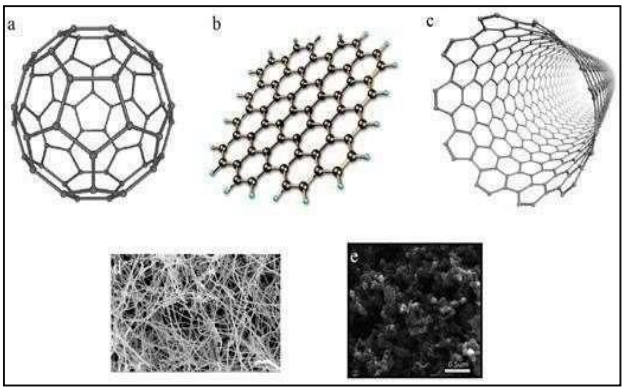


Fig1.4 : Nanoparticules à base de carbone : a - fullerènes, b - graphène, c - nanotubes de carbone, d- carbone nano fibres et e - noir de carbone (S.A.M. Ealia et M. Saravanakumar., 2017).

1.2.4 Nanoparticules Métalliques

Parmi les différentes nanoparticules métalliques, les nanoparticules d'argent (AgNPs) et de zinc (ZnNPs) sont l'un des nanomatériaux les plus essentiels et les plus fascinant. Et sont attiré beaucoup d'attention dans le domaine scientifique. Grâce à leur taille extrêmement réduite, les AgNPs et ZnNPs possèdent une grande surface, ce qui leur offre une énergie de surface élevée et plusieurs sites réactifs. Ces caractéristiques qualifient les NPs comme l'un des matériaux les plus prometteurs en catalyse, médecine, dispositifs médicaux, pharmacologie, biotechnologie, l'électronique, l'ingénierie, l'énergie, les champs magnétiques, ainsi que la remédiation environnementale (Nasrollahzadeh. M, S. Mahmoudi-Gom Yek., 2019).

1.2.4.1 L'argent

L'argent est un métal de transition doux, brillant, ductile et malléable, trouvé à l'état natif sous forme de pépite. Du latin Argentum, qui a donné les initiales de son symbole chimique "Ag" et du grec ancien argoV (argos), qui signifie : blanc, ou brillant, il a donné son nom durant l'antiquité à la cité Argentoratum, l'actuelle ville de Strasbourg (M. Marchioni., 2018).

L'argent a une malléabilité et une ductilité très élevées et, dans sa forme pure, sa conductivité électrique et sa conductivité thermique sont les plus élevées de tous les métaux (F. Zivic, N. Grujovic et al., 2018).

L'argent (Ag) a deux isotopes stables, 107Ag et 109Ag, avec abondance de 51,8% et 48,2% (W. Li, W. Gou et al., 2019).

1.2.4.2 Zinc

L'oxyde de zinc est composé inorganique de formule Zn, C'est une poudre blanche insoluble dans l'eau, largement utilisée comme additif dans de nombreux matériaux et produits on retrouve naturellement sous forme de zincite minérale (coloration jaune à rouge) mais il est en grand partie produit synthétiquement, voir le tableau 1.2 (Oruc, A et al., 2017).

Tab 1.2 Les nanoparticules métalliques (Nasrollahzadeh. M, S. Mahmoudi-Gom Yek., 2019).

Nanomatériaux	Applications	Propriétés, fonctionnalités
Argent	Déodorants Dentifrices Agents de dépollution des eaux et des sols Encre Habillement	Antibactérien Dégradation/adsorption de contaminants Conductivité microélectronique Antibactérien, pigment, teignabilité
Oxyde de zinc	Conditionnement et emballage plastique Crème de soin Cellule photovoltaïque Peinture	Antibactérien Cicatrisant, adsorbeur UV Rendement Matité, autonettoyant, dépollution, résistance aux UV

1.3 APPLICATION DES NANOPARTICULES

1.3.1 Les divers domaines d'application

Parmi les différents types de nanoparticules déjà développées par la science, il y a les nanoparticules d'argent qui en raison de leur propriétés antimicrobiennes, sont utilisées dans divers produits. Les applications typique de ces nanoparticules comprennent les textile comme doublures de vêtements, les appareils médicaux, la conservation des aliments, les cosmétiques, les filtres pour le traitement de l'eau, et les produit pharmaceutique, voir le tableau1.3 et la figure1.5 (A.L.D.A.G.D.SILVA., 2017)

Tab1.3 : Divers domaines d'application des nanoparticules (A.L.D.A.G.D.SILVA., 2017).

domaine application	exemples
le domaine militaire	• L'armure « intelligente » une veste militaire légère et fonctionnelle qui durcit au contact des projectiles. • Vêtement avec la plus grande tolérance aux changements de température. • Invisibilité.
Le domaine d'électronique	• Accroissement des puissances des processeurs et des mémoires. • Montrer en puissance et diminuer en taille les microprocesseurs pentium.
Le domaine de médecine	• La vectorisation des médicaments. • Les puces ADN et l'utilisation de quantum dots. • Dans traitement du cancer. • Dans la chirurgie.
Le domaine d'environnement	• La réduction des émissions de polluants. • Le traitement des effluents notamment par photo catalyse et purification des gaz. • La production d'eau ultra pure à partir d'eau de mer.
Le domaine d'industrie chimique	• Développement de : céramiques, pigments, poudres • couches fonctionnelles (isolation thermique, antiadhésif, antistatique) • recouvrements ultra résistants et outils de coupe extrêmement durs
Le domaine D'agriculture	• meilleure absorption de pesticides • fertilisants et autres substances chimiques agricoles • détection de pathogènes chez les animaux ou les plantes
Le domaine d'énergie	• Amélioration des performances des systèmes de production et d'utilisation de l'énergie • stockage de l'hydrogène • production de batteries et cellules de combustion • matériaux isolants plus efficaces
Le domaine agroalimentaire	• Améliorer la sécurité et la traçabilité • Eliminer les toxines dans les aliments • Augmenter la solidité des emballages

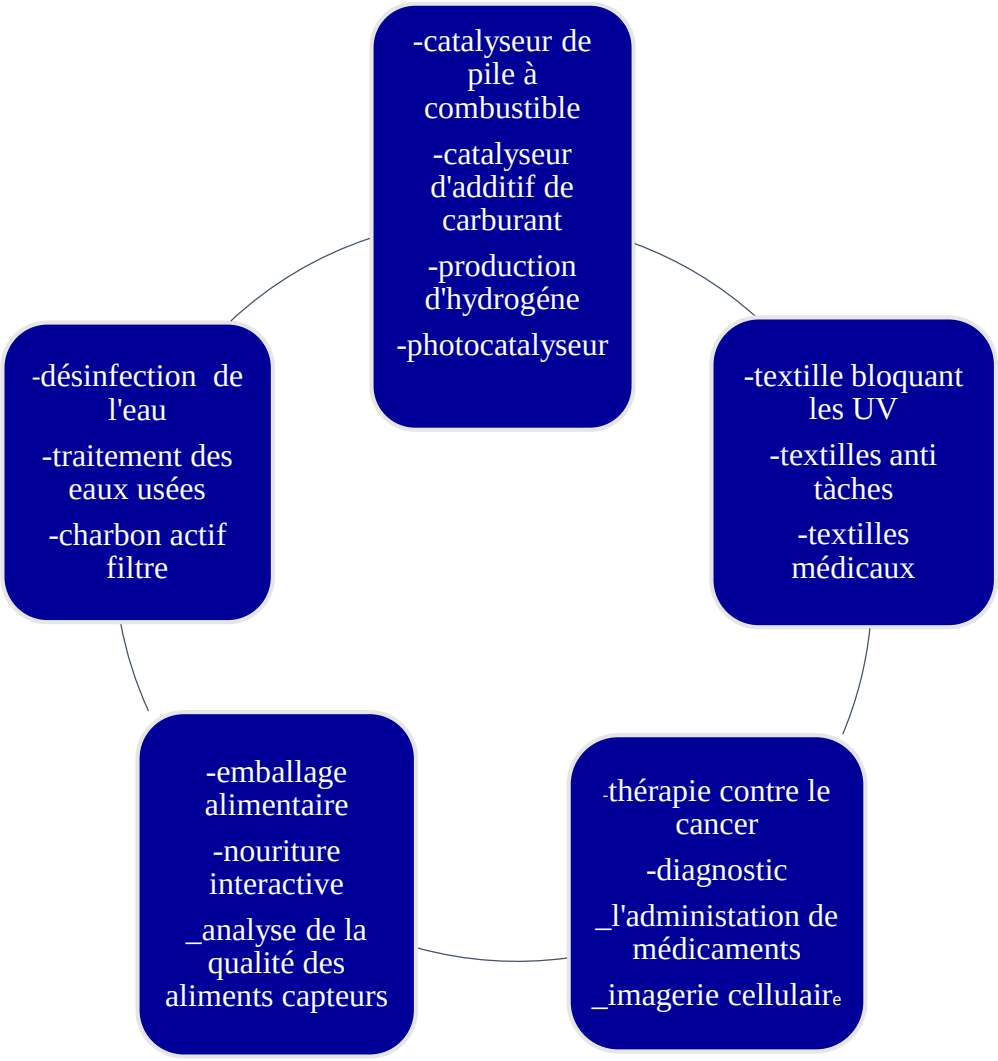


Fig1.5 : les applications des nanoparticules (C.L. Keat et al., 2015).

1.4. SYNTHESE DES NANOPARTICULE BIOLOGIQUES

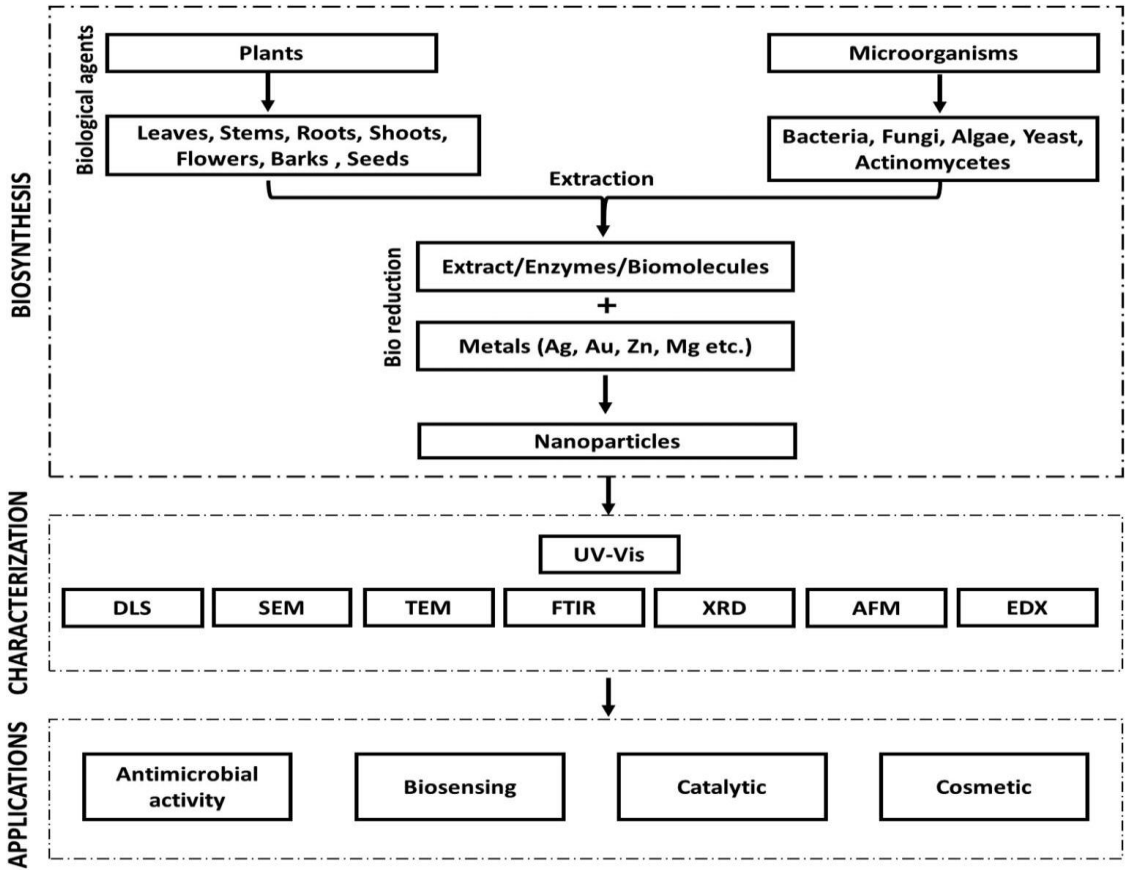


Fig1.6 : schéma biosynthèse des nanoparticules, caractérisation et l'application (Suman Kumari et al., 2022).

Les méthodes de synthèse des nanoparticules d'argent peuvent être classées selon deux principales approches : il s'agit de l'approche «top-down» et de l'approche «Botton-up» voir la figure suivante.

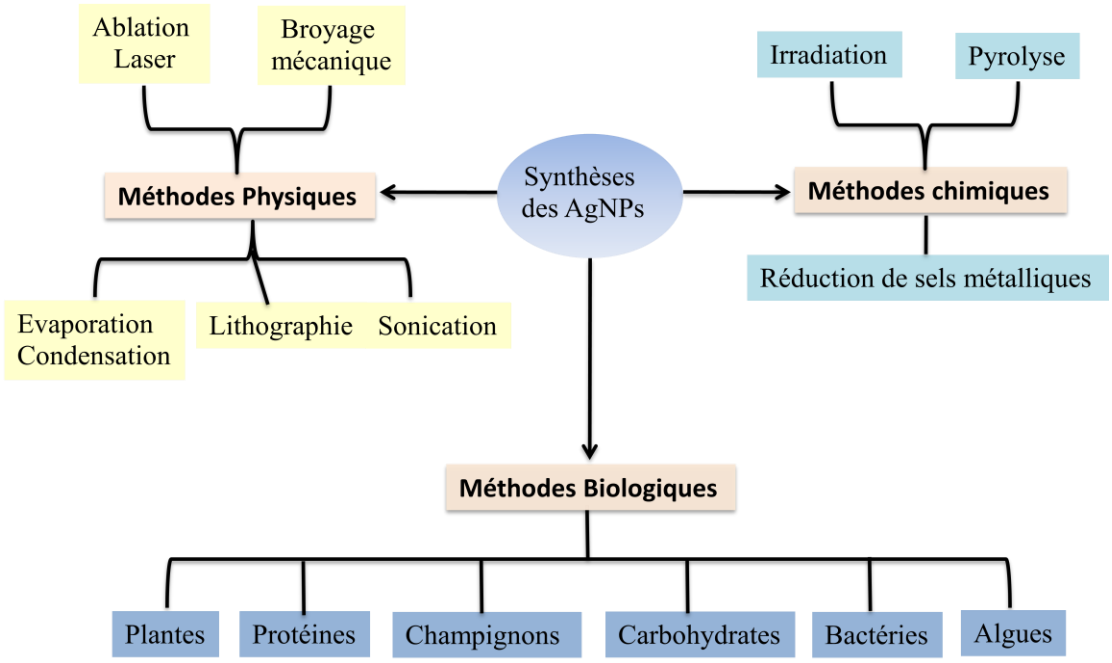


Fig1.7 : Différentes approches de synthèse des nanoparticules métalliques (Patra, J et al., 2014).

1.4.1 L'approche descendante, ou top down (méthodes physiques)

Cette approche est basée sur la miniaturisation. Elle consiste à fractionner un matériau jusqu'à obtenir un objet de taille nanométrique en optimisant les technologies industrielles existantes. L'approche induit principalement l'utilisation des méthodes mécaniques (mécano-synthèse, fortes déformations, …) et Regroupant essentiellement physiques (Le broyage à haute énergie, évaporation-condensation, procédé d'ablation laser…) (Madhumitha et al., 2013).

1.4.2 L'approche ascendante, ou bottom up (méthodes chimiques)

La voie ascendante, Bottom- up, consiste à assembler des composants élémentaires (atomes, molécules, agrégats) pour fabriquer des structures plus complexes, Cette voie nécessite l'utilisation de trois composants indispensables Un précurseur, un agent réducteur et un agent stabilisant. Et L'assemblage ou le positionnement des atomes, des molécules ou des agrégats s'effectue de façon précise, contrôlée et exponentielle, permettant ainsi l'élaboration de matériaux fonctionnels dont la structure est complètement maîtrisée, voir la figure suivante (Madhumitha et al., 2013).

