Ahmed AZIZI
DN: cn=Ahmed
gn=Ahmed
France l=FR
e=a.azizi@
Reason: I a
this docume
Location:
Date: 2021-
20:46-12:00

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة الدكتور يحي فارس بالمدية

Université Dr Yahia Farés de Médéa

كلية العلوم

Faculté du Science

قسم العلوم البيولوجية

Département de Science Biologique

Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée

Étudié par :

Amina HOUARI

Thème

BIOSYNTHESE DES NANOPARTICULES PAR DES MICRO-ORGANISMES ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE

Soutenu le Mardi 13/07/2021 à 15h00 devant le jury composé par :

Amel EULDJI	MAA, U.Y.F.M	Présidente
Mounir HAMMOUDI	MCB, U.D.B.K.M	Examinateur
Ahmed AZIZI	**MCA, U.A.T. L**	**Rapporteur de Mémoire**
Mahfoud AINAS	MCB, U.Y.F.M	Co-Rapporteur de Mémoire

BIOSYNTHESE DES NANOPARTICULES PAR DE MICRO-ORGANISMES ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE

RESUME. Les nanoparticules ont été synthétisées par méthode biologique avec des bactéries *Actinomycètes* et *Streptocoques B* avec du métal argenté pour sa stabilité chimique, ce qui donne une nanoparticule à l'aide de particules d'argent où incubation pendant 24 heures, puis centrifugation et obtention de biomasse, puis faire l'étape de réaction avec du métal particules d'argent.

Dans cette étude, l'efficacité des nanoparticules résultantes au niveau de l'élimination des accumulations bactériennes de *Klepsiella* qui ont atteint C sur microscopiques plaques 96 et l'interaction des antimicrobiens sur chacune des bactéries *Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, Staphylocoque, Candida, Bacillus* donnés résultats suivants La plus petite superficie est 1, la plus grande superficie est 24, de la biomasse des Actinomycètes à Soja n'a pas donné de résultats.

L'échantillon a réussi le test infrarouge, qui a montré les fonctions d'amino et d'hydroxyde.

MOTS-CLES. Biosynthèses ; Nanoparticules ; *Actinomycète* ; *StreptocoqueB ;* Biofilm.

BIOSYNTHESIS OF NANOPARTICLES BY MICROORGANISMS AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

ABSTRACT. The nanoparticles were synthesized by biological method with *Actinomycete* and *Streptocoque B* bacteria with silver metal for its chemical stability, which gives a nanoparticle using silver particles where incubation for 24 hours, then centrifugation and obtaining biomass, then do the reaction step with metal silver particles.

In this study, the efficiency of the resulting nanoparticles at the level of the elimination of bacterial accumulations of *Klepsiella* which reached C on microscopic plates 96 and the interaction of antimicrobials on each of the bacteria *Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, Staphylococcus, Candida, Bacillus* she gave the following results The smallest area is 1, the largest area is 24, Soybean Actinomycetes biomass did not give results.

The sample passed the infrared test, which showed the functions of amino and hydroxide.

KEY WORDS.Biosyntheses; Nanoparticles; Actinomycete; Streptococcus B; Biofilm.

التخليق الحيوي للجسيمات النانوية بالكائنات الحية الدقيقة ودراسة نشاطها

ملخص. الجسيمات النانوية تم تصنيعها بالطريقة البيولوجية ببكتيريا **الفطريات الشعاعيةوالمكورات العقدية** مع **معدن الفضة** لاستقراره الكيميائي مما يعطي جسيمات متناهية الصغر حيث تحضن لمدة 24 ساعة ثم اجتياز طرد مركزي والحصول الكتلة الحيوية ثم القيام بخطوة التفاعل بجزيئات الفضة المعدنية.

في هذه الدراسة، تم تسليط الضوء على كفاءة الجسيمات النانوية الناتجة على مستوى القضاء على التراكمات البكتيرية الكليبسيلا الذي وصل إلى C على الصفائح االميكروسكوبي 96 وتفاعل مضادات الميكروبات على كل من بكتيريا الإشراكية القولونية، المكورات الدقيقة، كليبسيلا، المكورات العنقودية، المبيضات، العصيات أعطت النتائج التالية أقل المساحة هي 1، والمساحة الأكبر هي 24، الكتلة الحيوية للفطريات الشعاعية في سوجا لم تعطِ نتائج.

اجتازت العينة اختبار الأشعة تحت الحمراء، والذي أظهر وظائف الأمينو والهيدروكسيد.

الكلمات الرئيسية. التخليق الحيوي؛ الجسيمات النانوية؛ الفطريات الشعاعيةوالمكورات العقدية؛ التراكمات البكتيرية.

Remerciements

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

Tout d'abord nous exprimons notre gratitude et je remerciements à **mon promoteur Mr Ahmed AZIZI et** *mon Co-promoteur* **Mr Mahfoud AINAS** *qui ils ont dirigé ce travail pendant toute la durée de réalisation de ce travail.*

Je *tiens à exprimer notre gratitude aux membres* **du jury** *:*

Mlle Amel EULDJI, Mr Mounir HAMMOUDI d'avoir accepté de juger ce travail.

N*otre profond remerciement à ingénieure* **laboratoire** *biologie a Mme TAFOURA et Mlle AIDE au département science de la nature et la vie a l'université Yahia Farès Médéa.*

Notre profond remerciement aux *ingénieures en biologies Mr MESSAOUDI et leur étudiants et département science de la nature et la vie d'université Amar Telidji de Laghouat.*

Notre profond remerciement à laboratoire bactériologie de l'hôpital universitaire MOSETFA BACHA

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

Houari Amina

Dédicaces

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

Toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail et surtout M^lle AIDE S et l'âme de ma nounou et ma grand-mère, que Dieu ait pitié d'elle tous les amis qui m'ont fait confiance et Leur comportement honnête

Houari Amina

TABLE DES MATIÈRES *i*

ABRÉVIATIONS & NOMENCLAUTRES *iv*

LISTE DES FIGURES *xi*

LISTE DES TABLEAUX *xiii*

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

Chapitre I. Synthèses bibliographiques

1.1Qu'est.ce que microorganisme 3

1.2 Qu'est.ce que la nanotechnologie biologique ? 3

1.2.1 Les resèques 4

1.2.2 L'Application 5

1.3 Qu'est-ce que les nanoparticules biologiques ? 7

1.4. Utilisation des nanoparticules 8

1. 5. Différents types de nanoparticules 8

1. 5.1. Les nanoparticules naturelles 8

1.5.2 Les nanoparticules produites par l'homme de façon non intentionnelle (ou nanoparticules non manufacturées d'origine anthropique) 8

1.5.3 Les nanoparticules produites par l'homme de façon intentionnelle (ou nanoparticules manufacturées) 10

1.6 Biosynthèse vert de nanoparticules 10

1.7 Comparaison entre les mesures de la taille de nanoparticules par AFM et MEB 12

1.7.1Techniques de mesure des paramètres dimensionnels de nanoparticules 13

1.7.1.1 Méthodes de mesures directes de taille de nanoparticules 14

1.7.1.2 Microscopie à Force Atomique (AFM) 14

1.7.1.3 Microscopie électronique à balayage (MEB) 15

1. 8Biosynthèse des nanoparticules dans différents organisme vivants 15

1.9 Activité anticancéreuse 17

Chapitre 2: Matériels et Méthodes

2.1 L'isolement et classification scientifique des souches bactériennes 19

2.2 Souche bactériennes pour le test antimicrobien 20
2.3 Produits chimiques 20
2.3.1Matériels 20
2.3.2Verreries et consommables 20
2.4 Milieux de culture 20
2.4.1 Composition de L'ISP2 20
2.4.2Muller Hinton 21
2.4.3 Composition de Soja 21
2.4.4BHIB 21
2.6 Méthode 21
2.6.1 Stérilisation des milieux de culture 22
2.6.2 Méthode de synthèse de nano argent par isolat d'actinomycète 22
2.6.3 Méthode de synthèse de nano argent par isolat du streptocoque 22
2.6.4Biosynthèse des AgNPs 23
2.6.5 Biosynthèse de nanoparticules par microorganismes 23
2.6.6 Définition du biofilm 24
2.7 Biofilm avec *Klebsiella* 25
2.8 Analyse Antimicrobiennes 27
2.8.1 Préparation des milieux de l'analyse antimicrobienne 27
2.8.2 L'ensemencement 27
2.8.3 L incubation 27
2.9 Analyse par spectrophotométrie UV-visible 28
2.11 Protocole 28
2.12 Analyse spectroscopique par l'infrarouge 29
2.12.1 principe 29
2.12.2 Préparation d'échantillons solide 30

Chapitre 3. Résultat et discussions

3.1 Analyse spectroscopique par infrarouge des nanoparticules 33
3.2 Analyse spectroscopique par UV-visible des nanoparticules 34
3.3 Effet antibactérien des AgNPs 35
3.3.1 Biomasse et surnagent de *streptocoque b* 36
3.3.1 Biomasse d'actinomycètes de ISP2 37
3.3.3 Surnagent actinomycètes de ISP2 38

3.3.4 Biomasse d'Actinomycètes de Soga 39
3.3.5 Surnagent Actinomycètes de Soga 40
3.4 Activité antibactérienne des AgNPs 40
3.5 Résultat du test de l'élimination de la biofilm 44
3.6. Comparaissent entre le témoin et l'effet des nanoparticules 45
3.5 Mécanisme d'action « *Anti quorum sensing* » des nanoparticules d'argent 46
CONCLUSION GENERALE 47
PERCEPTIVES 48
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 51

LISTE DES ABRIVIATIONS & NOMENCLATURES

Abréviation	***Signification***
AFM	Microscopie à Force Atomique
Ag	Argent
$AgNO_3$	Nitrate d'argent
AHL	N-acylhomosérine lactone
DLS	Dynamics Light Scattering
G	Grossissement
IR	Infrarouge
min	Minute
MEB	Microscopie électronique à balayage
MET	Microscopie Électronique en Transmission
MET	Microscopie Électronique en Transmission
MtNPs	Métal nanoparticules
NaCl	Chlorure de sodium
OMS	Organisation mondiale de la Santé
PUF	Les particules ultrafines
ROS	Les espèces réactives de l'oxygène
rpm	Ronde par minute
sp-ICPMS	Single Inductive Couplé Plasma Mass Spectrométrie Mérande
T	Transmittance

LISTE DES FIGURES

Chapitre I. Synthèses bibliographiques

Numéros	Titres des figures	Pages
1.1	Diagramme de concept montant les divers types d'entités biologique	3
1.2	Nanotubes carboniques que fais filtration	6
1.3	Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures	7
1.4	Verte des nanoparticules utilisant des microorganismes endophytes	11
1.5	Principe de la convolution entre la pointe et l'échantillon pour l'imagerie d'une nanoparticule. Le trait rouge correspond au profil obtenu sur l'image AFM	12
1.6	Méthode de segmentation des particules par seuillage sur les images MEB. Un seuil est placé à un niveau défini par l'opérateur. Pour chaque pixel sur l'image MEB, si l'intensité en niveaux de gris est supérieure à la valeur du seuil le pixel est égal à 1 sur l'image binaire, sinon il est égal à 0	13

Chapitre 2. Matériels et Méthodes

Numéros	Titres des figures	Pages
2.1	Échantillon avent virage de couleur	23
2.2	Échantillon avec virage de couleur	23
2.3	Biosynthèse de nanoparticules par microorganismes	24
2.4	Micro plaque 96	25
2.5	Evaluation de résistance de *Klebsiella* en France	25
2.6	Les microplaques avec preparation de le biofilm	26
2.7	Application violet Christo	26
2.8	Méthode quetre cadre	27
2.9	Tube Eppandorf	28
2.10	Séparation avec centrifugeuse	29
2.11	Mesure dans des condition de faible luminosité	29
2.12	NaCl	30
2.13	Verser l'échantillon dans l'engrenage	31
2.14	Fixation et compression de l'échantillon	31
2.15	Echantillons d'infrarouge	31
2.16	Pied presseur	31
2.17	Appareille d infrarouge	31

Chapitre 3. Résultats et discutions

Numéros	Titres des figures	Pages
3.1	Numéro d'onde	33
3.2	Résultat de UV	35
3.3	Pied métre numérique	43
3.4	Une microplaque avec La numérotation et les lettres sont claires	44
3.5.1	Effet de les NpsAg	46
3.6.2	Témoin	46
3.7	Mécanisme d'action "Antiquorumsensing" des nanoparticules d'argent récemment, les nanoparticules d'argent ont prouvé avoir un effet potentiel anti-QS	47

LISTE DES TABLEAUX

Numéro	Titre des tableaux	Pages
1.1	Biosynthèse des nanoparticules dans différents organisme vivants	15
2.1	Classification scientifique de *Actinomycètes*	19
2.2	Classification scientifique de *Streptocoque B*	20
2.4	Composition de L'ISP2, (International *Streptomyces* Project 2)	20
2.5	Composition de Muller Hinton	21
2.6	Composition de Soga	21
2.7	Composition de Braine Heart Infusion Brouth	21
3.2	Biomasse et Surnagent de *Streptocoque b*	36
3.3	Biomasse d'*Actinomycètes* de ISP2	38
3.4	Surnagent *Actinomycètes* de ISP2	39
3.5	Surnagent *Actinomycètes* de Soga	41
3.1	Les resultat de leffet de NpsAg de *Streptocoque ,Actinomycètes* de ISP2,*Actinomycètes* de SOJA	45

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION

L'intérêt pour les matériaux de taille nanométrique n'a cessé de croître ces vingt dernières années. Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des propriétés ou des comportements particuliers, utilisés notamment pour de nouvelles applications technologiques. En effet, les nanoparticules possèdent des propriétés magnétiques, optiques, électroniques, catalytiques et biologiques uniques, différentes de celles du matériau massif ou de la molécule, liées à leur taille et à leur forme (MEZNI,2013).