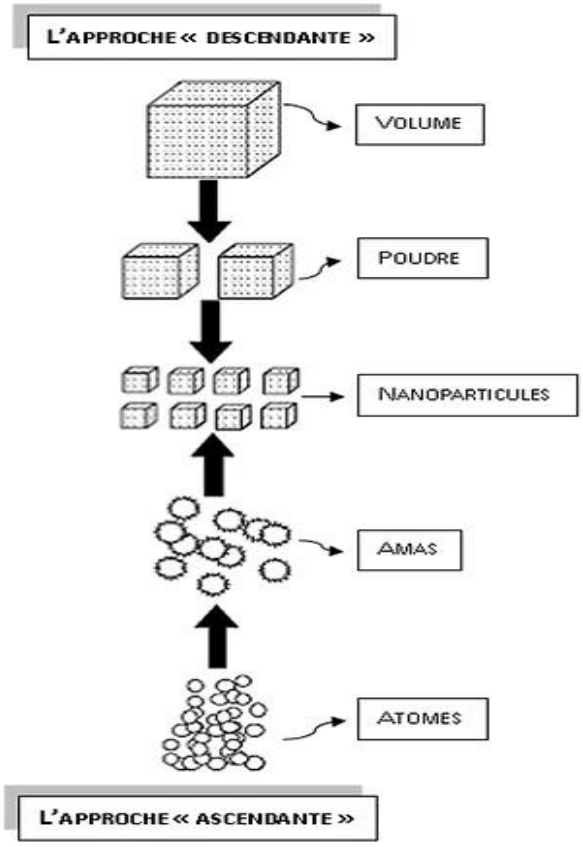


Fig1.8 : représentation schématique de deux grandes approches de synthèse de nanoparticule (Djeghboub w., 2010).

L'approche « ascendante » fait appel à des procédés d'élaboration chimiques et physiques alors que l'approche « descendante » induit, principalement, l'utilisation de méthodes mécaniques.

1.4.3 Méthode physique

Des méthodes mécaniques, telles que l'homogénéisation et le broyage, ont été utilisées pour préparer des nanoparticules d'argent pour une application antimicrobienne. Toutefois, les nanoparticules d'argent obtenues ont formé des agrégats et ont montré un effet bactéricide et inhibiteur négatif. Dans les processus physiques modernes, les nanoparticules d'argent sont généralement synthétisées par évaporation et condensation. Le concept de la synthèse de nanoparticules d'argent au moyen d'un procédé de condensation de gaz inerte a été présenté dans l'article (Simichi, A et al., 2012).

1.4.4 Méthode chimique

Les méthodes chimiques de préparation des nanoparticules d'argent comprennent la réduction chimique en phase aqueuse, organique, la réduction électrochimique et la voie micellaire inverse, Biochimique Réduction ... etc.

Les méthodes chimiques conventionnelles couramment utilisées comprennent l'approche du gel colloïdal, la précipitation chimique, la synthèse colloïdale, la méthode de Langmuir-Blodget (1-b) et les microémulsions. La méthode chimique de synthèse du NP est simple, peu coûteuse et de grandes quantités peuvent être préparées en peu de temps. Des agents tensioactifs ou des méthodes de préparation à base de polymères sont également utilisés pour empêcher l'agglutination et obtenir un meilleur contrôle des NP. La méthode de précipitation chimique homogène est appliquée pour la synthèse économique des molécules d'oxyde métallique à diffusion unique de différentes formes et tailles (Bhattacharjee, C.R et al., 2014).

1.4.5 Méthode biologique

La synthèse de NP à l'aide de micro-organismes, d'extraits de plantes ou d'enzymes comme l'acide désoxyribonucléique (ADN) est appelée biosynthèse. La synthèse biologique de nombreuses NP à l'aide de micro-organismes et d'extraits des plantes est plus couramment utilisée par rapport à d'autres techniques en raison de leur nature écologique car aucun produit chimique toxique n'est utilisé dans ces méthodes, et ces méthodes ne nécessitent pas de pression, température, etc… (Kulkarni, S.K. et al., 2015).

La synthèse verte des nanoparticules émerge progressivement comme une branche clé de la nanotechnologie dans laquelle les nanoparticules sont produites à l'aide d'entités biologiques (Prateek et al., 2017) où La paroi cellulaire chargée négativement interagit électro statiquement avec les ions métalliques chargés positivement et bio réduit les ions métalliques en NPs (Tran et al., 2013). Cette méthode peut être considérée comme une approche respectueuse de l'environnement et également comme une technique à faible coût à haut rendement, et non toxique (Soliman et al., 2018), simple, fiable (Rajeshkumar et Bharath., 2017), une densité élevée, la stabilité et la solubilité immédiate des nanoparticules préparées dans l'eau (Zhang et al., 2016). Par rapport aux méthodes de synthèse chimique et physique qui indiquent une faible biocompatibilité et présentent des risques biologiques latents consomment une énergie importante, nécessitent une pression élevée, coûteuses et ont un faible rendement (Mohamed et al., 2019).

Nous avons choisi une méthode biologique pour plusieurs avantages :

Les avantages des méthodes biologiques

Approche simple, rapide et fiable**.**

Faible coût de préparation en raison de la disponibilité de la plupart des matériaux.

Il n'est pas nécessaire d'utiliser des températures et des pressions élevées.

La facilité de la méthode ne nécessite pas des techniques compliquées.

La méthode est sûr et n'utilise ni ne produit des substances toxiques ou nocives pour l'environnement.

1.5 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

Après la synthèse des Nano via la méthode « biologique », une étape très importante est celle de leur caractérisation par la forme, la taille, la surface et la dispersité, pour cela divers des techniques sont utilisées :

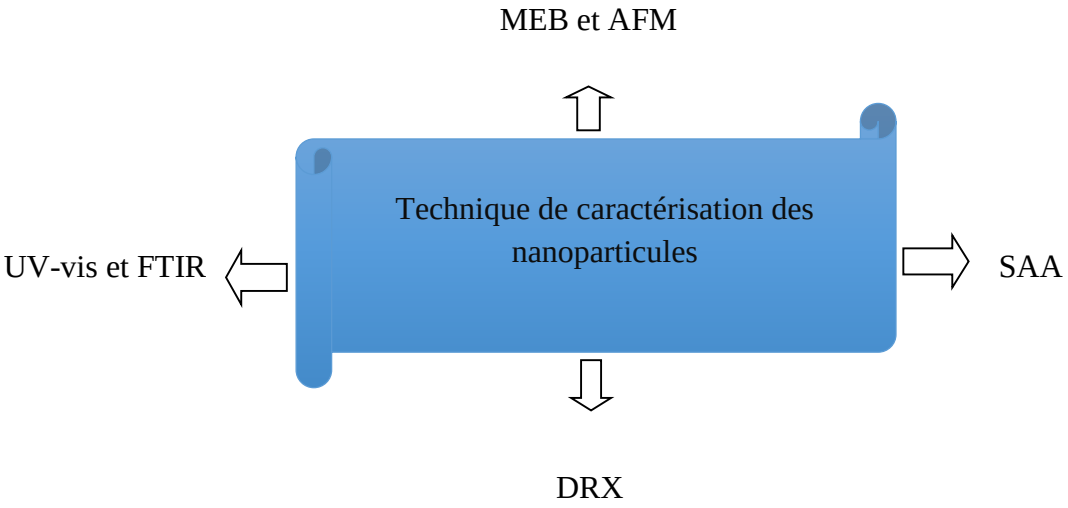


Fig1.9 : Techniques utilisées pour caractérisation des nanoparticules.

1.5.1 Spectroscopie UV-Visible

La spectrophotométrie UV-visible est l'une des techniques simple, facile, rapide, sensible et la plus couramment utilisée pour la caractérisation des nanoparticules synthétisées. Il s'agit de quantifier la quantité de rayonnement ultraviolet ou visible absorbée par un constituant en solution. Et mesure le rapport, de l'intensité de deux faisceaux de lumière dans la région UV Visible (Rajeshkumar S et Bharath L.V., 2017).

1.5.2 Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

FTIR est un moyen non invasif, adapté, précieux, rentable, et simple pour étudier le rôle des biomolécules dans la réduction de l'AgNO3 en argent.

Lorsque le rayonnement infrarouge traverse les résultats de l'échantillon, certain de ce rayonnement est absorbé par l'échantillon et reste traversé. Le spectre résultant signifie l'absorption et la transmission en créant une empreinte moléculaire d'échantillon qui représente son identité (Rajeshkumar S et Bharath L.V., 2017).

1.5.3 Diffraction des rayons X (DRX)

Le spectre DRX des AgNPs bio synthétisés indique la réduction de nitrate d'argent en AgNPs et l'état d'oxydation des particules, ainsi la cristallinité d'argent Ag°. La taille cristalline moyenne des AgNPs s'est à peu près être de 12,95nm à un visage cubique centré (Belfennache D., 2010).

1.5.4 Microscopie électronique à balayage (MEB)

C'est une technique couramment utilisée, car la manipulation de ce type d'appareillage est assez commune, dont la résolution reste assez bonne, variant entre 1 à 7 nm. Outre l'observation de la microstructure, elle permet d'identifier la composition chimique à l'échelle locale et même globale de l'échantillon, via l'analyseur EDX, incorporé dans l'appareil (Belfennache D., 2010).

1.5.5 Microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie à force atomique utilisée pour visualiser la topographie d'un échantillon. Un levier micrométrique souple, caractérisé par sa constante de raideur K, et muni d'une pointe effilée à son extrémité libre, est utilisé pour balayer la surface d'un échantillon.

Lorsque la pointe est amenée à proximité de forces, pouvant être attractives ou répulsives, appariassent, provoquant la déflexion du levier. Ces dernières sont fonction de nombreux Paramètres tel que la nature du milieu dans lequel les mesures sont effectuées (vide, air, liquide.), la pointe utilisée ou l'échantillon (Belfennache D., 2010).

1.5.6 Spectrométrie d'absorption atomique (SAA)

L'absorption atomique est un processus qui se produit lorsqu'un atome appartenant à l'état fondamental passe à l'état excité par l'absorption d'une énergie, sous la forme d'un rayonnement électromagnétique, qui correspond à une longueur d'onde spécifique. Le spectre d'absorption atomique d'un élément est constitué d'une série de raies de résonance, tous originaires de l'état électronique fondamentale et finissent dans différents états excités. En général, la raie de la transition entre l'état fondamental et le premier état excité définie la plus

forte capacité d'absorption, et c'est la raie habituellement utilisé. Les transitions entre l'état fondamental et l'état excité se produire uniquement lorsque le rayonnement incident, provenant d'une source lumineuse, est exactement égale à la fréquence d'une transition spécifique. Une partie de l'énergie de la radiation incidente I0 est absorbé. Le rayonnement émis est donné par I I = I0e - (εl) (Pradyt Patnaik., 2014).

1.6 Activités biologiques des nanoparticules

Les nanoparticules ont reçu une énorme attention des scientifiques en raison de leur remarquable défense contre divers micro-organismes pathogènes (Rajeshkumar S., Bharath, L.V., 2017).

1.6.1 Activité antibactérienne

Les nanoparticules ont été démontrés comme un biocide efficace contre une bactérie à large spectre comprenant à la fois les Gram négatif et les Gram positif y compris *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutants* et *Bacillus* subtilis (Zhang X et al., 2016). Le rapport surface/volume élevé des AgNPs augmente leur contact avec les microorganismes, favorisant la dissolution des ions argent, améliorant ainsi l'efficacité biocide (Keywan Met al. 2019).

Ils sont montrés un effet antibactérien à long terme par rapport à deux autres désinfectants l'hypochlorite de sodium (NaClO) et le phénol (C6H5OH) (Tran Q., Nguyen V., 2013).

L'activité biocide des nanoparticules dépend de plusieurs caractéristiques morphologiques et physicochimiques (par exemple, taille, forme et surface) les AgNPs de plus petite taille sont plus susceptibles de traverser la membrane cellulaire et d'entrer dans la cellule, la concentration d'AgNPs qui empêche la croissance bactérienne est différente pour chaque type de bactérie (Carolina D.S., Avinach P., 2014).

1.6.2Activité antivirale

Les nanoparticules ont un fort potentiel antiviral en raison de leurs interactions multiples avec la glycoprotéine récepteur et / ou enveloppe virale, ils peuvent inhiber la multiplication virale à l'intérieur de la cellule hôte en empêchant la réplication ou en bloquant l'entrée de particules virales à l'intérieur de la cellule hôte (Carolina D.S et al., 2014). Comme le virus de l'immunodéficience humaine (HIV-1), virus de l'hépatite B et virus syncytial respiratoire (Li W et al., 2011).

1.6.3 Activité anti-inflammatoire

Des études ont montré que l'exposition au NPs conduit à la sécrétion de plusieurs cytokines et chimiokinés par les cellules épithéliales, conduisant à l'infiltration de macrophages dans les zones exposées. Ensuite les macrophages déclenchent la libération de cytokines inflammatoires qui induisent à la régulation positive des médiateurs inflammatoires induisent une production accrue de cytokines inflammatoires du système circulatoire vers le site de l'inflammation (Keywan M et al., 2019).

1.6.4 Activité anti cancéreuse

Les NPs peuvent être considérés comme un outil prometteur dans la prévention contre divers types de cellules cancéreuses, comme le carcinome hépatocellulaire, le cancer du poumon et du sein, et le carcinome cervical en raison de leur meilleure pénétration, leur propriétés anti-angiogéniques et antiprolifératives et la facilité de leur suivi dans le corps (Sang Hun., 2019 Adnan., 2020).

La propriété antiproliférative dans les cellules cancéreuses est due à leur capacité à endommager l'ADN, à briser les chromosomes, à produire une instabilité génomique et à perturber l'homéostasie du calcium (Ca2+) qui induit l'apoptose et provoque une instabilité du cytosquelette. La lésion cytosquelettique bloque le cycle et la division cellulaire, favorisant l'activité anti prolifération des cellules cancéreuses (Sang Hun et al., 2019). Ont démontré que les AgNPs (15 nm) peuvent induire l'apoptose et améliorer la radiosensibilité sur les cellules cancéreuses (Carolina et al., 2014).

1.6.5 Activité antidiabétique

Les NPs piègent les radicaux libres et réduisent les niveaux d'enzymes qui provoquent l'hydrolyse des glucides complexes (α-glucosidase et α-amylase), ce qui entraîne une augmentation du taux de consommation de glucose (Prateek M et al., 2017).

Procédure qui attaque les biofilm dans l'industrie laitière

La présence de biofilms dans l'industrie laitière est un problème majeur en termes de qualité, de technologie et potentiellement de santé publique. Les biofilms peuvent se former sur différents types de surface et particulièrement sur l'acier inoxydable qui composent la majorité des équipements de transformation laitière. Les biofilms laitiers comportent un écosystème microbien complexe qui inclut des microorganismes pathogènes ou d'altération. Ces microorganismes indésirables sont responsables de rejet des produits, des pertes économiques ou même des maladies d'origine alimentaire. En plus de ces problèmes, les biofilms sont

responsables des blocages mécaniques et de l'impédance des processus de transfert de chaleur et augmentent la vitesse de corrosion des surfaces. Pour ces raisons, les surfaces de contact alimentaires doivent être nettoyées et désinfectées adéquatement pour éviter ou contrôler la formation de biofilm.

1.7 BIOFILM

Les biofilms bactériens sont des amas structurés de cellules bactériennes enrobés d'une matrice polymérique et attachés à une surface. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques. La capacité de former un biofilm est maintenant reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. La présence de biofilms lors d'infections demande donc de nouvelles méthodes de prévention, de diagnostic et de traitement. De même, la présence de biofilms sur des surfaces retrouvées à la ferme, à l'abattoir ou à l'usine de transformation affectera l'efficacité du protocole de désinfection. De façon surprenante, la formation de biofilms chez les bactéries pathogènes des animaux et les bactéries zoonotiques est un sujet relativement peu étudié. Ce bref compte rendu a pour objectif de sensibiliser les intervenants en santé animale à l'importance des biofilms, voir la figure suivante1.10 (Canadian Journal of Veterinary Research., 2014).