Les propriétés des nanomatériaux varient notamment selon leur composition chimique, leur taille, leur surface spécifique, l'état de surface, ou encore la forme du nano-objet considéré. De plus, chaque nanomatériau peut être doté d'une réactivité ou d'un Comportement différent selon la formulation et la matrice du produit fini qui le contient(MEZNI, 2013).

Le développement de méthodes simples, rentables et fiables pour la synthèse de nanomatériaux se confirme à l'échelle mondiale. Les méthodes de biosynthèse, utilisant des micro-organismes, sont apparues comme une alternative écologique, propre et viable aux méthodes chimiques et physique (Shantkriti, 2019).

Il existe différents types de nanoparticules telles que les nanoparticules d'argent, d'oxyde de titane, de silice, été. Elles sont de plus en plus utilisées de nos jours à travers le monde. De nouveaux produits en contenant ne cessent d'apparaitre sur le marché. Cela est dû à leurs uniques propriétés physico-chimiques, différentes et souvent plus avantageuses que pour leur forme macroscopique. Ces nanoparticules sont donc de nouvelles opportunités dans de nombreux domaines d'application. Parmi ces diverses nanoparticules, nous trouvons les nanoparticules d'argent, aussi appelées nano-argent ou encore AGNPS (« Ag Nano Particles » en Anglais). Dans la Grèce antique, des récipients en argent étaient utilisés pour conserver l'eau purifiée et le vin. Alors qu'au début du 20° siècle, les familles américaines mettaient des dollars d'argent dans les récipients contenant du lait pour éviter qu'il ne tourne(Chauvel 2018).

Ces nanoparticules d'argent ont donc une bonne efficacité antibactérienne, mais aussi contre les virus et d'autres micro-organismes eucaryotes. Elles sont utilisées pour une large gamme de produits allant des désinfectants pour dispositifs médicaux jusqu'aux produits ménagers ou encore pour le traitement de l'eau. Cependant, la taille réduite de ces particules leur confère des propriétés et une toxicité potentielle qui n'existait pas avec le même matériau à taille macroscopique. Elles peuvent par exemple passer plus aisément les barrières physiologiques,

et être, dans certaines conditions, toxiques pour l'homme ou son environnement(Chauvel 2018).

Cela conduit actuellement à de nombreuses préoccupations publiques sur les nanoparticules, dont les AGNPS qui sont de plus en plus passées au crible par les différents acteurs de la santé. Tout en sachant qu'en ce début 2018, les réglementations concernant les nano particules ne sont pas en encore clairement énoncées. Dans ce travail, nous nous intéresserons en première partie aux particularités des nanoparticules, et plus précisément des nanoparticules d'argent. Dans un second temps, nous étudierons quelques différents usages en thérapeutique(Chauvel 2018).

Par conséquence, notre documentest subdivisé par trois partie :

- ***1ere partie***, consacré aux synthèses bibliographiques ;
- ***2ieme partie*** rassemble les matériels et les méthodes utilisées pour l'élaboration de ce travail ;
- ***3ième partie***, aperçu les résultats obtenus et leurs discussions et il est clôturé par une conclusion et quelques perspectives.

CHAPITRE 1. SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE 1. SYNTHESES BIBLIOGRAPHIQUES

1.1 Qu'est-ce que microorganisme ?

La microbiologie a souvent été définie comme l'étude d'organismes trop petits pour être vus à l'œil nu- organismes (figure 1.1) Du fait que les objets d'une taille inférieure à environ un millimètre de diamètre ne peuvent être clairement vus à l'eil nu et doivent être examinés à l'aide d'un microscope, la microbiologie est principalement concernée par des organismes et des agents aussi petits ou plus petits. Cependant, certains micro- organismes, en particulier certains micro-organismes eucaryotes, sont visibles sans microscope, ainsi les moisissures du pain et les algues filamenteuses. (Prescott et al ., 2015).

1.2 Qu'est-ce que la nanotechnologie biologique ?

La nanobiologie est une nouvelle discipline : elle combine les outils, les idées et les matériaux de la nanoscience et de la biologie.

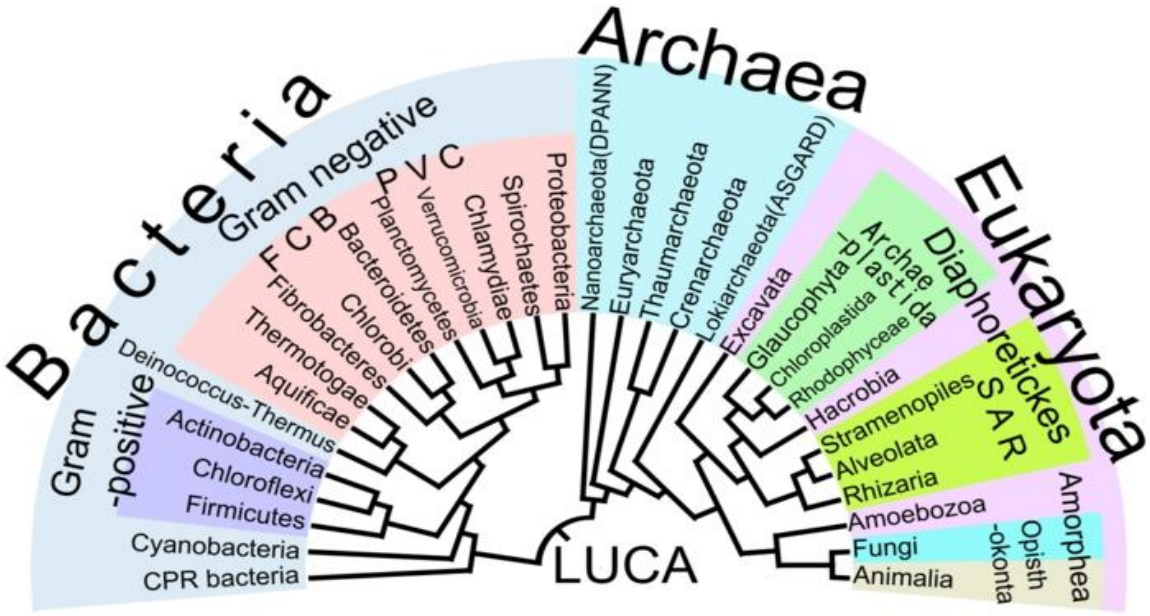


Fig. 1.1. Diagramme de concept montant les divers types d'entités biologique (Prescott et al., 2015)

Il aborde les problèmes biologiques qui peuvent être étudiés et résolus par la nanotechnologie.Il conçoit des moyens de construire des dispositifs moléculaires utilisant des

bio macromolécules ; et il tente de construire des machines moléculaires en utilisant des concepts vus dans la nature. Son objectif ultime est de pouvoir les manipuler de manière prévisible, en les adaptant aux besoins spécifiques. La nanobiologie cible les systèmes biologiques et utilise des bio macromolécules. Par conséquent, d'une part, la nanobiologie est apparemment limitée dans sa portée par rapport à la nanotechnologie générale.Pourtant, l'étonnante complexité des systèmes biologiques, leur complexité et la richesse des formes et des propriétés fournies par les polymères biologiques, enrichissent la nanobiologie. Cibler les systèmes biologiques implique la compréhension de leur fonctionnement et la capacité d'utiliser leurs composants dans la conception. Du point de vue physique, en fin de compte, si nous voulons comprendre la biologie, nous devons apprendre à appliquer les principes physiques pour comprendre comment ces systèmes fonctionnent réellement. La nanobiologie en est à ses balbutiements. Pourtant, la biologie fournit une vaste gamme de problèmes engageants et stimulants avec de nombreux exemples in vivo de systèmes biologiques complexes, complexes et fascinants. Comprendre, imiter et contrôler les dispositifs qui ciblent ces processus et qui sont construits à partir de ces molécules est un énorme défi pour les disciplines convergentes de la nanobiologie (Boczkowski ., 2011).

1.2.1 Resèque

- Nanomatériaux peuvent être des vecteurs pour des toxines d'origine environnementale.
- Dans son rapport intitulé « Évaluation des risques liés aux nanomatériaux » publié en mai 2014, l'Anses a mis en évidence les effets des nanoparticules sur la santé humaine: , effets cancérogènes, retards de croissance des anomalies ou mal formations, des troubles neurologiques, des phénomènes d'immunosuppression des réactions d'hypersensibilité et d'allergie(CPP 2020).
- Des études suggèrent que les nanoparticules induisent diverses pathologies : bronchite chronique, fibrose pulmonaire, cancer du poumon, troubles cardio- vasculaires et maladies neurodégénératives (Céline et al.,2012).
- En ce qui concerne le contact avec la peau (solvants, pesticides, crèmes) l'étude menée sur des souris indique que l'oxyde de titane induirait des dommages au niveau des chromosomes et des ruptures des brins d'ADN, pouvant augmenter le risque de développer un cancer(Céline et al.,2012).
- Egalement des inquiétudes‹ Manipuler la matière à l'échelle moléculaire et interférer avec le monde du vivant soulève des questions éthiques et sanitaires qui doivent être

prises en considération par les pouvoirs publics et les acteurs concernés(Gharibe et al., 2012).

- Lings directories de l'OMS « Protecting Workers from Potential Risks of Manufactured Nanomaterials » (WHO/NANOH), (Document d'information) 2011. But affiché par l'OMS : « Ces lignes directrices entendent faciliter les améliorations dans le domaine de la santé et de la sécurité au travail des employés potentiellement exposés aux nanomatériaux dans un vaste ensemble d'environnements sociaux et de production (CPP 2020).

D'autre part, les matériaux modifiés à l'échelle nanométrique peuvent entrer dans des endroits inaccessibles à des matériaux plus grands (CPP 2020).

Ces comportements (sic) peuvent également avoir des conséquences sur la nocivité potentielle des nanomatériaux synthétiques »(CPP 2020).

1.2.2Application

Les principaux domaines sont les suivants (voir Annexe 3 pour une description plus détaillée) :

- Médical (imagerie, vectorisation de médicaments, dispositifs médicaux…) Cosmétiques
- Transport et espace (peinture, pneumatiques, revêtements…)
- Bâtiment (nouveaux matériaux…)
- Agriculture (nanopesticides, nanocapteurs…)
- Electronique
- Textiles (antibactérien…)
- Environnement (stockage pour batteries, traitement eaux…)
- Alimentation (additifs, emballage, nanocapteurs…)
- Loisir et sport (amélioration des équipements…)
- Défense nationale (nanorobots, exosquelettes**…)**

Nanoparticules peuvent acquérir des propriétés fonctionnelles spécifiques en mettant en contact des molécules ou des structures biologiques: cette intégration a conduit au développement de dispositifs de diagnostic, d'outils d'analyse, de méthodes d'administration de médicaments, et bien d'autres il est devenu possible d'exploiter les propriétés uniques des nanomatériaux (CPP 2020).

Il est utilisé dans les procédés de filtration à distance (Nano filtration) dans les appareils rénaux industrielsdans le dessalement de l'eau de mer et dans le traitement des eaux usées par

les outils les plus primitifs dans ce domaine sont ceux qui sont utilisés pour diagnostiquer les maladies et comprennent des tests chimiques spécialisés et des outils qui peuvent être utilisés pour surveiller la chimie interne du corps ,les utilisations les plus avancées de la nanobiologie médicale comprennent des dispositifs implantés dans le corps pour distribuer des médicaments ou des hormones en cas de besoin, chez les personnes souffrant de troubles graves ou d'un manque de production de ces substances, par exemple des maladies : Détection et traitement du cancer : Le cancer survient lorsque le taux de division d'un groupe de cellules hors de contrôle, c'est-à-dire une prolifération illimitée et une division de manière aléatoire , il existe actuellement deux types de médicaments utilisés dans le traitement des tumeurs cancéreuses, le premier est un produit chimique qui détruit les cellules cancéreuses et l'autre est un facteur qui empêche la formation de vaisseaux sanguins dans la tumeur, ce qui empêche le sang de l'atteindre(AbdeBasite et al .,2006).

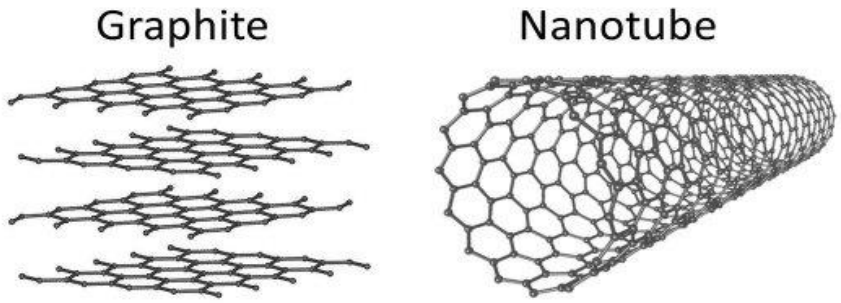


Fig.1.2. Nanotubes carbonique que fais filtration (AbdeBasite et al .,2006).