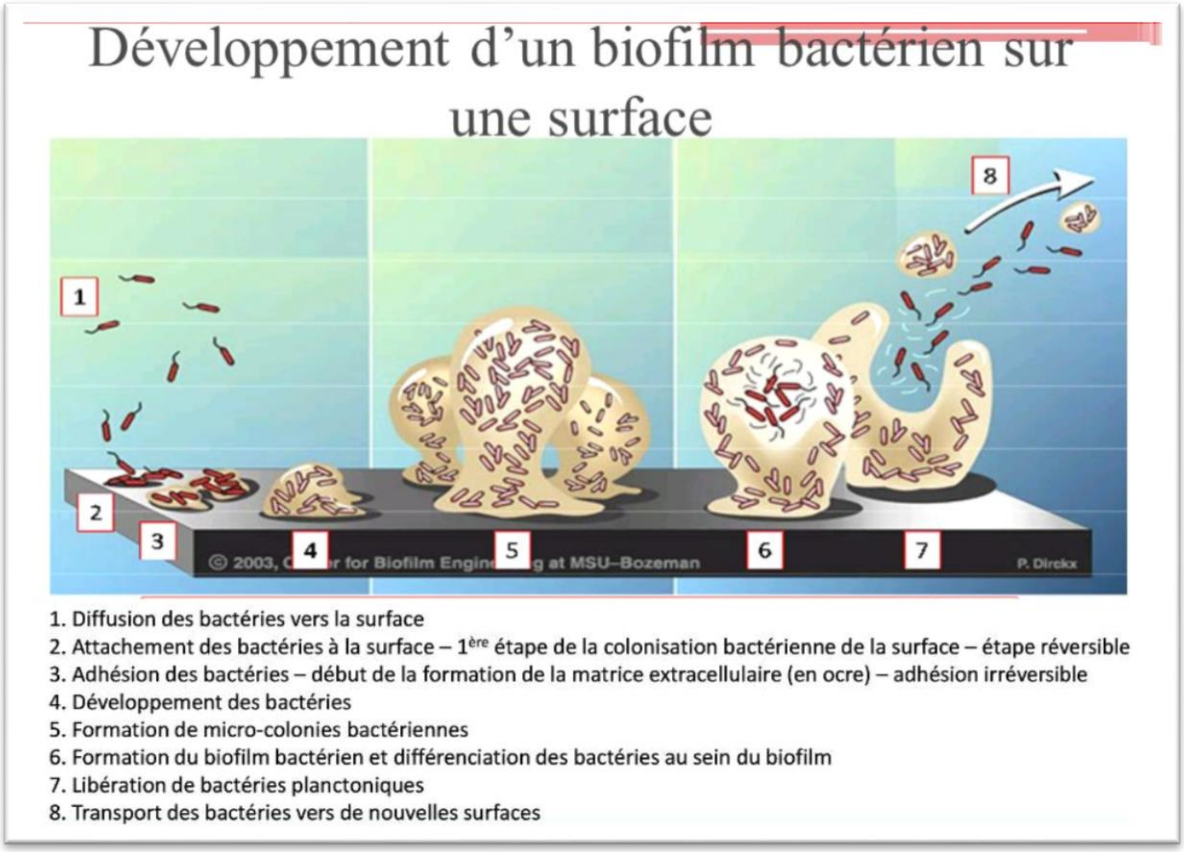


Fig1.10 : Cycle de développement simplifié d'un biofilm (Ghigo J-M., 2003).

1.8 Les bactéries lactiques

L'utilisation de bactéries gagne rapidement une importance en raison de son succès croissant, de sa facilité de manipulation et de sa modification génétique Les NPs ont été synthétisées en utilisant à la fois des bactéries gram-positives et gram négatives pour former ces nanoparticules d'argent, il faut savoir que certaines bactéries ont la capacité de produire des nanoparticules intracellulaires tandis que d'autres produisent des NPs extracellulaire (Chauvel., 2018). Les bactéries utilisent couramment le nitrate comme source principale d'azote, grâce à quoi le nitrate est converti en nitrite par le nitrate réductase, en utilisant le pouvoir réducteur d'une forme réduite de nicotinamide adénine di nucléotide (NADH). En fait, l'utilisation de la nitrate réductase comme agent réducteur s'avère jouer un rôle clé dans la bio réduction des ions (Sang Hun et Bong-Hyun., 2019).

Parmi les bactéries qui attaquent le biofilm dans l'industrie laitière est :

1.8.1 Les actinomycètes

Les actinomycètes sont définis comme des bactéries filamenteuses, septes, ramifiées, formant des colonies circulaires constituées d'hyphes, qui irradient par croissance centrifuge tout autour du centre de développement, cela explique leur dénomination ‹‹Actinomycètes›› (Aouar L., 2015). Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de, Constantine. Etude des caractéristiques culturales des souches isolées et purifiées (Mémoire de Magister. P : 4-8).

Les Actinomycètes sont des bactéries de coloration Gram positif dont le coefficient de Chargaff est supérieur à 55%, Ce sont des bactéries hétérotrophes, ainsi leur paroi cellulaire ne renferme pas ni la chitine, ni la cellulose mais du peptidoglycane contenant la lysine ou de l'acide diaminopimélique, (Prescott., 2010).

La plupart des Actinomycètes sont toujours immobiles, certains types produisent des spores flagellés, permettant leur désertion dans les habitats aquatiques (Boucheffa K., 2011).

Tab1.4: différente types des NP métalliques synthétisées par les actinomycètes (Suman K et al., 2022).

Actinomycètes	Type of NPs
Rhodococcus sp.	Gold
Gordonia amicalis HS-11	Silver, gold
Streptomyces sp. VITBT7	Silver
Streptomyces sp. NK52	Gold
Streptomyces sp. MBRC-91	Silver
Saccharomonospora sp.	Gold
Streptomyces sp.	Silver
Streptomyces parvulus SSNP11	Silver
Streptomyces sp.	Zinc
Streptomyces rochei	Silver
Streptomycetes viridogens HM10	Gold
Streptomyces hygroscopicus	Gold
Streptomyces sp. ERI-3	Silver
Streptomyces aureofaciens MTCC356	Silver
Streptomyces spp.	Silver
Thermomonospora sp.	Gold
*Streptomyces spp.*LK3	Silver
Streptomyces albidoflavus CNP10	Silver
Streptomyces sp.	Copper
Streptomyces capillispialis ca-1	Copper
Streptomyces parvulus DPUA1549	Silver

1.8.2 Types extracellulaires et intra cellulaires d'actinobactéries

Il a été rapporté que les actinomycètes synthétisent les NP de deux manières, à savoir extracellulaire et intracellulaire.

De plus le type de synthèse des NP métalliques dépend du site de localisation dans la cellule, des espèces réductrice (enzyme / métabolites) sont impliquées contrairement à les synthèses intracellulaires.

La synthèse extracellulaire se produit lorsque la paroi cellulaire secrétée ou les réticentes associées.

La synthèse intracellulaire entraine l'accumulation de NPs ayant dimension particulières et avec moins de polydispersité (Suman Kumari et al., 2020).

CHAPITRE 2. MATERIELS & METHODES

CHAPITRE 2. PRODUITS, MATERIELS & METHODES

Ce travail a été effectué au niveau du laboratoire de recherche de microbiologie de l'université Amar Telidji de AGOUAT, au hall technologie de Médéa durant une période qui s'étend de la fin du mois de février jusqu'au mois de juin 2022.

2.1 Produits Chimiques

Nitrate d'argent, Nitrate de Zinc, Ca Co3.

2.2 Matériels Analytiques

Autoclave, bain marie, balance électrique, étuve, réfrigérateur, congélateur, microscope optique, ph mètre, plaque chauffante, agitateur rotatif, anse de platine, papier aluminium, pince de platine, tube éppendorf, spatule, bec benzène, micropipette, portoir pour tube, les micros plaque 96, spectre UV visible (LAMBDA 25PERKIN ELMER), FTIR (SHIMADZU 8400), MEB, AFM, SAA (CEFERAL) et DRX.

2.3 Verreries et consommables

Becher, boite de pétrie, erlenmeyer, fiole, flacons, lame et lamelles, verre de montre, papier para film, pissettes, gants jetables, marqueurs.

2.3.1Protocole expérimentale général

Le protocole expérimental est constitué de déférente étape :



2.4 Milieu de culture

Les milieux de culture utilisée sont : GYM (ISP2 +Ca CO3) et Muller- Hinton Sont les plus convenables pour la culture des souches ainsi que la réalisation du test d'activité antimicrobienne et anti biofilm.

2.4.1 Composition des milieux :

2.4.1.1 Milieu GYM

Tab.2.1 : Milieu de culture GYM.

Glucose	**4.0 g**
CaCO3	**2.0g**
Agar	**12g**
Eau distillée	**1L**
PH	**7,2**
Extrait de levure	**4.0 g**
Extrait de malt	**10 g**

2.4.1.2 Milieux Muller-Hinton

Tab.2.2 : Milieu de culture Muller Hinton.

Infusion de viande	**300g**
Hydrolysat de caséine	**17,5g**
Amidon	**1,5g**
Agar	**17g**
Eau distillée	**1L**
PH	**7,4**

2.5 Biosynthèse des NPs par les actinomycètes

Tab.2.3 : classification scientifique d'Actinomycètes.

Suspension	*Actinomycètes*
Règne	Bactérie
Classe	Actinobacteria
Division	Actinomycètes
Ordre	Streptomyces

2.5.1 Méthode de la biosynthèse

Pour la biosynthèse des nanoparticules, il existe plusieurs méthodes dans cette étude. La méthode interne a été utilisée, en fonction de la disponibilité des outils recommandés et des étapes plus simple.

Les actinomycètes sont connus pour posséder plusieurs résistances aux métaux mécanismes fonctionnant principalement sur le principe de la chimie détoxification ainsi que cation chimiosmotique ou ATPase ou efflux d'ions dépondant de l'énergie basé sur des anti-transporteurs de protons de la cellule. En utilisant ce principe, les actinobactéries peuvent facilement détoxifier les ions métalliques non toxiques insolubles par précipitions extracellulaire, bio minéralisation ou réduction ou bioaccumulation intracellulaire. Le largement mécanisme accepté sous-jacent à la biosynthèse des NP par actinomycètes est illustré à la figure. Il implique différents types d'espaces réductrices comme les protéines intracellulaire, les cofacteurs et enzymes principalement nitrate réductase et enzymes extracellulaires et des composants de la paroi cellulaire chargée négativement se lie aux ions métalliques en raison de sa charge positive. Comme le montre la figure, le positif les ions d'argent ou zinc de la solution de sel métallique de nitrate d'argent ou zinc se lient à la paroi cellulaire chargée négativement et subissent une réduction en Ag0 afin de former des AgNPs ou ZnNPs par les espèces réductrices mentionnées ci-dessus. En utilisant un principe similaire, la réduction d'autres solutions des sels métalliques se produit aux NP respectifs par les cellules d'actinomycètes, voir la figure suivante 2.1 (Suman Kumari et al., 2020).

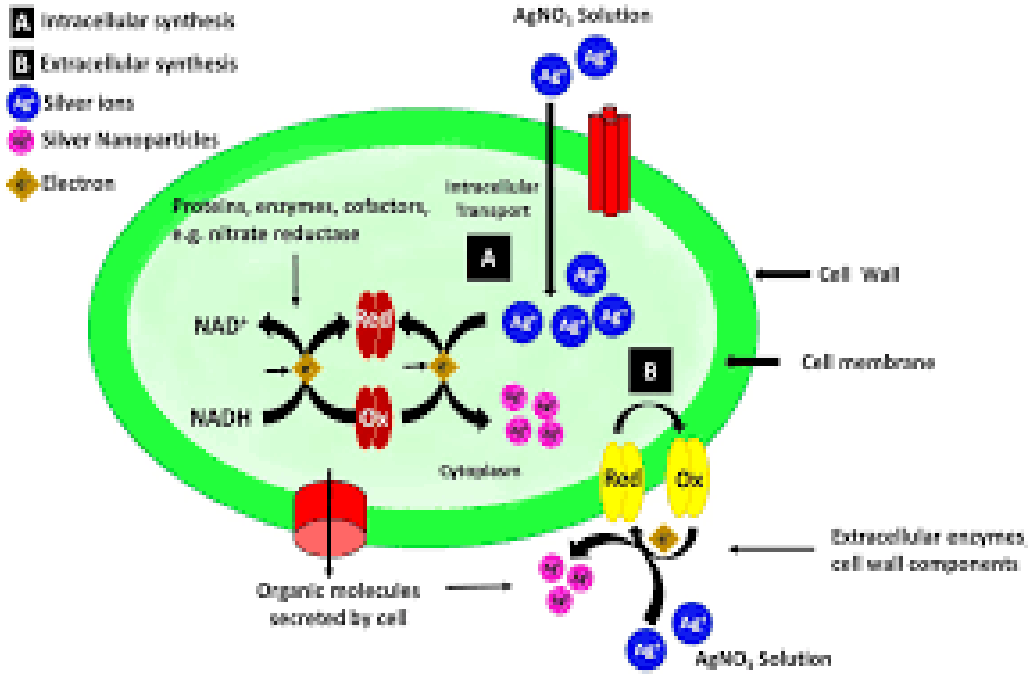


Fig.2.1 : Mécanisme de synthèse extracellulaire et intracellulaire des AgNPs par actinomycètes (Suman Kumari et al., 2020).

2.5.2 Origine des souches :

L'origine de la souche S:26 utilisée dans cette étude a été isolée à partir d'une échantillon de sédiments marins prélevée a une profondeur de 3 mètre, à partir de la coté de AIN TURK wilaya d'ORAN, en utilisant le milieu caséine amidon agar(amidon 10 g/l ; caséine 0.3 g/l; KNO3 2g/l ; Na CL 2g/l ; k2HpO4 2g/l ; MgSO4.7H2O : 0.05 g/l ; CaCO3 0.02 g/l ; Fe SO4.7H2O 0.01 g/l ; agar 18.0 g/l), cette souche a été sélectionnée, parmi plusieurs isolats obtenus à partir de sédiments marins, parce qu'elle a montré une bonne activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries et champignons tests. Elles ont été isolées, purifiées et identifiées.

2.6 Protocole de biosynthèse de nano argent ou zinc par isolat d'Actinomycète

Les milieux choisis lors de cette étude sont les plus convenables pour la culture des souches ainsi que la réalisation du test d'activité antimicrobienne et anti biofilm.

2.6.1 Préparation de la culture

Dans le but de préparer les cultures qui sont utilisés ensuite pour la biosynthèse des nanoparticules d'Ag et de Zn, Selon la méthode de (Liang, X et al., 2019).

Premièrement la souche ***Streptomyces* spp** a été ensemencée dans un milieu de culture solide GYM (isp2+CaCO3) (10g d'extrait de malt, 4 g de glucose, 4 g d'extrait de levure, 2 g de CaCO3, 12 g de agar 1 L eau distillé ; pH=7,2) voir la figure suivante 2.2.



Fig.2.2 : Après l'ensemencement (Original., 2022).

Par la suite dans un milieu liquide GYM dans les Erlenmeyers (isp2+CaCO3) mais sans agar

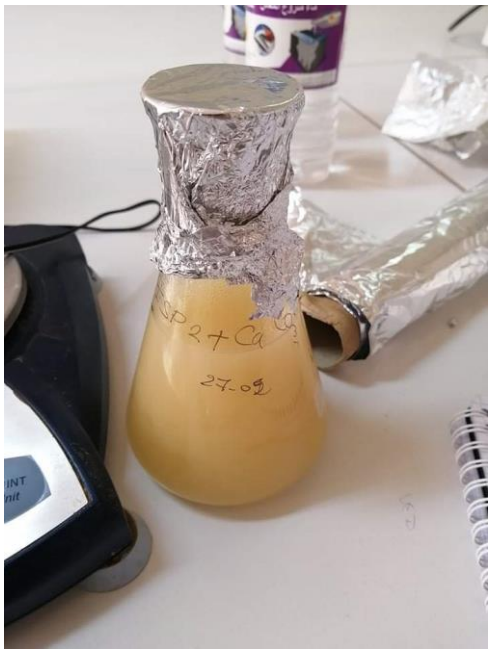


Fig.2.3 : Milieu liquide GYM (Original., 2022).

Après incubation dans des conditions de croissance à 30C, pH 7,2 sous agitation de 150rpm, la durée d'incubation variée en fonction du cas, en effet : Pour préparer les nanoparticules à partir de la biomasse, l'incubation est réalisé pendant 5jr, alors que pour la préparation des nanoparticules à partir de surnagent, la durée de la culture c'est 14 jours voir la figure suivante.



Fig.2.4 : Formation des spores (Original, 2022).

2.6.2 Biosynthèse des nanoparticules à partir de surnagent et de la biomasse

Après 14 jours d'incubation, les cultures sont ensuite centrifugées à 6000rpm pendant 40 min, pour séparer la biomasse par rapport au surnagent. La biomasse a été ensuite lavée trois fois avec l'eau distillée stérile, puis repris dans 100ml d'eau distillé dans deux Erlenmeyer différentes.