Le médicament chimique est toxique et détruit les cellules cancéreuses et les cellules saines sans les distinguer. Quant à l'agent de prévention vasculaire, il ferme la voie que le médicament destructeur chimique doit prendre , ces cellules peuvent être éliminées avec la chimiothérapie, mais en arrêtant la formation de vaisseaux sanguins (système vasculaire) dans la tumeur, les méthodes d'administration du médicament ont été coupées par les nanocytes, quelle est la membrane de phospholipides qui fonctionne comme un moyen d'administrer la chimiothérapie à cellules cancéreuses uniquement sans exposition à des cellules saines. Ditya) au Massachusetts Institute of Technologie de Boston, en cours de développement sous la direction de Ram Sasisekharan, professeur de bio-ingénierie à l'institut, chaque nanocyte développé pour transporter les deux types de médicaments a un diamètre d'environ 800 nm et peut être imaginé comme un ballon à l'intérieur du ballon de protection, des médicaments utilisés dans le traitement jusqu'à ce qu'ils pénètrent dans le tissu tumoral, dans le ballon interne il y a un médicament de chimiothérapie à l'extérieur, il y a un agent anti-vasculaire concevoir le ballon externe sous forme de cellules graisseuses insaisissables, le système

immunitaire et empêcher la découverte de ces nanocytes, cette technique dépend du fait que les vaisseaux sanguins des tumeurs cancéreuses ont des trous avec un diamètre de 100 nanomètres, et donc il est plus visible que les vaisseaux sanguins normaux avec un diamètre d'environ 50 nanomètres (AbdeBasite et al .,2006).

Les nanocytes circulent dans la circulation sanguine et lorsqu'ils atteignent le tissu cancéreux, ils s'écoulent des trous des vaisseaux sanguins dans le tissu tumoral jusqu'à un diamètre nul par rapport aux perforations de ces vaisseaux, la paroi externe est auto-dissoute et l'agent de destruction vasculaire est libéré dans la tumeur, accomplissant sa tâche en environ 20 heures, et après la dissolution de la paroi externe Il est normal que le ballon soit exposé, mais à l'intérieur de la cellule cancéreuse, le médicament sort en raison des enzymes de la cellule cancéreuse (AbdeBasite et al .,2006).

1.3 Qu'est-ce que les nanoparticules biologiques ?

Les nanomatériaux se caractérisent en partie par leur taille minuscule, mesurée en nanomètres. Le nanomètre est un millionième de millimètre environ 100 000 fois plus petit que le diamètre d'un cheveu humain.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 .La plupart des matériaux nanométriques sont trop petits pour être vus à l'eil nu et même les avec microscopes de laboratoire conventionnels. Les matériaux développés à une si petite échelle sont souvent appelés nanomatériaux. D'ingénierie, qui peuvent posséder des propriétés optiques, magnétiques, électriques et autres uniques atomes Molécules. La petitesse des particules leur confère des propriétés très utiles.

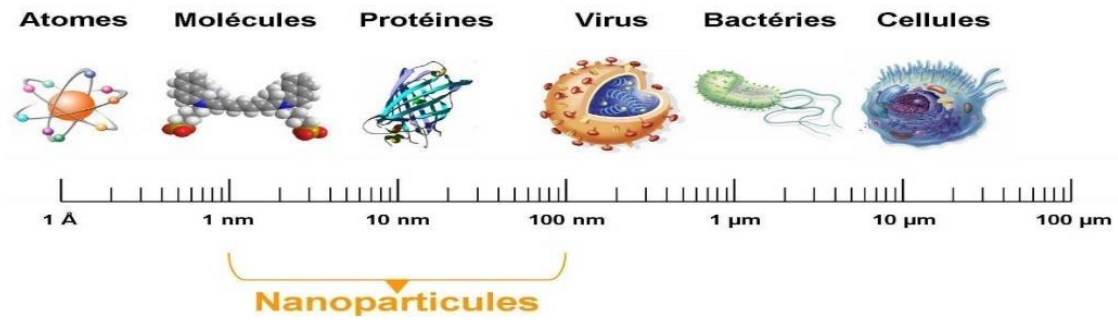


Fig.1. 3. Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures

- La figure 1 illustre la gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures. Certaines de ces propriétés résultent de l'énorme augmentation de la surface lorsque, cette augmentation de surface entraînera une augmentation du taux de réactions

éventuelles à la surface du matériau. Utilisation des nanoparticules Ces propriétés émergentes peuvent avoir un impact important sur l'électronique, la médecine et d'autres domaines, certains nanomatériaux peuvent être d'origine naturelle, tels que les protéines sanguines essentielles à la vie et les lipides présents dans le sang et la graisse corporelle.

1.4. Utilisation des nanoparticules

Ces propriétés émergentes peuvent avoir un impact important sur l'électronique, la médecine et d'autres domaines. Certains nanomatériaux peuvent être d'origine naturelle, tels que les protéines sanguines essentielles à la vie et les lipides présents dans le sang et la graisse corporelle. Cependant, les scientifiques s'intéressent particulièrement aux nanomatériaux d'ingénierie, conçus pour être utilisés dans de nombreux matériaux et dispositifs, déjà, des milliers de produits courants, tels que les écrans solaires, les cosmétiques, les articles de sport, les vêtements résistant aux taches, les pneus et les appareils électroniques sont fabriqués avec des nanomatériaux. Ils interviennent également dans le diagnostic médical, l'imagerie, l'administration de médicaments et l'assainissement

1.5.Différents types de nanoparticules

1. 5.1 Nanoparticules naturelles

Un grand nombre de nanoparticules d'origine naturelle sont présentes dans l'environnement (poussières émises par combustion ou par les volcans, produites par érosion).

Parmi elles, on note les imogolites et allophanes, nanoparticules naturelles qui se présentent sous la forme de tubes (imogolites) ou une forme décrite comme sphérique mais dont la structure reste imprécise (allophanes)(Charrakh et al .,2019).

Les imogolites et allophanes sont des aluminosilicates structurés à courte distance résultant de l'altération de verres et de cendres volcaniques(Charrakh et al .,2019).

1.5.2 nanoparticules produites par l'homme de façon non intentionnelle (ou nanoparticules non manufacturées d'origine anthropique)

Dans cette catégorie nous retrouvons les particules atmosphériques « ultr. l'exposition humaine à des PUF est devenue au cours des dernières années une question importante de santé publique, mise en lumière par l'analyse de la composition des particules atmosphériques et de leurs effets biologiques , En milieu urbain, les PUF peuvent être formées de plus de 80 % de suies fines (inférieur à 1 mm) et ultrafines provenant de la combustion des carburants fossiles , ces particules, émises notamment par les véhicules Diesel, les véhicules à essence et

les chauffages urbains, ont rapidement été suspectées être à l'origine de la morbidité et de la mortalité cardiorespiratoires observées dans les études épidémiologiques sur les effets à court terme de la pollution atmosphérique , elles seraient principalement à l'origine de réponses inflammatoires pouvant aggraver des pathologies pulmonaires telles que l'asthme(Charrakh et al .,2019).