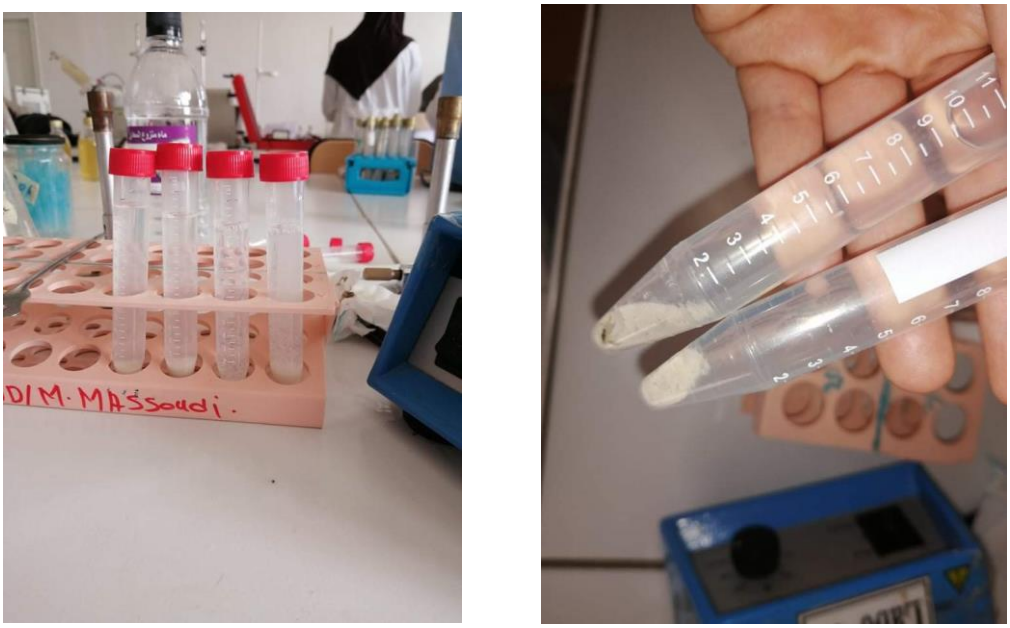


Fig.2.5 : Lavage des spores (Original., 2022).

Chacun de surnageant et de biomasse de la souche a été mélangé avec le nitrate d'argent (AgNO3) et la même étape faite avec le nitrate de zinc (ZnNO3) d'une concentration finale de 1Mm. Les Erlenmeyers sont été incubés dans une incubation qui contient un agitateur shaker à l'obscurité pendent 5 jours, et la biosynthèse des nanoparticules est détecté par virage de couleur.

Les nanoparticules synthétisées sont séparé par centrifugation, puis lavé trois fois par l'eau distillée suivi par un séchage.

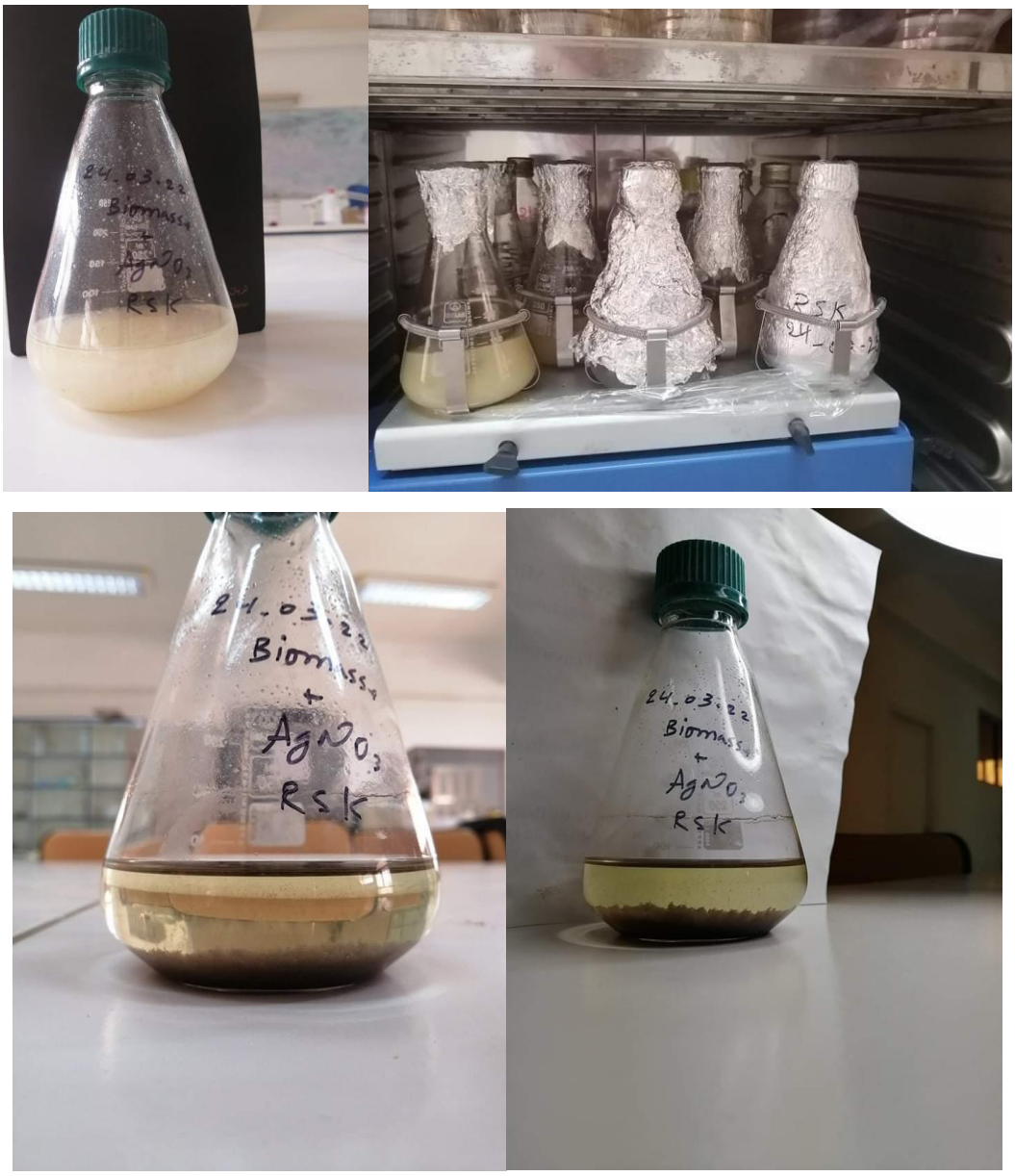


Fig.2.6 : Avant et après incubations (Original., 2022).

La production de nanoparticule d'argent ou Zinc se fait par l'interaction entre des bactéries et des particules d'argent, et cette réaction apparaît en changeant la couleur de l'échantillon du blanc transparent au blanc, puis au jaune, puis au brun foncé.

2.6.3 Caractérisation des nanoparticules

2.6.3.1 Analyse spectroscopique par l'infrarouge FTIR

Le principe de la spectroscopie infrarouge (IR) repose sur l'absorption de la lumière par la plupart des molécules dans la région de l'infrarouge du spectre électromagnétique et en convertissant cette absorption en vibration moléculaire. Cette absorption correspond spécifiquement aux liaisons présentes dans la molécule. Avec un spectromètre, cette absorption du rayonnement infrarouge par le matériau de l'échantillon est mesurée en fonction de la longueur d'onde (sous la forme de nombres d'onde, typiquement de 4000 à 600 cm-1). Le résultat est un spectre qui donne une "empreinte chimique" distinctive qui peut être utilisée pour visualiser et identifier des échantillons organiques et inorganiques.



Fig2.7 : appareil FTIR-8400 de hall technologie de Médéa.

Préparation d'échantillons solide

Dans un premier temps, on étalonne notre appareil de mesure. On réduit en poudre le polymère à l'aide d'un pilon, on prélève ensuite quelques grammes (10%) de notre échantillon que l'on mélange avec un sel purifié KBr (80%),afin de supprimer les effets de diffusion des gros

cristaux, un mélange homogéne est préparé puis finement broyé. Ce mélange il est déposé dans un moule à pastiller, puis soumis à une très forte pression dans une presse hydraulique jusqu'à 60. Il est ensuite extrait du moule sous la forme d'une pastille. Pastille de KBr, contenant l'échantillon à étudier, extraite du moule, prête à l'emploi, Le porte-échantillon contenant la pastille KBr produit est placé dans le compartiment de mesure du spectre sur le trajet du faisceau incident.

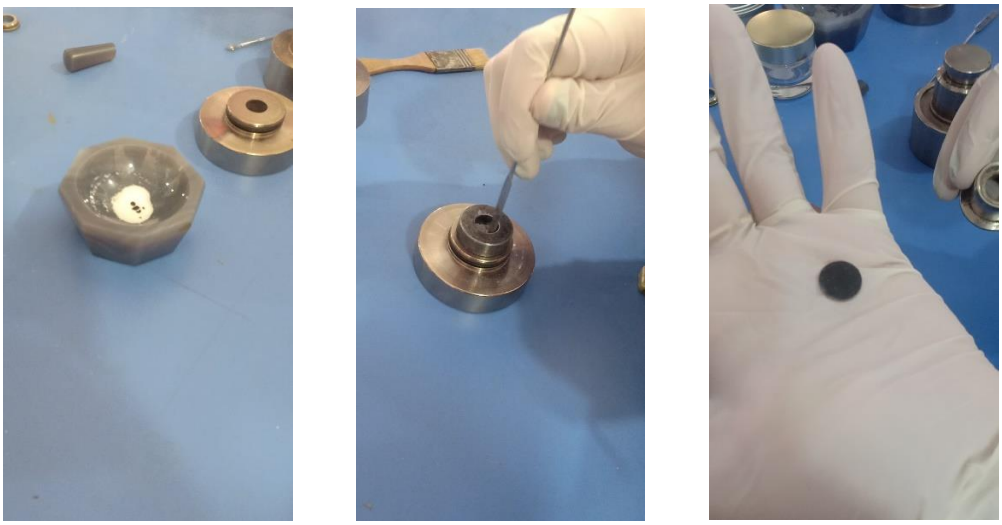


Fig.2.8 : Méthode préparation de l'échantillon (Original., 2022).

2.6.3.2 Analyse par spectrophotométrie UV-visible

Le principe de la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible que nous avons utilisé repose sur **l'absorption du rayonnement par les molécules** dans le domaine allant de 200 à 800 nm, ce qui correspond à l'ultraviolet (200-400 nm) et au visible (400-800 nm).

Les longueurs d'ondes Maximales sont obtenues directement par balayage automatique entre 300 et 800 nanomètre.

Des cuves en quartz de 1 cm de trajet optique sont utilisées. Les mesures des concentrations Résiduelles ont été obtenues par interpolation à l'aide de la courbe.



Fig.2.9 : Appareil d'UV visible scan-lambda complexe anti bio tical SAIDAL.

Protocole

À l'aide de la balance, Dans une fiole de 25ml peser 25ml des nanoparticules de zinc ou d'argent, Ajouter de l'eau distillée jusqu'à la moitié de la fiole.
On place la solution directement dans le panier de l'ultrason pour le dégazage des métaux, la détection de défauts.



Fig.2.10 : Bain ultrasons H-D (Original., 2022).

En suit on agite la solution pour but d'assurer l'homogénéisation d'un milieu (produit) jusqu'à se dissout.

La filtration est un procédé de séparation, permettant de séparer les constituants de mélange pour diminuée la concentration de surnagent, on fait la dillution.

Le nettoyage et rincage des cuves en quartez, par l'eau déstiléé et la solution a analyser on commence par faire le blanc place la cuve dans l'appareil.





Fig.2.11 : Après l'agitation et la dilution (Original., 2022).

2.6.3.3 Analyse par microscopie à force atomique AFM

L'AFM permet d'analyser une surface point par point grâce à un balayage par une sonde. Cette dernière est constituée d'une pointe très fine, positionnée à l'extrémité d'un micro-levier flexible ce type de microscopie fonctionne en mesurant l'interaction attractive ou répulsive entre les atomes constituant la pointe nanométrique et les atomes surfaciques d'un échantillon. Quand la pointe est à proximité d'une surface, les forces d'interaction entre la pointe et l'échantillon entrainent une déviation du levier qui suit la loi de Hooke.

L'analyse de la déviation du levier, à l'aide d'un laser, permet à la fois de déterminer le parcours exact de la pointe et de mesurer les forces d'interaction entre cette dernière et l'échantillon, voir la figure suivante 2.12.

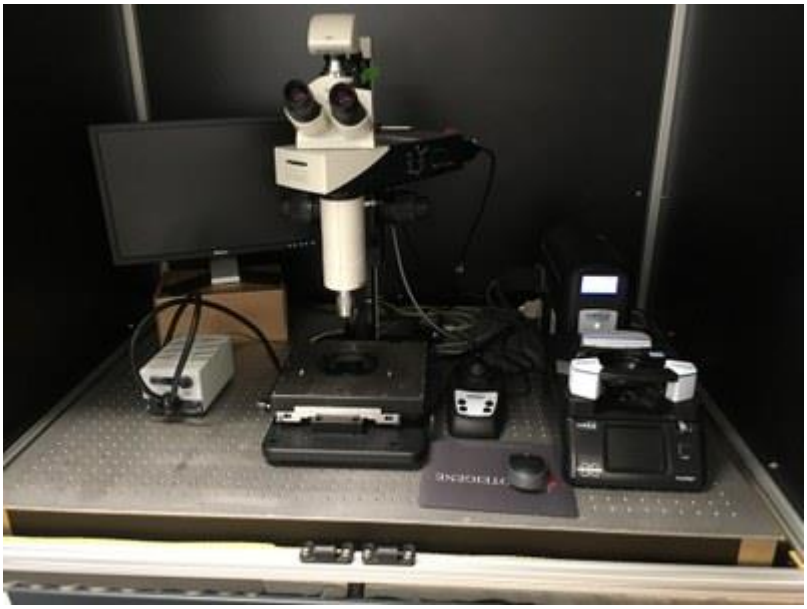


Fig 2.12 : appaereil AFM de hall technologie Unv de Médéa.

2.6.3.4 Analyse par spectrométrie d'absorption SAA :

L'absorption de lumière par les atomes fournit un puissant instrument analytique à la fois pour l'analyse quantitative et qualitative. La spectroscopie d'absorption atomique (SAA) est basée sur le principe que les atomes libres peuvent absorber la lumière d'une certaine longueur d'ondes.

L'absorption de chaque élément est spécifique, aucun autre élément n'absorbe sa longueur d'ondes. La SAA est une méthode basée sur un élément unique, utilisée pour reconstituer l'analyse des métaux d'échantillons biologiques, métallurgiques, pharmaceutiques et atmosphériques par exemple. La détermination spectroscopique d'espèces atomiques peut seulement être réalisée à partir d'un échantillon à l'état gazeux, dans lequel les atomes individuels comme l'Ag, Zn, le Fe et le Mg sont nettement séparés les uns des autres.



Fig.2.13 : Spectrométrie SAA d'Alger.

2.6.4 Evaluation de L'activité biologique des nanoparticules

2.6.4.1 préparation de suspension

préparation de l'inoculum

A partir d'une culture pure et jeune de 18 heures à 37 C° ; la suspension bactérienne, des souches pathogènes de Gram positive *(S.aureus ; Bacillus*) et Gram négative (*E. coli* ; *Klebsiella ;Pseudomona*) a été préparé , ou on a prélevé 2 à 3 colonies de chaque souche à l'aide d'une pipette pasteur stérile puis la décharger dans 10 ml de (BMH) et homogénéiser . Pour effectuer des dilutions de la suspension afin de standardiser l'inoculum. Ce derniers doit être dilué de telle façon que sa densité optique est mesuré à 600 nm et comprise entre (0.08 à 0.1) a l'aide d'un spectrophotomètre.

2.6.4.2 Evaluation de l'activité antimicrobienne :

L'effet antimicrobien des AgNPs synthétisés par ***Streptomyces sp***. Ont été évalués pour ***E. coli***, ***Bacillus, S. aureus, K. pneumoniae***, ***Y. enterocolitica*** qui ont été obtenus auprès du l'hôpital 240 lits

Ensemencement :

Ensemencer toute la surface de la boite de Muller-Hinton dans l'épaisseur de 8mm par étalement en tournant la boite 3 fois de 60 à l'aide d'un écouvillon, afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.

Préparation de solutions AgNPs et ZnPs :

Pour tester l'effet antimicrobien des nanoparticules bioynthétisées déjà d'argent à partir (biomasse et surnagent) et de zinc (biomasse), 0.33 g des NPs sèches ont été diluées dans 1 ml de leurs surnagent.

Diffusion en puits

A l'aide du bout d'une pipette Pasteur, les puits sont confectionnés dans chaque boite de Pétri déjà ensemencé ; des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés de manière concentrique sur les milieux puis, mètre 20µL de solution AgNp (Biomasse et surnagent) dans chaque puit au centre. Puis les souches sont incubées à 37C° pendant 24 heures au terme desquelles les diamètres des zones des inhibitions sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.



Fig.2.14 : La diffusion en puits.

2.6.4.3 Evaluation de l'activité anti biofilm

Dans le but de tester les NPs (Ag et Zn) sur le biofilm, formé par ***Klebsiella pneumonie*** dans le milieu LB puis incuber a 37C° pendant 24H , son opacité doit être équivalente à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 600 nm .

L'activité des nanoparticules contre le biofilm formé par la souche de *Klebsiella pneumonie* a été évaluée sur une microplaque de 96 puits.

Les puits des colonnes de la microplaque ont été remplis par 150 µl de la suspension préparé à partir de la souche *Klebsiella pneumonie.* La microplaque a été ensuite incubée à 37C°. Après 24 H, la culture de la bactérie test a été retirée par pipetage, ensuite les puits de la microplaque sont rincés par l'eau potable.

150 µl de la solution de nanoparticules d'AgNP et de ZnNP, ont été ajoutée séparément dans des trois différentes colonnes de la microplaque, de manière que dans chaque colonne on ajoute un type de nanoparticule différent. Une colonne a été utilisée comme témoin.

La microplaque a été incubée à 37C°. Après 24 h, les puits de la microplaque ont été rincés avec l'eau distillée. Les biofilms formés sur les parois des puits de la microplaque ont été colorés par l'ajout de 100 µl d'une solution de cristal violet à 0.1 %. Après 30 minutes d'incubation sous l'obscurité à la température ambiante, le cristal violet est retiré par pipetage puis la microplaque est rincée par l'eau distillée.

La lecture des résultats est effectuée dans un lecteur de microplaque réglé à 550 nm.

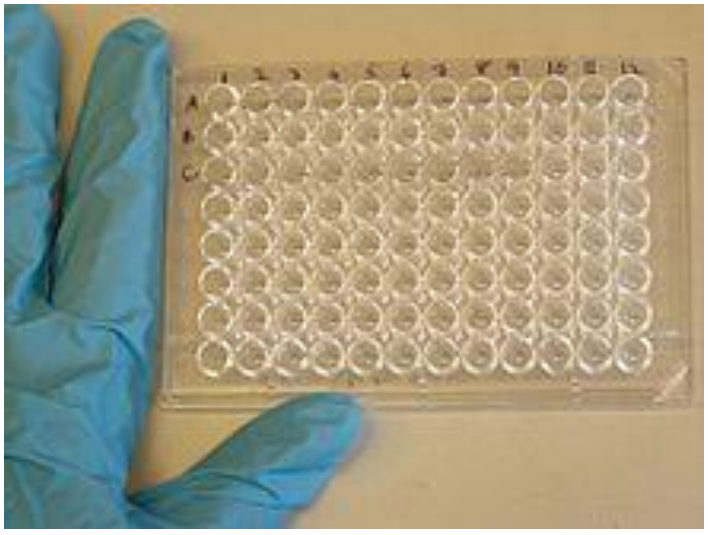


Fig.2.15 : Une microplaque 96.

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

Différentes méthodes sont de plus en plus reconnues pour la production de nanoparticules d'argent (AgNPs) et de Zinc (ZnNPs) en raison de leurs multiples applications. L'utilisation d'actinomycète dans la synthèse verte de nanoparticules apparaît comme une approche rentable et respectueuse de l'environnement. Dans ce chapitre, nous présentons les résultats essentiels obtenus par notre étude, concernant la synthèse des nanoparticules AgNPs et ZnNPs par la méthode biologique.

Les analyses des poudres ont été réalisées par spectroscopique infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), par UV-Visible, diffraction de rayons X (XRD), par microscope à force atomique (AFM), par le MEB et spectrométrie d'absorption atomique (SAA).

Le travail est terminé par une application sur un biofilm.

3.1 BIOSYNTHESE DES NANOPARTICULES PAR L'ACTINOMYCETE

3.1.1 Virage de couleur des mélanges

Mélange 1

A partir de biomasse de la souche (S26) :

Après 5 jours d'incubation de la culture avec le nitrate d'argent, on a observé un changement de couleur de jaune pâle à brun foncé comme montré dans la figure 1 .Ce qui indique que la biomasse de cette souche est capable de synthétiser les AgNPs par la réduction des ions d'Ag + de l'état ionique vers l'état métallique Ag°. Ces résultats confèrent le travail de Mahroop Raja, 2017.

Les résultats de la biosynthèse des nanoparticules d'argent par la biomasse et le surnageant de la souche S26 sont représentés dans la Figure suivante :

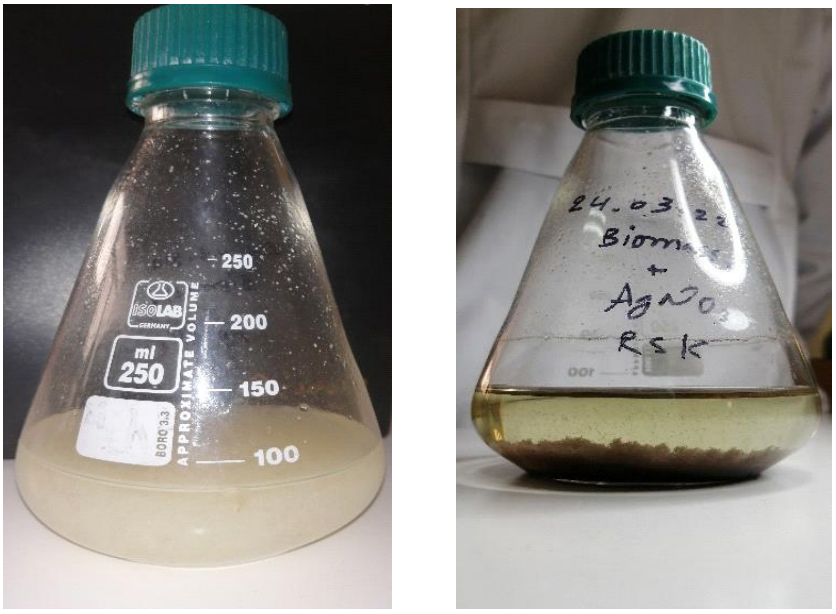


Fig.3.1 : Avant et après l'ajout d'AgNO3 (Original., 2022).

A partir de surnageant d'AgNo3 de la souche (S26) :

Après 10 jours d'incubation l'observation visuelle du changement de couleur dans l'erlenmeyer de surnageant de couleur jaune pâle au couleur brun foncé.



Fig.3.2 : L'aspect du surnageant de la souche S26 avant et après la biosynthèse des nanoparticules d'argent (Original., 2022).

Mélange 2

Concernant la culture de nitrate de zinc le changement de couleur observé est la couleur blanchâtre due à la réduction des ions de Zn + vers le Zn° métallique Des résultats similaires sont rapportés par Hidayat M et all., 2020.



Fig.3.3 : Biomasse de S26 avant et après l'ajout de ZnNo 3 (Original., 2022).

La graduation de la couleur obtenue, laisse penser qu'il existe bien une réaction entre les réactifs, dont la cinétique est probablement lente, car les mélange ne présentent qu'une couleur nuancée par rapport à celle observée avant le traitement. Ce point sera discuté ultérieurement pour confirmer seulement.

3.2 CARACTERISATION DES NANOPARTICULES

3.2.1 Analyse spectroscopique par UV visible des nanoparticules

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée le spectre compris entre 200 et 800 nm. L'étude du spectre consiste à repérer les valeurs des longueurs d'ondes absorbées par l'élément à détecter.

L'absorbance est due à l'excitation des électrons situés sur la couche externe des atomes. Cette excitation est quantifiée, c'est-à-dire que l'électron doit recevoir exactement la quantité d'énergie nécessaire pour changer de couche. Cette énergie est obtenue en absorbant les rayonnements.

Le spectre d'absorption a été enregistré dans le domaine 200 à 800 avec un spectromètre de Perkin Elmer Scan-Lambda 25, La courbe représente l'absorbance des NPs de surnagent, biomasse et de zinc en fonction de la longueur d'onde voir les figures 3.4 ET 3.5, pour révéler la présence des AgNPs et de ZnNPs.

Un pic d'absorption du plasmon fort et large a été observé à 433 nm pour biomasse et à 468nm pour le surnageant l'AgNPs. Pour les ZnNPs bio synthétisés par la biomasse ont donnés un pic d'absorption de 320 nm.

Ces pics pourraient se produire en raison de la réduction des ions métalliques par les métabolites secondaires présents dans les cellules.

Les pics d'absorption ont indiqué la présence d'AgNPs biosynthétisés.

Les AgNPs (biomasse et surnageant) et les ZnNPs homogènes sont connus pour produire une bonde de résonance plasmondique de surface dans l'intervalle 300 à 450 nm. (Mahroop Raja., 2017) Ces résultats obtenus sont proches à des résultats d'autres recherches précédentes.

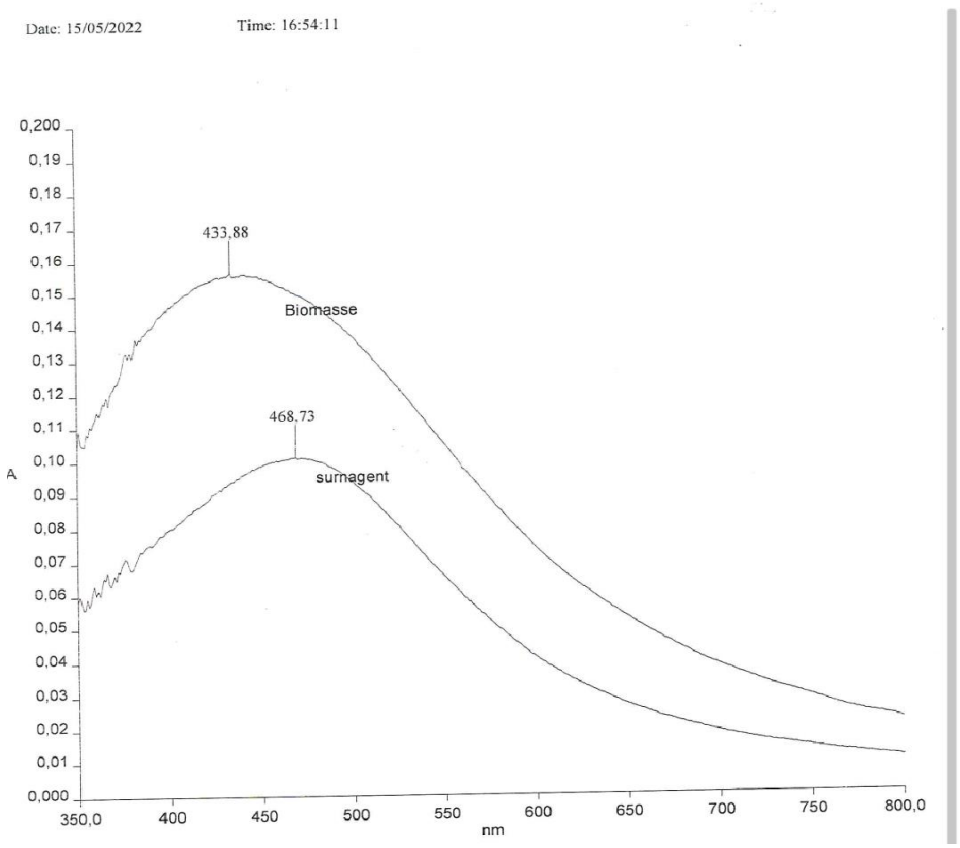


Fig.3.4 : Spectre UV d'AgNPs surnagent et biomasse.

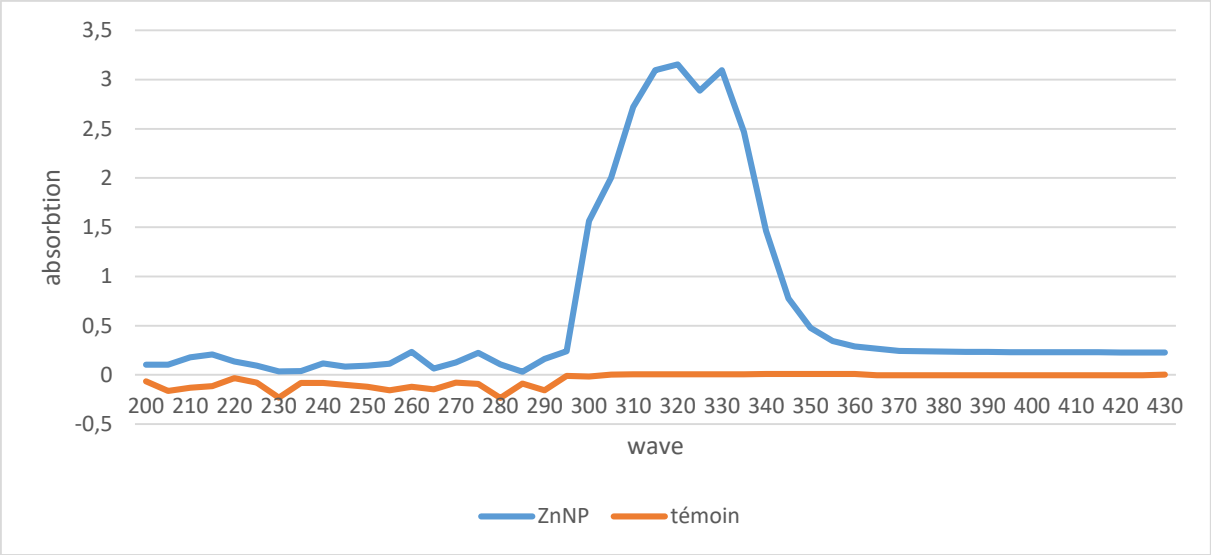


Fig.3.5 : UV-VIS de ZnNPs de biomasse.

Les formations des pics dans les échantillons confirment la formation des NPs, De même, des études antérieures sur la biosynthèse des NPs utilisant des micro-organismes ont rapporté la même gamme de pics d'absorption le même phénomène a été signalé par d'autre chercheur. (Saravanan, M et al., 2018)(Ezealisiji, K. M et all., 2019).

La nanoparticule d'argent présente une couleur marron foncé dans la solution aqueuse en raison du phénomène de résonance plasmonique de surface, qui permet de compléter l'idée de (Xia et al., 2016).

3.2.2 Analyse spectroscopique par Infrarouge des nanoparticules FTIR

A l'aide de FTIR les groupements fonctionnels qui étaient peut-être responsables à la réduction, encapsulation et la stabilisation d'AgNPs et ZnNPS sont détectés (kumari et al., 2020). Les résultats sont montrés dans la figure.

Pour les AgNPs bio synthétisées par la biomasse et surnageant, FTIR a enregistré sur le Spectre la présence d'un pic, plus prononcé localisé au nombre d'onde 3186.51 cm-1 attribué à la liaison N-H qui représente amine primaire, et le pic 1581.68 cm-1 attribué à la liaison amide N-H, et le pic suivant 1442.80 présent groupement CH2, deux pics de vibration d'amine aromatique C-N à 1057.03 cm-1 et 1365.65 cm-1 été également observé, le pic 702.11 peut être attribué aux AgNPs. Ces résultats sont étayés par des résultats d'autres études similaires, voir les figures suivantes 3.6, 3.7, 3,8 et 3,9 (Prakasham et al., 2012).

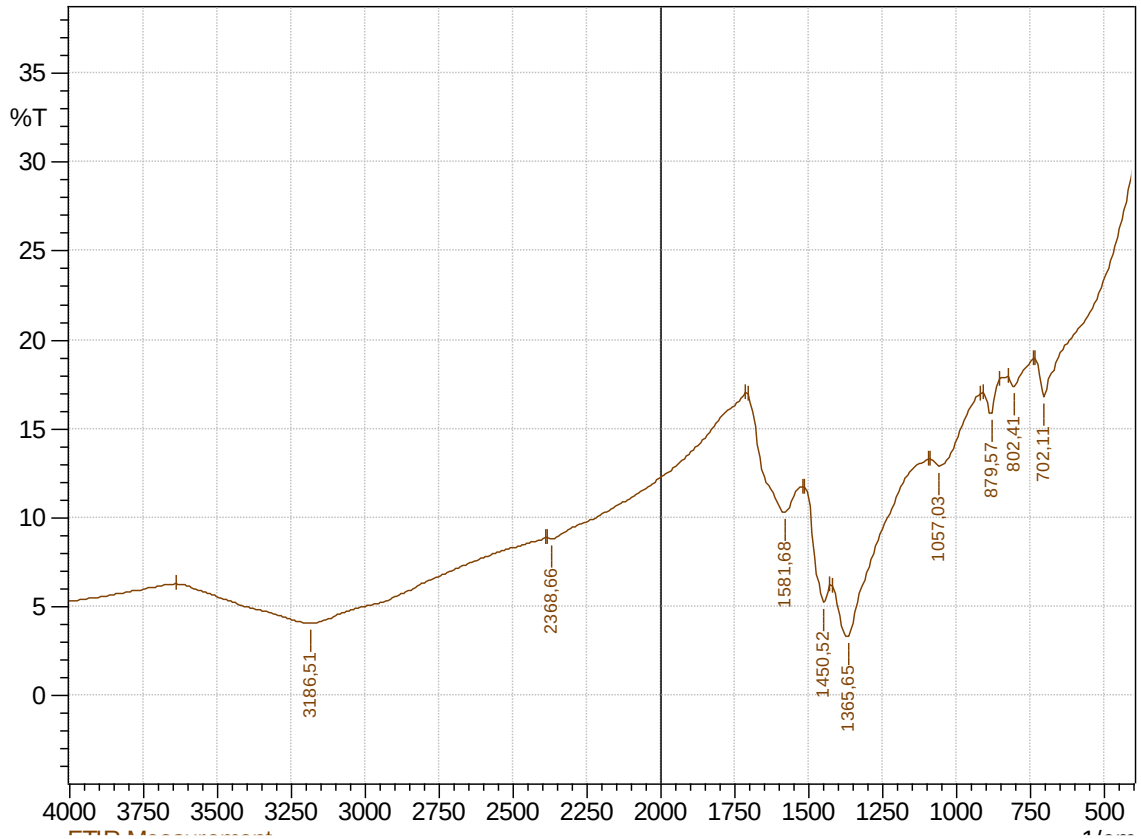


Fig.3.6 : Spectres FTIR d'AgNPs de surnagent.