Elles auraient également un effet pro thrombotique et pourraient être à l'origine d'athérosclérose et de pathologies cardiovasculaires ,mis à part les PUF, d'autres nanoparticules sont produites par l'homme de façon non intentionnelle, Dans cette classe, nous retrouvons principalement les particules présentes dans la fumée de soudage , le soudage est un procédé industriel utilisé pour relier deux pièces métalliques entre elles, et qui 'accompagne de l'émission dans l'air de « fumées des soudage », mélange complexe de très fines particules métalliques (de taille micro et nanométrique) et de gaz , Ils' agit d'une procédure très répandue ; dans la construction des ponts métalliques par exemple, en France, le soudage est utilisé dans 100 % des cas. Du fait de l'utilisation très importante du soudage comme procédé d'assemblage préférentiel, le nombre de travailleurs exerçant le métier de soudeur va en 'accroissant : une hausse de 5 % du nombre de soudeurs est prévue par le Bureau of Labor Statistiques dans les dix prochaines années, du fait de l'utilisation croissante du soudage dans les secteurs de la construction, et de l'industrie manufacturière (transformation des biens, réparation et l'installation d'équipements industriels) notamment (Charrakh et al .,2019).

Des données métrologiques montrent l'existence de particules primaires de taille nanométrique dans les aérosols particulaires émis par les différents procédés de soudage utilisés , dans certains types de fumées, les nanoparticules peuvent ainsi représenter jusqu'à 11 % de la masse totale des particules émises . et surtout jusqu'à 80 % du nombre émises de particules émises Compte tenu des connaissance actuelles sur la toxicité potentielle des nanoparticules , ilest possible que les nanoparticules présentes dans les fumées de soudage aient un impact sanitaire important , diverses altérations pulmonaires sont d'ailleurs décrites chez les travailleur exerçant comme soudeurs, tant en termes fonctionnels qu' histopathologiques , cependant, la physiopathologie de ces altérations et le rôle potentiel des nanoparticules restent peu documentés(Charrakh et al .,2019).

1.5.3 Les nanoparticules produites par l'homme de façon intentionnelle (ou nanoparticules manufacturées)

Le développement récent des nanotechnologies, regroupement de l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre, a commencé à élargir les sources de nanoparticules avec la production accrue de nanomatériaux manufacturés, dont des nanoparticules manufacturées (NPM) , en raison des propriétés nouvelles des matériaux ainsi produits, les nanotechnologies connaissent un essor particulièrement important depuis ces dernières années à l'échelle internationale, où l'on observe un investissement grandissant de la part de pays de plus en plus nombreux(Dadi R et al ., 2019).

Des différences existent entre les PUF et NPM, les premières ayant généralement une assez large distribution de taille et une composition chimique complexe alors que les secondes ont souvent une distribution étroite et une composition chimique définie (Dadi R et al., 2019)
Très schématiquement, il existe des NPM métalliques (dioxyde de titane et de zinc, par exemple) et des NPM carbonées. Parmi celles-ci, les nanotubes de carbone occupent une pace importante. Les nanotubes de carbone, découverts en1991 par SumioIijima de la société NEC, possèdent des propriétés physiques (propriétés mécaniques, rigidité et flexibilité, propriétés de conduction électrique et d'émission de champ notamment) ou chimiques (nano containers) qui les rendent particulièrement intéressants(Dadi R et al ., 2019).
Outre des utilisations industrielles, l'emploi des nanotubesde carbone en médecine est une perspective intéressante. Ils pourraient servir par exemple pour le transport et la délivranced'agents médicamenteux à l'intérieur des cellules(Dadi R et al., 2019).
Par exemple,Pantarotto et al ont démontré que des SWCNT peuvent être fonctionnalisés avec des peptides biologiquement actifs, de façon à pouvoir traverser les membranes biologiques et ainsi délivrer le peptide au niveau cytoplasmique ou nucléaire(Dadi R et al ., 2019).
Cependant, les mêmes propriétés qui rendent les nanotubes de carbone très attractifs posent des questions surfeur potentielle toxicité, leurs effets secondaires à long terme ou encore leur biodégradabilité (Dadi R et al ., 2019).

1.6 Biosynthèse de nanoparticules

Synthèse verte du MTNPS par des microorganismes et leur caractérisation Diverses approches ont été utilisées pour la synthèse du MTNP, telles que des méthodes physiques, chimiques et biologiques. Les méthodes physiques et chimiques de synthèse de MtNP

présentent de nombreux inconvénients, notamment l'utilisation d'équipements coûteux, une production de chaleur élevée, une consommation d'énergie élevée et un faible rendement de production. Le principal inconvénient de ces méthodes est l'utilisation de produits chimiques toxiques, qui présentent plusieurs problèmes environnementaux. Cela a généré le besoin d'une option écologique pour la synthèse de MTNPS, dont l'objectif actuel est la synthèse verte de MtNPs à partir de voies biologiques telles que les micro-organismes, les plantes, les enzymes microbiennes, les polysaccharides et les polymères dégradables(Messaoudi 2020).

Les méthodes de synthèse verte sont plus avantageuses que les méthodes physiques et chimiques traditionnelles car elles sont simples, rentables, exemptes de produits chimiques toxiques et nuisibles à l'environnement et, par conséquent, elles ont acquis une importance considérable ces dernières années (Messaoudi 2020)

Les applications innovantes et diverses du MTNPS dans divers domaines, notamment les sciences médicales, les sciences de l'environnement et l'agriculture, la recherche sur les MtNPs et les différentes approches de leur synthèse, se sont rapidement développées ces dernières années (Messaoudi 2020).