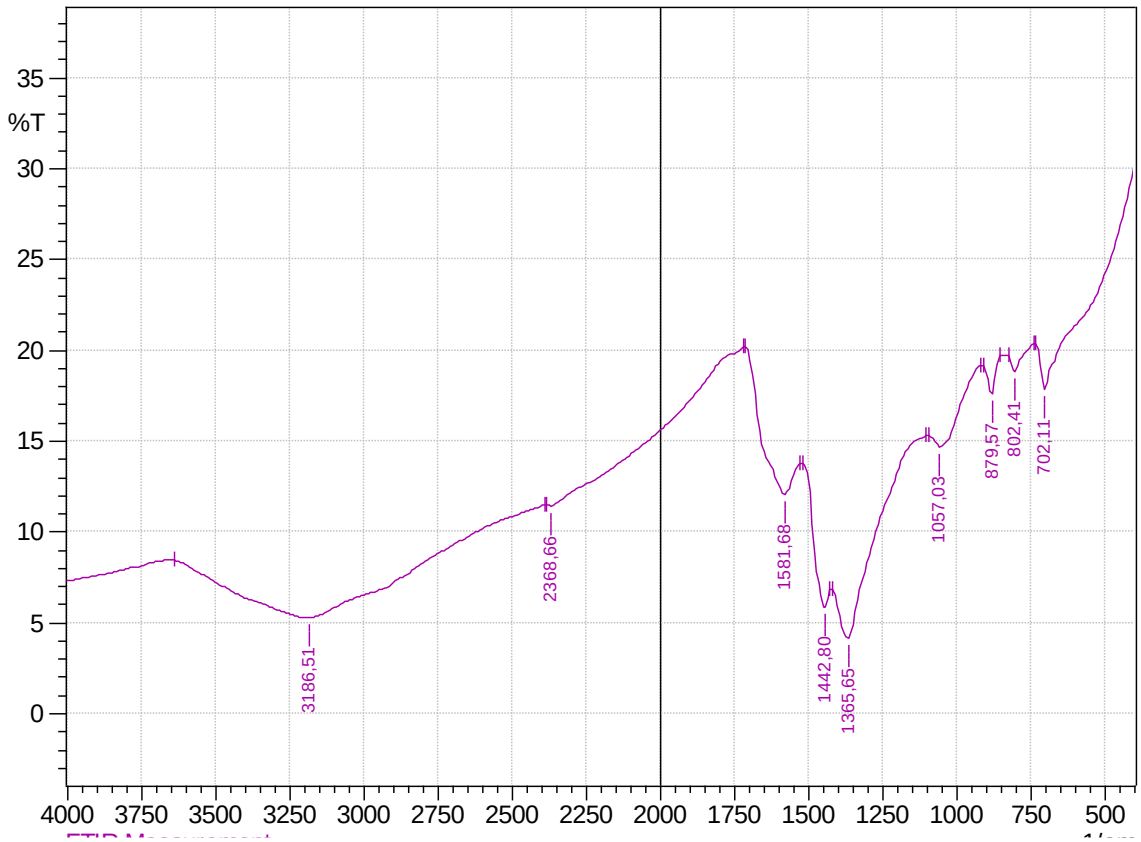


Fig.3.7 : Spectres FTIR d'AgNPs de biomasse.

Pour les ZnNPs le pic de vibration d'étirement la plus large correspond à 3379.40 est liée à O-H, les pics de 2931.90 , 2515.26 représentent les hydrocarbures saturés C-H , les pics 1442.80 , 1080.17 représentent le cycle aromatique C=C , les liaison C-OH respectivement , le pic 709.83 peut être attribué aux ZnNPs. des résultats similaires sont observés dans des Rechercher précédentes (Barani .D ., 2020).

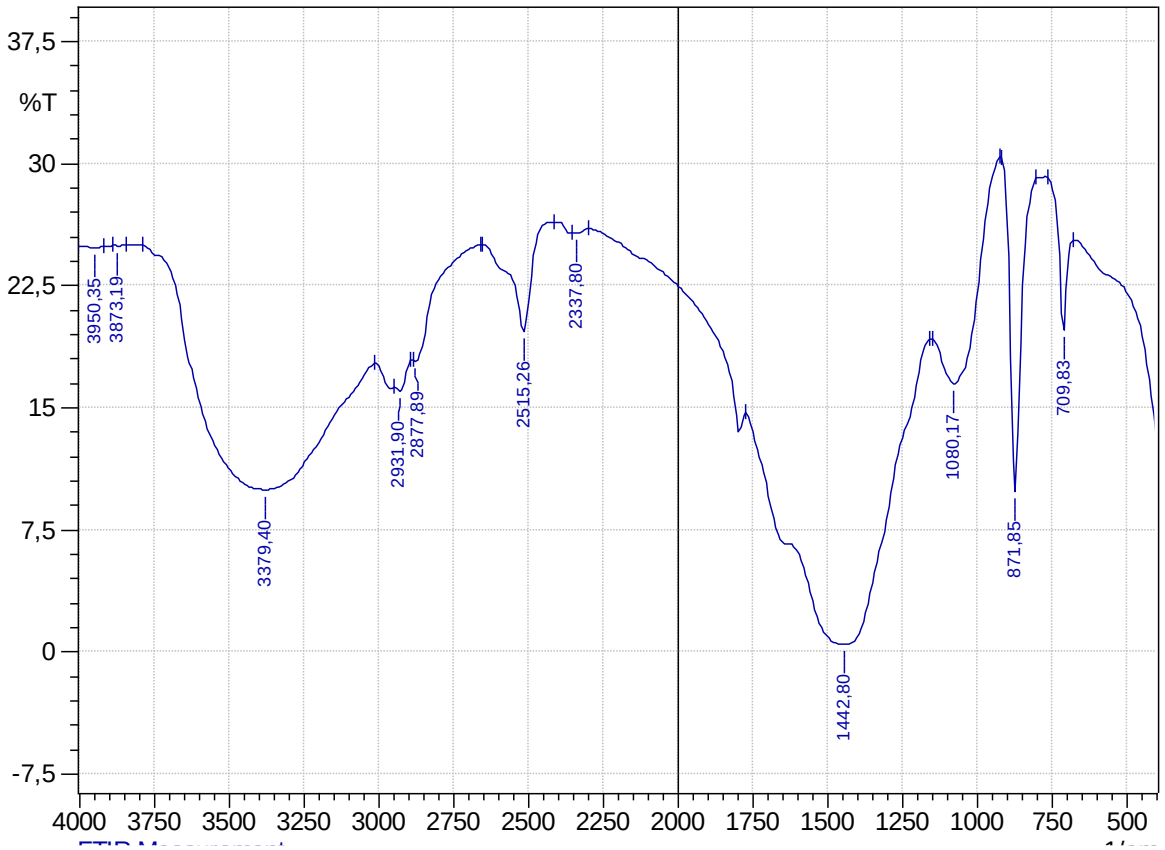


Fig.3.8 : Spectres FTIR de ZnNPs.

Pour le Mix (AgNPs+ZnNPs) le pic de vibration d'étirement la plus large correspond à 3441,12 est lié à O-H, les pics de 2515.26 représentent les hydrocarbures saturés C-H, les pics 1465.91, 1072.46 représentent le cycle aromatique C=C, les liaisons C-OH respectivement.

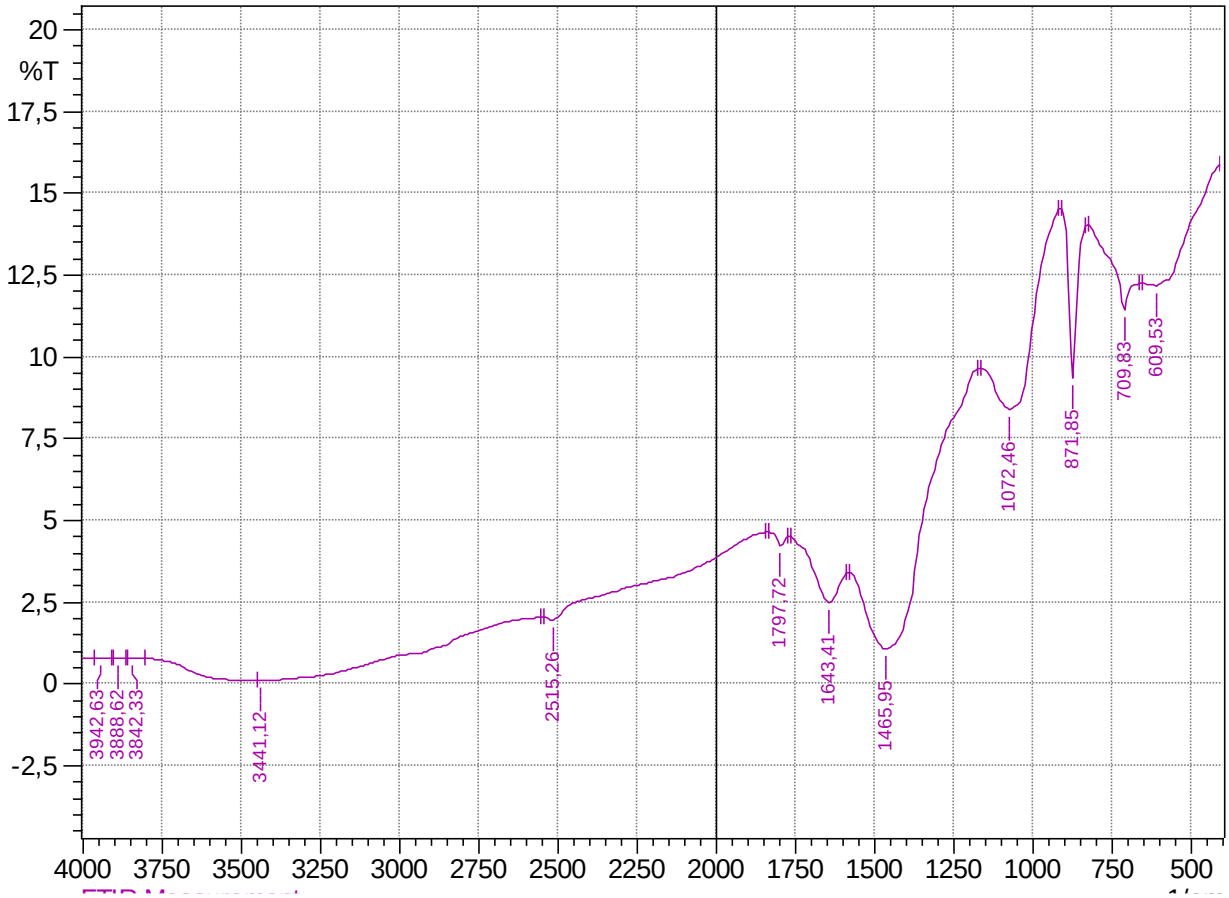


Fig.3.9 : Spectre FTIR de Mix (AgNPs + ZnNPs).

3.2.3 Analyse spectroscopique par AFM

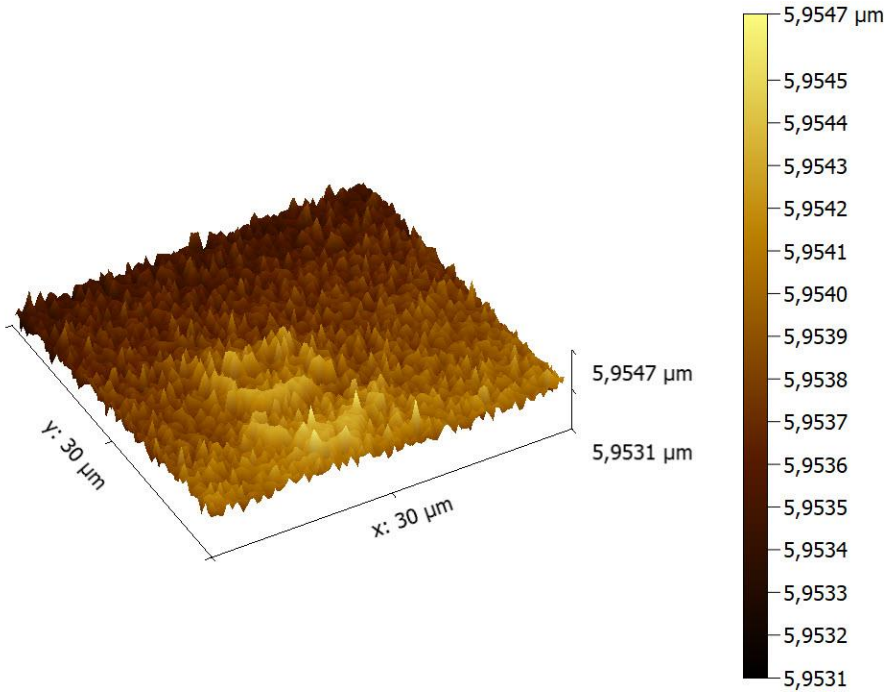


Fig.3.10 : Résultats d'AFM de ZnNPs.

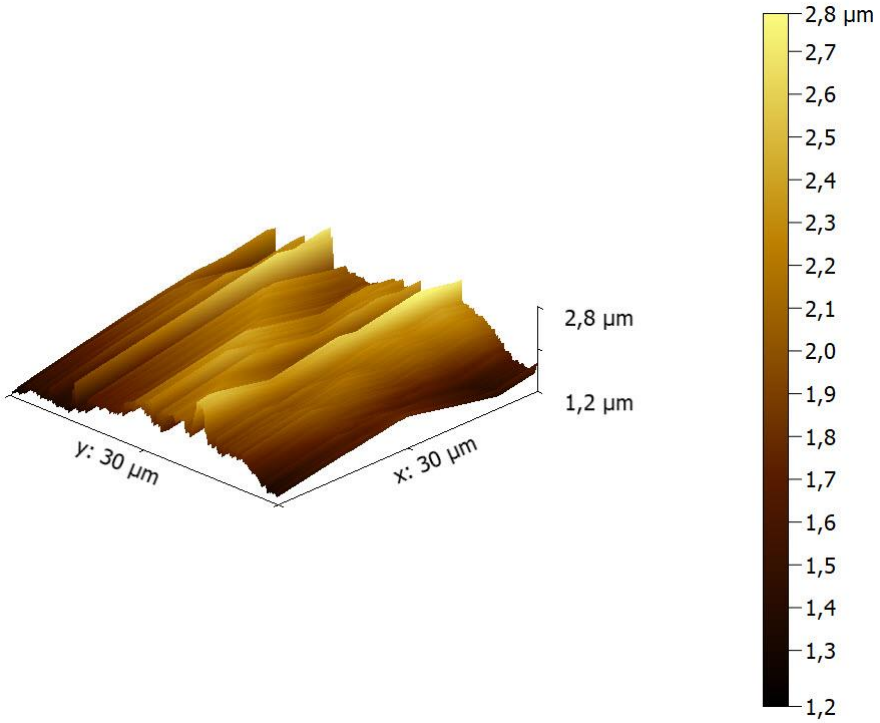


Fig.3.11 : Résultats d'AFM d'AgNPs.