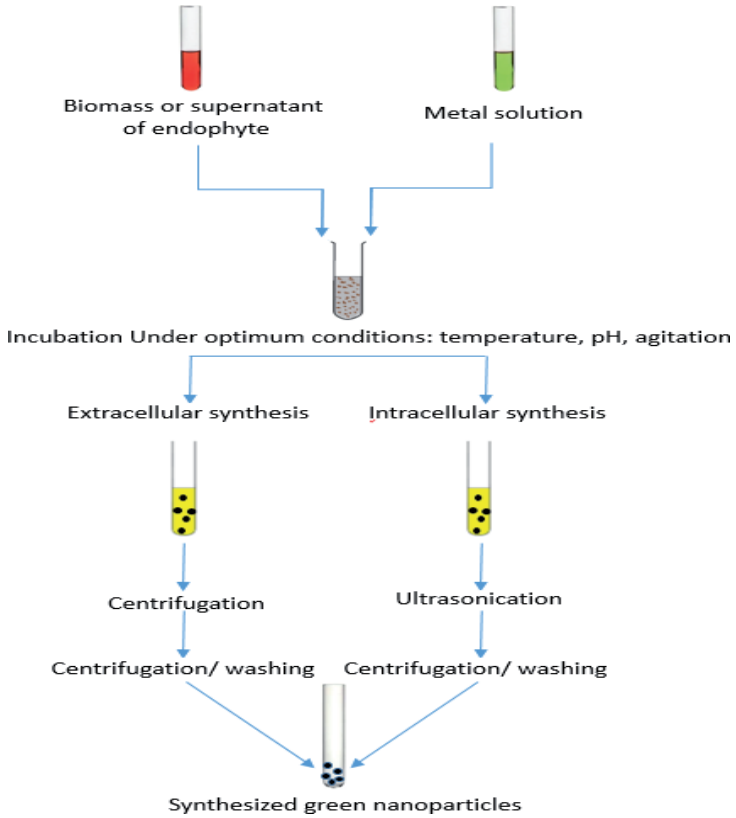


Fig. 1.4 Biosynthèse des nanoparticules utilisant des microorganismes endophytes(Messaoudi 2020)

1.7 Comparaison entre les mesures de la taille de nanoparticules par AFM et MEB

La comparaison entre les mesures de la taille de nanoparticules par AFM et MEB Plusieurs études ont été portées sur la comparaison entre les mesures de la taille de nanoparticules AFM et MEB. on comparé les mesures AFM et MEB Plusieurs études ont été portées sur par de la taille de nanoparticules par AFM et MEB. Par exemple :Teulon et al ont comparé les mesures AFM et MEB réalisées la comparaison entre les mesures sur plusieurs types de nanoparticules (polystyrène, Si02, argent et Ti02).(Christophe et al., 2020)

Leurs résultats montrent que l'écart entre les mesures AFM et MEB est fonction de la composition chimique et de la taille des nanoparticules. Eaton et al ont également comparé les mesures issues de ces deux techniques des particules d'or, de silice et de polystyrène de tailles différentes. La conclusion est sur similaire à la première étude(Christophe et al., 2020)

Delyallée et al ont comparé les mesures AFM et MEB réalisées sur des particules de silice de 60 nm déposées sur un substrat de silicium(Christophe et al., 2020). Ces derniers observent systématique entre les deux mesures avec la mesure MEB supérieure à la mesure AFM (Christophe et al., 2020).

Un ecartCette observation est en contradietion avec les résultats de Eaton et al. pour qui la mesure AFM donnait un résultat supérieur à la mesure MEB pour des particules de silice de taille comparable. Cette contradiction entre les résultats des deux études peut être expliquée par plusieurs points :

• Dans un premier temps, dans l'étude de Delxallés et al la traçabilité des mesures dimensionnelles à l'échelle nanométrique est directement assurée par un processus d'étalonnage mettant en couvre un microscope à force atomique métrologique (MAFM) tandis que Eaton et al expliquent que l'ensemble des techniques de microscopie ont été étalonnées selon des matériaux de référence, mais que ceux-ci ne sont pas tractables (Christophe et al., 2020).

• Dans chacune des études, les mesures AFM et MEB ont été réalisées sur des populations différentes. Par conséquent, l'écart observé entre les résultats issus des deux mesure sures peut potentiellement s'expliquer par le fait que la population imagée par AFM présente une taille moyenne différente de celle de la population imagée par MEB(Christophe et al., 2020).

Les travaux décrits dans cette thèse visent à lever le doute sur cette composante. En 13 couplant la mesure MEB avec la mesure AFM, pour une même population de nanoparticules, il est effet, en lesn couplant la mesure MEB avec la mesure AFM, pour une même population de nanoparticules, il est possible de déterminer les propriétés dimensionnelles d’une particule dans les trois dimensions de l’espace. Afin de mettre en évidence la faisabilité de ce concept,

les mesures doivent être réalisées sur des particules sphériques pour obtenir une mesure AFM égale à la mesure MEB, l'objectif étant, à terme, de mesurer des NPs de forme plus complexe(Christophe et al., 2020)

1.7.1Techniques de mesure des paramètres dimensionnels de nanoparticules

Les techniques de mesures peuvent être définies comme directes ou indirectes. Ainsi, une méthode de mesure directe donne directement accès à la grandeur que l'on souhaite mesurer. lei, ces méthodes permettent d'obtenir directement une information sur les propriétés dimensionnelles des nanoparticules. Une méthode de mesure indirecte s'appuie sur la mesure de différentes grandeurs permettant de déterminer la valeur de celle que l'on souhaite mesurer via une relation mathématique. Le mesurant correspond dans ce cas-là à une propriété de la particule(Balashanmugamet al.,2019).

Dans le cas de la caractérisation de la taille et de la distribution en taille des particules, les techniques d'analyses peuvent être également classées, selon leur fonctionnement, en trois catégories :

- Les méthodes individuelles de comptage permettent d'obtenir une information sur chaque individu dans la population étudiée, celle-ci ne représentant généralement qu'une fraction de l'échantillon. 30
- Les méthodes d'ensemble permettent d'obtenir une infomation globale sur l'ensemble de l'échantillon.
- Les méthodes séparatives permettent d'obtenir une information sur les particules ayant des propriétés similaires dans la population en transformant un mélange en plusieurs composants distincts.

3.1 Les méthodes de mesures indirectes de taille de nanoparticule

Les méthodes de mesures indirectes donnent une information quantitative d'une grandeur physique ou chimique de l'objet ou de la population d'objets observé. Une formule théorique reliant la grandeur physique mesurée avec la taille de l'objet est alors appliquée. Cependant, ces formules sont systématiquement utilisées en faisant une hypothèse forte sur la forme du ou des objets observé(s) donnant ainsi accès à une taille dit « équivalente » correspondant à la taille d'un objet équivalent ayant cette forme. Dans cette section, plusieurs méthodes de mesures indirectes couramment utilisées dans l'industrie, basées sur des principes physiques différents (diffusion photonique, diffusion X, spectrométrie de masse…), seront présentées(Balashanmugamet al.,2019)

1.7.1.1Méthodes de mesures directes de taille de nanoparticules

Dimension. Les méthodes de mesures directes, traçables au mètre SI, permettent de déterminer les paramètres dimensionnels d'une ou plusieurs particules directement sur une image prise par un microscope et analysée par l'intermédiaire d'un programme de traitement d'images, avec ces méthodes, le nombre de particules étudié reste limité, pouvant ainsi introduire un biais sur la mesure si la population imagée n'est pas représentative de l'ensemble de l'échantillon. Il n'existe pas de méthode directe d'ensemble (Balashanmugamet al.,2019).