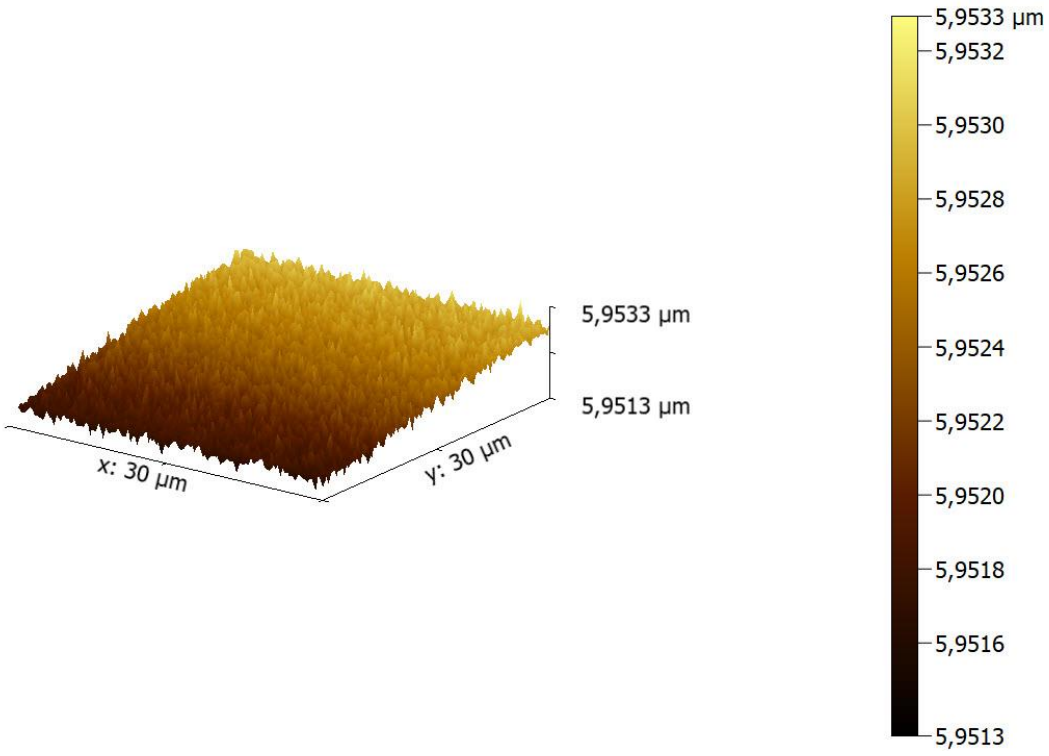


Fig.3.12 : Résultats d'AFM d'AgNPs+ZnNPs.

Les figures 3.9, 3.10 et 3.11 représente la porosité et la rugosité en fonction de la taille maximale.

La taille des particules de ZnNPs, AgNPs et Mix selon l'ordre de µm tel que la taille minimum de particule ZnNPs, AgNPs et Mix sont respectivement 5,9531, 1 ,2 et 5,9513 µm, et la taille maximale de ce dernière particule sont 5,9547, 2,8 et 5,9537. Plus le pic est élevée plus la couleur devenu clair.

Selon les figures le mélange AgNPs+ ZnNPs comporte une morphologie très rigoureuse et poreuse.

3.2.4 Analyse spectroscopique par SAA

CFERAL

14,Route de Larba ,ZI d'EL HARRACH
ALGER

Bulletin d'Analyse

XL3t-106399

Reading No	714
Mode	Soil
Time	2022-06-06 14:51
Duration	122.89
Units	ppm
Sigma Value	4
Sequence	Final
Flags	
SAMPLE	biomasse
LOCATION	
INSPECTOR	
COR 1	
COR 2	
MISC	
NOTE	



Ele	ppm	+/-	±2σ
Mo	<LOD	:	4.708
Zr	4.857	+/-	2.624
Sr	<LOD	:	2.925
U	<LOD	:	6.337
Rb	<LOD	:	3.131
Th	<LOD	:	4.537
Pb	<LOD	:	7.596
Au	<LOD	:	6.759
Se	<LOD	:	5.163
As	<LOD	:	5.486
Hg	<LOD	:	14.124
Zn	36.597	+/-	10.776
W	<LOD	:	38.769
Cu	<LOD	:	22.837
Ni	<LOD	:	18.751
Co	<LOD	:	10.595
Fe	<LOD	:	42.263
Mn	<LOD	:	49.678
Cr	136.742	+/-	16.924
V	37.390	+/-	14.776
Ti	<LOD	:	54.514
Sc	<LOD	:	12.026
Ca	711.092	+/-	57.989
K	<LOD	:	108.194
S	<LOD	:	305.184
Ba	<LOD	:	189.421
Cs	<LOD	:	46.016
Te	<LOD	:	117.858
Sb	<LOD	:	58.279
Sn	<LOD	:	128.085
Cd	<LOD	:	67.096
Ag	4221.924	+/-	244.855
Pd	<LOD	:	116.867

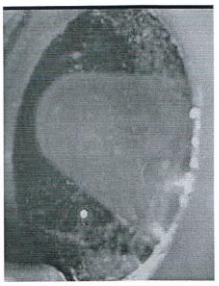
CFERAL

14,Route de Larba ,ZI d'EL HARRACH
ALGER

Bulletin d'Analyse

XL3t-106399

Reading No	715
Mode	Soil
Time	2022-06-06 14:55
Duration	155.98
Units	ppm
Sigma Value	4
Sequence	Final
Flags	
SAMPLE	surnageant
LOCATION	
INSPECTOR	
COR 1	
COR 2	
MISC	
NOTE	



Ele	ppm	+/-	±2σ
Mo	<LOD	:	7.792
Zr	<LOD	:	6.722
Sr	<LOD	:	5.530
U	<LOD	:	12.946
Rb	<LOD	:	6.935
Th	<LOD	:	10.550
Pb	<LOD	:	16.316
Au	<LOD	:	16.402
Se	<LOD	:	12.140
As	<LOD	:	12.232
Hg	<LOD	:	31.519
Zn	<LOD	:	24.793
W	<LOD	:	83.775
Cu	<LOD	:	50.723
Ni	<LOD	:	45.288
Co	<LOD	:	24.146
Fe	<LOD	:	91.363
Mn	<LOD	:	112.081
Cr	216.016	+/-	15.475
V	48.611	+/-	14.015
Ti	117.334	+/-	37.227
Sc	<LOD	:	8.819
Ca	344.031	+/-	40.808
K	132.124	+/-	67.157
S	<LOD	:	250.576
Ba	<LOD	:	39.464
Cs	<LOD	:	9.806
Te	<LOD	:	25.027
Sb	<LOD	:	12.620
Sn	<LOD	:	63.174
Cd	<LOD	:	27.604
Ag	24072.557	+/-	123.126
Pd	242.875	+/-	29.768

Fig.3.13 : Bulletin d'analyse SAA de biomasse et surnageant.

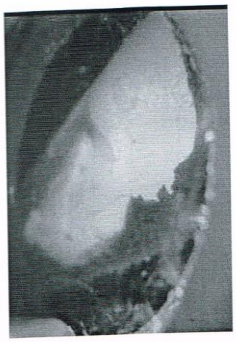
CFERAL

14,Route de Larba ,ZI d'EL HARRACH
ALGER

Bulletin d'Analyse

XL3t-106399

Reading No	717
Mode	Soil
Time	2022-06-06 15:02
Duration	143.69
Units	ppm
Sigma Value	4
Sequence	Final
Flags	
SAMPLE	zn ps
LOCATION	
INSPECTOR	
COR 1	
COR 2	
MISC	
NOTE	



Ele	ppm	+/-	±2σ
Mo	6.019	+/-	2.333
Zr	4.225	+/-	2.097
Sr	9.419	+/-	1.654
U	<LOD	:	4.302
Rb	<LOD	:	2.018
Th	<LOD	:	2.960
Pb	<LOD	:	4.384
Au	<LOD	:	4.232
Se	<LOD	:	3.572
As	<LOD	:	3.632
Hg	<LOD	:	15.736
Zn	6730.432	+/-	68.393
W	<LOD	:	55.117
Cu	<LOD	:	18.449
Ni	<LOD	:	12.516
Co	<LOD	:	8.089
Fe	62.954	+/-	26.080
Mn	<LOD	:	37.558
Cr	62.208	+/-	28.662
V	<LOD	:	307.893
Ti	198920.844	+/-	915.239
Sc	65.605	+/-	32.278
Ca	3940.432	+/-	191.213
K	1333.037	+/-	192.324
S	<LOD	:	936.819
Ba	<LOD	:	37.670
Cs	<LOD	:	9.325
Te	<LOD	:	23.927
Sb	<LOD	:	11.195
Sn	<LOD	:	9.699
Cd	<LOD	:	10.280
Ag	<LOD	:	9.138
Pd	<LOD	:	8.826

Fig.3.14 : Bulletin d'analyse SAA de ZnNPs.

Solen les résultats de l'absorption atomique indique par la figure 3.13 et 3.14 les particules de ZnNPs composé majoritairement par ensemble d'atome de Zn (6730,432 ppm), malheureusement l'atome de titane comme une impureté (198920,64 ppm).

De même pour les particules de biomasse et de surnagent de AgNPs qu'ils sont composé majoritairement par Ag avec l'apparissemment des molécules de Ca et pd comme des impuretés.

3.3 EFFET ANTIBACTERIEN DES AGNPS ET ZNNPS

Afin d'examiner l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent, Zinc et le mixte (Ag+Zn), bio synthétisées par la souche strp S26 , on suive la méthode de diffusion des puits sur milieu MH solide qui consiste à l'application direct d'NPs sur différents les souches pathogènes e de Gram positive (***Staphylococcus aureus; Bacillus***) et Gram négative ***(Escherichia coli; Klebsiella pneumoniae Pseudomonas aeruginosa et Yersinia enterocolitica)***, cette méthode nous a permis d'observer l'effet de chacune des nanoparticules testées par la présence ou absence de la zone d'inhibition.

D'après le **tableau 3.2** on constate que les zones d'inhibition sont importantes ce qui montre leur pouvoir antimicrobienne, La zone d'inhibition a été utilisée comme critère pour déterminer les effets antimicrobienne contre les souches bactériennes.
L'efficacité des AgNPs et ZnNPs a été testée contre les bactéries, Elle permet de voir directement l'effet antibactérien du matériau soit par l'apparition d'un halo d'inhibition autour des puits de l'échantillon si celui-ci diffuse, soit par l'absence de la croissance bactérienne dans la zone ayant été en contact avec le matériau si celui-ci est inhibiteur mais ne diffuse pas.
Le tableau 2 montre les résultats des zones d'inhibition mesuré indiquent une bonne activité de AgNP prépare à partir de surnageant varier entre 11mm contre *Y.enterocolitica* et 17.5mm contre *P.aeruginosa*, concernent AgNP prépare à partir de biomasse les zones varies entre 10mm contre *E.coli* et 16mm contre *S.aureus*, alors que ZnNP prépare à partir de biomasse les zones varies entre 16.7 mm conter *E. coli* et 24.2mm contre *K. pneumoniae*, et par rapport les dernière NPs de mixte (Ag+Zn) les zones varies entre 10mm contre *S.aureus* et 14mm contre *P.aeruginosa*.
Au vu des résultats obtenus les ZnNPs représente une remarquable activité contre les souches testées, par rapport les autres NPs évalué alors que la plus faible activité a été observé chez les NPs synthétiser à partir le mixte.

Tab.3.2 : résultats d'activité antimicrobienne(en mm) des nanoparticules d'argent et de zinc préparer à partir de la biomasse et surnagent.

Les souches testées		***P.aeruginosa***	***s.aureus***	***k.pnoumenie***	***E .coli***	***Y. enterocolitica***
Argent	**Surnagent**	17.5 mm Très sensible	12.5 mm Sensible	-	12.5 mm Sensible	11 mm Sensible
	Biomasse	11 mm Sensible	16 mm Très sensible	-	10 mm Sensible	13 mm Sensible
Zinc	**Biomasse**	25.15 mm extrêmement sensible	31.43 mm extrêmement sensible	35.70 mm extrêmement sensible	25.13 mm extrêmement sensible	30.08 mm extrêmement sensible
Mixte	**Biomasse**	14 mm sensible	10 mm sensible	10 mm Sensible	10.5 mm sensible	-

Le mécanisme de l'activité antibactérienne des nanoparticules qui présentent des zones d'inhibitions significatives peut être attribué à la pénétration et à la désintégration de la membrane par des nanoparticules de plus petite taille qui conduisent à la lyse cellulaire La fonction antibactérienne a été attribuée à la production des radicaux libres à la surface des nanoparticules d'argent. De plus, une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) peut entraîner une dégradation de la membrane, une augmentation de la perméabilité de la membrane cellulaire, une perte de matière cellulaire, des changements morphologiques des cellules bactériennes bactéries et une inhibition de la croissance. En raison de la dissociation des groupes carboxyliques à la surface cellulaire, la charge de la paroi cellulaire bactérienne est négative, Les charges négatives sont attirées par les faibles charges positives trouvées sur les AgNPs. **Sondi et Salopek., 2004** ont suggéré que les effets antibactériens des AgNPs sur les

bactéries dépendaient de la concentration d'AgNPs et étaient étroitement liés au développement de « fosses » sur la paroi cellulaire bactérienne.

Les AgNP interagissent avec les groupes thiol des protéines bactériennes et peuvent ralentir la réplication de l'ADN, Il est raisonnable de conclure que la capacité des nanoparticules à se lier aux bactéries est déterminée par la surface disponible pour l'interaction, Parce que les nanoparticules ont une plus grande surface accessible au contact, elles ont un effet bactéricide plus important que les particules plus grosses. En conséquence, les AgNPs sont plus dangereux pour les bactéries **(Raffi et al, 2008).**

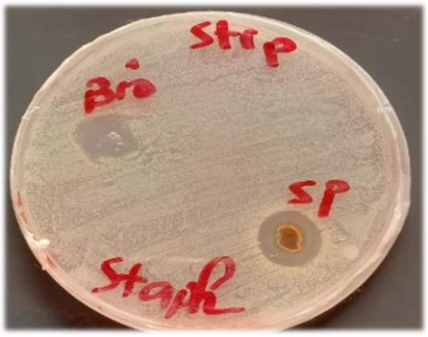
L'effet antimicrobien d'AgNPs et de ZnNPs est évalué dans cette étude par la technique de diffusion des puits. Les résultats obtenus sont représentés dans les figures suivantes.



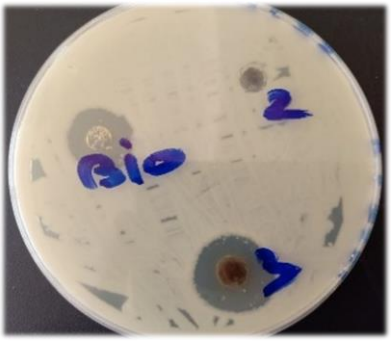
a)



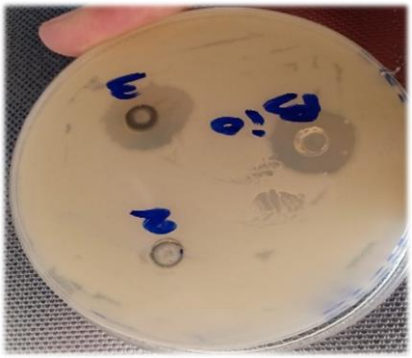
b)



c)



d)



e)



f)

Fig.3.15 :l'effet antimicrobien des AgNPs et ZnNPs sur les bactéries : **a)** *P. aeruginosa,* **b)** *k.pnoumenie,* **c)** *s.aureus,* **d)** *E .coli,* **e)***Y. enterocolitica* et **f)** *Y. enterocolitica.*

L'analyse de ces résultats montre clairement un effet sensible avec un diamètre 10 < …≤ 15, très sensible 15< …≤ 20 et extrêmement sensible >20 envers ***P. aeruginosa, k.pnoumenie, s.aureus, E .coli*** et ***Y. enterocolitica***. Ces résultats confèrent le travail de A.G. Ponce et al.2002**.** Une forte activité du ZnNPs envers ***P. aeruginosa, k.pnoumenie, s.aureus, E .coli, Y. enterocolitica*** et ***Y. enterocolitica*** avec un diamètre d'inhibition supérieur de 20mm c'est à-dire extrêmes sensible.

3.4 EFFET ANTIBIOFILM DES AGNPS ET ZNNPS

L'impact des NP de biomasse d'argent sur les biofilms crées a également été déterminer dans cette étude. Les résultats montrent que les NP synthétisé à partir la biomasse d'Argent sont plus efficaces que les nanoparticules de Zinc contre le biofilm de 24 heures de la souche testé telle que ***K.pneumoniae***, avec une bonne éradication visible de l'intensité de cristal de violet en comparant avec le témoin comme il est montré dans la figur3.17 ,au contraire ou les AgNP de surnageant n'ont aucun effet inhibiteur sur le biofilm formé , ce qui indique que les ZnNPs et AgNPs bio synthétisées a partir les Biomasses sont efficaces pour inhiber la formation de biofilm et perturber rapidement et l'architecture tridimensionnelle du biofilm. Parce qu'une couche de biofilm est une barrière impénétrable à plusieurs antibiotiques, la capacité d'un agent antimicrobien et antibiofilm à la pénétrer et à la disperser confirme sa puissance et son efficacité.

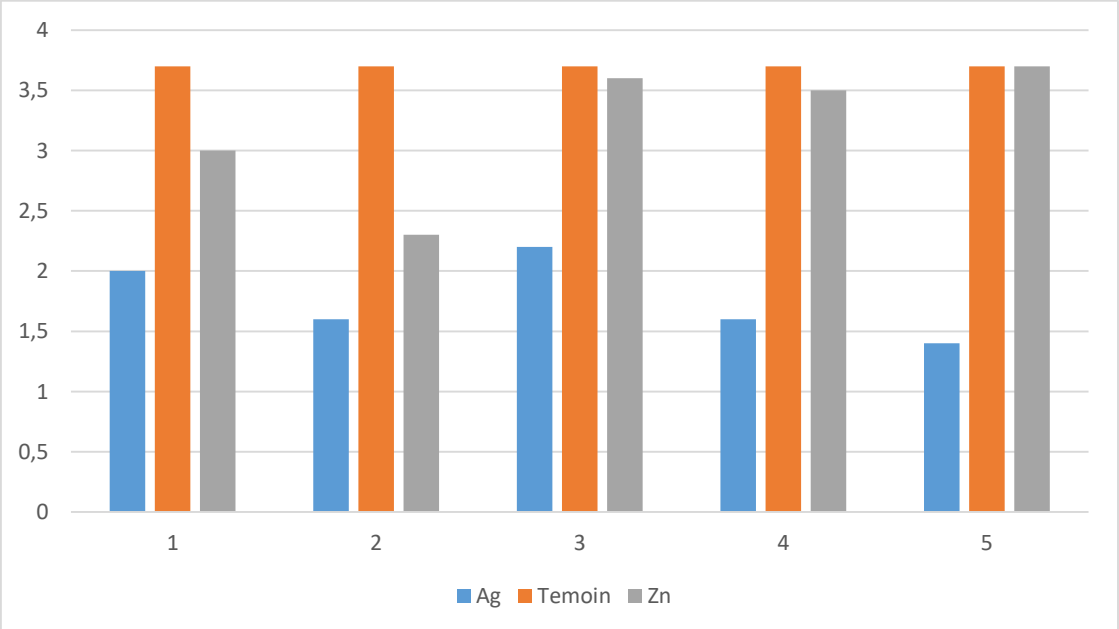


Fig.3.16 : Histogramme d'activité des nanoparticules (Ag, Zn) vis-à-vis le biofilm de K.pneumoniae.

Après coloration au cristal violet, une observation à l'œil nu est faite pour la microplaque. On a pu constater la formation d'un film à la surface de la microplaque et au fond des puits, donc on peut déterminer visuellement la formation de biofilm attribué pour chaque souche comme la figure 17 peut l'illustrer.

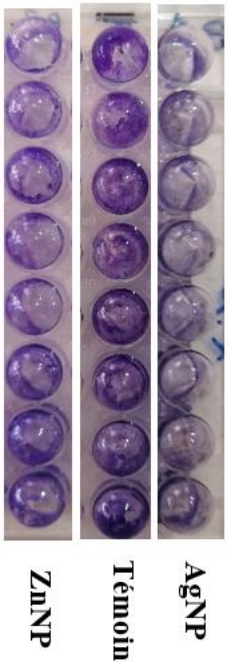


Fig.3.17 : L'activité anti biofilm des nanoparticules d'argent et de zinc contre le biofilm formé par *K. pneumonie.*

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de cette étude était de démontrer la capacité des nanoparticules métalliques pour l'élimination de biofilm dans l'industrie laitières. Où Cette étude est confirmé la capacité des nanoparticules métalliques pour l'élimination de biofilm.

Pour l'activité antimicrobienne, les nanoparticules de zinc a été plus fort que les nanoparticules d'argent.

La biomasse des nanoparticules d'argent et de zinc a été une activité très fort par rapport au surnagent.

La synthèse des NP par la technologie verte est écologique, hautement productive et facile à mettre à l'échelle, ce qui à son tour atténue les inconvénients des techniques conventionnelles. Les NP produites par les actinomycètes ont montré de larges spectres antimicrobiens conduisant à leurs applications généralisées dans les domaines susmentionnés. De plus, la production de NPs par les actinobactéries se traduit par un rendement élevé avec une pureté significative.

Bien qu'au cours de la dernière décennie, l'attention des chercheurs sur la synthèse actinobactérienne des NP s'est accrue. Pourtant, il est nécessaire de planifier de futures études pour mettre davantage l'accent sur les procédures de mise à l'échelle pour la synthèse actinobactérienne des NP selon les exigences industrielles. La synthèse des NP à l'aide d'actinobactéries est un processus assez lent par rapport aux voies physicochimiques. Par conséquent, l'efficacité de la synthèse peut encore être améliorée en réduisant le temps de synthèse.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1.	**A.L.D.A.G.D.SILVA.** Etude de la toxicite des nanoparticules d'argent et d'oxyde de titane pour chlamydomonas reinhardtii mémoire de master, 2017, p.1).
2.	**Adnan M., Obyedul M.K., Alle M., (2020).** Simple and cleaner system of silver nanoparticles synthesis using kenaf seed and unveiling their anticancer and antimicrobial potentials. Journal Nanotechnology in press. doi.org/10.1088/1361-6528/ab7d72
3.	**Aiswarya D., Raja R.K., Kamaraj C., (2019).** Biosynthesis of Gold and Silver Nanoparticles from the Symbiotic Bacterium, Photorhabdus Luminescens of Entomopathogenic Nematode: Larvicidal Properties Against Three Mosquitoes and Galleria Mellonella Larvae. Journal of Cluster Science.; 30(3) : 1040-7278. doi : 10.1007/s10876-019-01564-1 16.
4.	**Andrieux - Ledier A., (2012).** Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques. Thèse de doctorat en Chimie-physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, France, 165p.
5.	**Angélique S.D., Audureau E., Franco M., (2018).** Substantial modification of the gene expression profile following exposure of macrophages to welding-related nanoparticles. J Sci Rep. ; 4 ; 8(1) :8554. doi : 10.1038/s41598-018-26988-z.
6.	**Aouar L., (2015).** Misse en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traités au service des maladies infectieuse du CHU de Constantine. Mémoire de magistère. En biochimie et microbiologie appliquée. Université mentoiri Constantine. P4-8.
7.	**Azzedine, B.** Synthèse et caractérisation optique des nanoparticules d'argent pour des applications médicales « antibactériennes ».2015 :p.1-113.
8.	**Barani,D M. Tedjani, M. L. Tedjani et B. Touati., (2018)**. Synthèse de nanoparticules de ZnO par l'extrait des feuilles de Phoenix Dactylifera, Mémoire de Master Académique, Université Echahid Hamma Lakhdar El Oued, pp.4.
9.	**Belfennache D., (2010).** Elaboration et étude de nanoparticules Au/TiO2 et Ag/TiO2. Thèse de doctorat en physique. Faculté des sciences exactes université mentouri Constantine, 94p.
10.	**Bhattacharjee, C.R., (2014)**. Homogeneous chemical precipitation route to ZnO nanospherical. Assam University Journal of Science and Technology.
11.	**Bhaviripudi., S E., (2007).** Mile, S.A. Steiner, A.T. Zare, M.S. Dresselhaus, A.M. Belcher and J. Kong, Journal of the American Chemical Society, 129.
12.	**Boucheffa K., (2011).** Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques nonpolyèniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Mémoire de Magister. En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira Bejaia. P : 3-15.
13.	**C.L. Keat, A. Aziz, A.M. Eid and N.A., (2015).** Elmarzugi, Bioresources and Bioprocessing.
14.	**C.Y. Tai, C.-T. Tai, M.-H. Chang and H.-S. Liu., (2007).** Industrial & engineering chemistry research, 465536

15.	Canadian Journal of Veterinary Research, Volume 78, Number 2, **April 2014**, pp. 110-116(7)
16.	**Carolina D.S., Marcelo S., Avinach P *et al.*, (2014).**Silver Nanoparticules: Thérapeutique Uses, Toxicity, and Safety Issues. Journal of pharmaceutical sciences. doi.org/10.1002/jps.24001.
17.	**Chauvel R., (2018).** Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique. Thèse de doctorat en pharmacie. Faculté de pharmacie université claud bernard lyon 1,105p.
18.	**Chengzhu L., li Y., Tjong S.C., (2019).** Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. Int. J. Mol. Sci. ; 20 ; 449 ; doi :10.3390/ijms20020449.
19.	**Chuto G., Chaumet-Riffaud P., (2010).** Les nanoparticules. J Médecine Nucléaire. ; 34
20.	**Courtois, B., Bémer, D., & Binet, S., (2021)**. *Chapitre 1. Généralités sur les particules ultra-fines. In Les nanoparticules (pp. 45-104). EDP Sciences.*
21.	**D.K. Tiwari, et al., (2014).** A Review on BioDistribution and Toxicity of Silver, Titanium Dioxide a,d Zinc Oxide Nanoparticls in Aquiatic Environment. J Poll Res. ; 35 (4): 701-712 ; 0257– 8050.
22.	**Debnath P., (2018).** Cytogenetic Effects of Silver and Gold Nanoparticles on Allium Cepa Roots. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. ; 16 (6) : 519–526.
23.	**Ealia, S.A.M. and M. Saravanakumar., (2017)** IOP Conference Series: Materials Science and Engineering 2017.
24.	**Elham A., Milani M., Fikri A *et al.*, (2016).** Silver nanoparticles: Synthesis methods, bioapplications and properties. J Critical Reviews in Microbiology. ; 42 :2, 173-180, DOI : 10.3109/1040841X.2014.912200.
25.	**Ezealisiji, K. M., Siwe-Noundou, X., Maduelosi, B., Nwachukwu, N. & Krause, R. W. M., (2019).** Green synthesis of zinc oxide nanoparticles using Solanum torvum (L.) leaf extract and evaluation of the toxicological profle of the ZnO nanoparticles–hydrogel composite in Wistar albino rats. Int. Nano Lett. 9, 99–107.
26.	**F. Zivic, N. Grujovic., (2018).** Biosynthèse des nanoparticules d'argent et ses applications. Journal of Nanotechnologie.
27.	**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**
28.	**Ghigo J-M., (2003).** Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? Research in Microbiology 154(1), 1-8
29.	**Ju-Nam et Lead., (2013).** Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. Lancet Infect Dis ; 6 : 589–601.
30.	**Keywan M., Najaf M., Samadian H*et al.*, (2019).** Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. Journal of Chemico-Biological Interactions. ; 312. doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108814.
31.	**Kulkarni,S.K.& Kulkarni,S.K., (2015).** Nanotechnology : principles and practices. Springer.
32.	**Li W., Xiao-Bao X., Qing-Shan S., (2011).** Antibacterial effect of silver nanoparticles on Staphylococcus aureus. J Biometals. ; 24 :135–141 DOI 10.1007/s10534-010-9381-6.

33.	**M. Marchioni., (2019)**. Ecoconception de nouveaux agents biocides à base de nanoparticules d'argent à enrobage bio-inspiré, Université Grenoble Alpes, 2018. [19] F. Zivic, N. Grujovic, S. Mitrovic, I.U. Ahad and D. Brabazon, Commercialization of Nanotechnologies–A Case Study Approach, (2018) 227. [20] W. Li, W. Gou, W. Li, T. Zhang, B. Yu, Q. Liu and J. Shi, Environmental Pollution, 252, 1344.
34.	**M. Ricaud, O. Witschger., (2019).** Les nanomatériaux : définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention, ED 6050, INRS, p.07
35.	**Madhumitha, G., Roopan, S.M. (2013).**Devasted crops :multifunctional efficacy for the production of nanoparticles. Journal of Nanomaterials 2013)
36.	**Mémoire de Magister**. En Biochimie et Microbiologie appliquées. Université Mentouri Constantine. P : 4-8
37.	**Mohamed H.E.A., Shakeeb A., Ali T *et al.,* (2019).** Biosynthesis of Silver Nanoparticles from Hyphaene Thebaica Fruits and Their (in Vitro) Pharmacognostic Potentiel. Materials Research Express. ; 6 (10) : 1050c9. doi.org/10.1088/2053-1591/ab4217.
38.	**Muhammad R., Sadaf I., Rafique M *et al.,* (2016)**. A Review on Green Synthesis of Silver Nanoparticles and Their Applications. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal. ; 45(7) : 1272–1291.doi.org/10.1080/21691401.2016.1241792.
39.	**Nasrollahzadeh. M, S. Mahmoudi-Gom Yek., (2019).** Recent developments in the plant-mediated green synthesis of Ag-based nanoparticles for environmental and catalytic applications, 19 (2019) 2436-2479.
40.	**O.S.Muddinet, B Ghoshand S, (2015).** Int Journal of pharacentics.
41.	**Oruc,A,Altindal.,(2017).** Strucurel and dielectric properties of CuO nanoparticules,ceramics interenational,43,issue1 , 10708-10714.
42.	**Patra, J. K., & Baek, K. H., (2014).** Green nanobiotechnology: factors affecting synthesis and characterization techniques. Journal of Nanomaterials.
43.	**PRADYT, Patnaik., (2004)**. Dean's Analytical Chemistry Handbook (McGraw-Hill Handbooks). Second edition. 1114 p.
44.	**Prateek M., Ramateke S., Jain N.K., (2017).** Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. Artificial cells nanomedcine andbiotechnology journal doi.org/10.1080/21691401.2017.1414825
45.	**Prescott., (2010).**Microbiologie. 3ème édition. Paris. P : 589-603.
46.	**Rajeshkumar S., Bharath L.V., (2017).** Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles – A review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. Chemico-Biological Interactions Journal. doi.org/10.1016/j.cbi.2017.06.019.
47.	**Renata D.L., Seabra B., Durán N *et al.,* (2012).** Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J. Appl. Toxicol. ; 32 : 867–879. doi : 10.1002/jat.2780.
48.	**S.A.M. Ealia and M. Saravanakumar., (2017).** IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.

49.	**Sang H., Jun B., (2019).** Silver Nanoparticles : Synthesis and Application for Nanomedicine. Int. J. Mol. Sci. ; 20 : 865. doi : 10.3390/ijms20040865.
50.	**Saravanan, M. et al., (2018).** Green synthesis of anisotropic zinc oxide nanoparticles with antibacterial and cytofriendly properties. Microb.Pathog. 115, 57–63.
51.	**Simichi, A.,Ahmadi ,R., Reihani,S.S.,&Mahdavi,A., (2012).** Kinetics and mechanisms of nanoparticle formation and growth in vapor phase condensation process.
52.	**Suman Kumari, Nimisha Tehri, Anjum Gahlaut & Vikas Hooda., (2020).** Actinomycetes mediated synthesis, characterization, and applications of metallic nanoparticles,Inorganic and Nano-Metal Chemistry.
53.	**Tran Q., Nguyen V *et al.,* (2013).** Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.doi.org/doi:10.1088/20436262/4/3/033001. Adv. Nat. Sci. : Nanosci. Nanotechnol journal. ; 033001 :20.
54.	**W. Li, W. Gou, W. Li, T. Zhang, B. Yu, Q. Liu and J. Shi, (2019)** Environmental Pollution, 252 1344.
55.	**Zhang X., Liu Z., Shen W *et al.,* (2016).** Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. Int. J. Mol. Sci. ; 17 : 1534 ; doi : 10.3390/ijms17091534.

ANNEXES

ANNEXES

ANNEXE 1 :

Matériel non biologique

- Autoclave
- Bain marie
- Agitateur chauffant
- Balance
- Bec bunsen
- Boite de pétri
- Pipettes pasteur
- Anse
- L'eau distillée
- Cristal violet
- Gélose
- Tube à essai
- Filtres stériles

ANNEXE 2 :

Préparation d'échantillon solide pour FTIR










ANNEXE 3 :

Définition :

- *Klebsiella :*

Les espèces du genre *Klebsiella* sont des bactéries Gram négatif en forme de bâtonnet, non mobiles et généralement encapsulées, qui appartiennent à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ces bactéries produisent de la lysine-décarboxylase, mais pas d'ornithine-décarboxylase, et donnent en général un résultat positif au test de Voges-Proskauer. Les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* sont habituellement des anaérobies facultatifs, et leur taille varie de 0,3 à 1,0 µm de largeur et de 0,6 à 6,0 µm de longueur. Les espèces du genre *Klebsiella* forment souvent des colonies mucoïdes. Le genre comprend 77 antigènes capsulaires (antigènes K) donnant naissance à différents sérogroupes.