Dans cette section, trois techniques directes de résolution nanométrique sont présentées : la microscopie à force atomique (AFM), la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microscopie électronique en transmission (MET)(Balashanmugamet al.,2019).

1.7.1.2 Microscopie à Force Atomique (AFM)

La microscopie à force atomique est 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 cst amenée à proximité de forces, pouvant être attractives ou répulsives, apparaissent, 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(Balashanmugamet al.,2019).

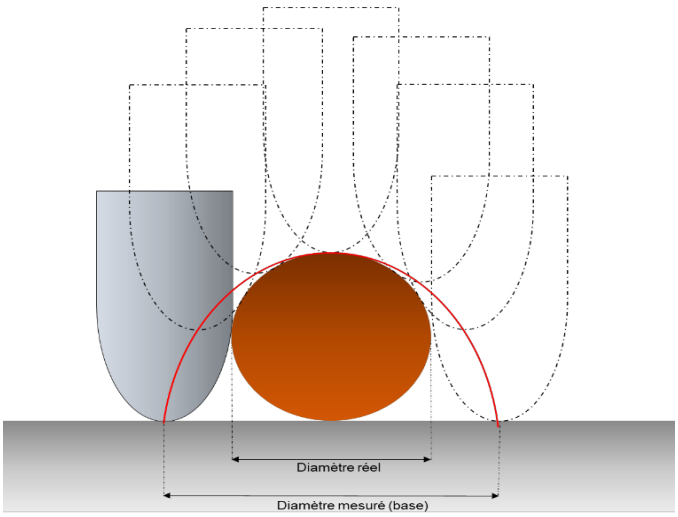


Fig.1.5. Principe de la convolution entre la pointe et l'échantillon pour l'imagerie d'une nanoparticule. Le trait rouge correspond au profil obtenu sur l'image AFM(Balashanmugamet al.,2019).

1.7.1.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

Electronique focalisé « excite » localement l'échantillon et parcours sa surface via un balayage ligne à ligne. L'interaction entre le faisceau incident et les atomes constitutifs de l'échantillon produit plusieurs types de signaux : dectrons secondaires, électrons rétrodiffusés, électrons Auger ou Rayons X. Différents types de détecteurs peuvent alors être utilisés afin de récolter les différents signaux réémis par l'échantillon au cours du balayage.

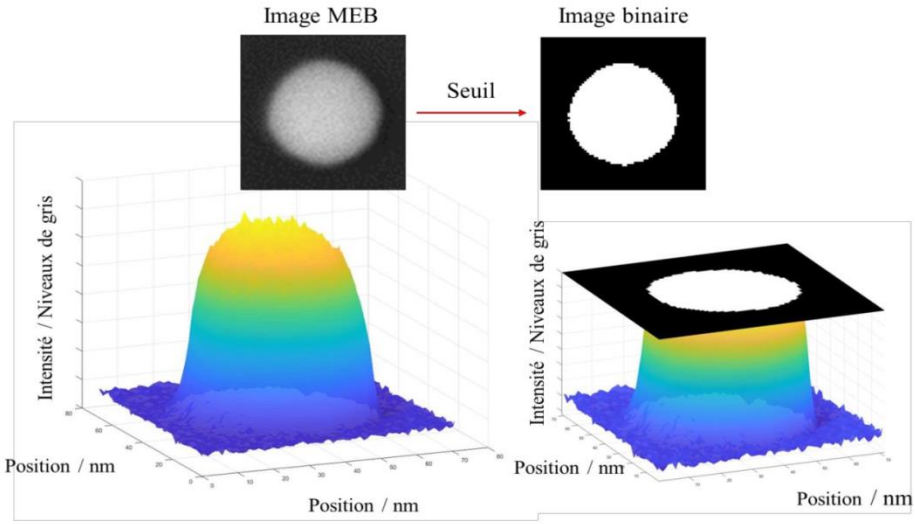


Fig.1.6. Méthode de segmentation des particules par seuillage sur les images MEB.

Un seuil est placé à un niveau défini par l'opérateur. Pour chaque pixel sur l'image MEB, si l'intensité en niveaux de gris est supérieure à la valeur du seuil le pixel est égal à 1 sur l'image binaire, sinon il est égal à 0 (Balashanmugamet al.,2019).

1.8 Biosynthèse des nanoparticules dans différents organisme vivants

Dans le tableau suivant, plusieurs micro-organismes, NPs biosynthétisées et les particularités de la réaction ont été collectés.

Tab.1.1 Biosynthèse des nanoparticules dans différents organisme vivants(*cellule de veille Nano _Bulletin 12- 2013*)

Organisme modèle	NPS biosynthétisées	Particularités
Arbre d'arjun Terminaliaarjuna	Or sphérique	Utilisation d'extraits aqueux de feuilles. Certains tannins sont responsables de la - réduction en NP d'or. Caractérisées à Or sphérique une taille de 20 50 nm. Efficacité des NPs évaluée sur la

		division cellulaire et la germination du pollen. Pas d'effet cytotoxique
La morelle noire (Solanumnigrum), aussi appelée « Tue-chine» ou « Raisin de loup »		Utilisation d'extraits aqueux de feuilles fraîches et sèches, de fruits immatures. Caractérisées à une taille de 50 - 100 nm avec une moyenne à 56,6 nm. Efficacité comme antibactérien et larvicide sur 4, 5 bactéries pathogènes pour les poissons et sur les larves de moustiques.
Plante vivace de l'Asie tropicale	Or de différentes formes Argent sphérique	Utilisation d'une solution de saponine de la plante. Les NPs d'or et d'argent ont été respectivement caractérisées à des tailles de 37,7 à 79,9 nm et de 17,9 à 59,6 nm. Effet antibactérien évalué sur 8 différentes bactéries connues comme S. Aureus, E.Coli, et B. Subtilis. Effets variables,
Plante toxique de l'Inde Cleistanthus	Argent sphérique	Utilisation d'un extrait de feuiles. NPs. sont de taille allant de 20 à 40 nm. Activité antioxydante significative pour piéger les radicaux libres. Toxicité contre les cellules cancéreuses pulmonaires. Des tests sur des souris ont démontré que les NPs ne possèdent pas d'effets toxiques et peuvent être utilisées dans les sciences biomédicales
Banane	Hydroxyapatite sphérique (I'hydroxyapatite est la principale. Dentaire, de la dentine et de l'os)	Utilisation de la pectine de la pelure de banane. Compatibilité pour biomatériaux de remplacement et effets Banane composante minérale de l'émail antibactériens contre S. Aureus et E. Coli évalués
Bacterie marine *stenotrophomonos*	Or de différentes formes Argentde forme diverse	Les NPs d'or et d'argent ont été respectivement caractérisées à des Or de différentes tailles de 10 à 50 nm et de 40 à 60 nm. Bactérie marine formes Implication de protéines de petite taille de la bactérie dans la biosynthèse à Stenotrophomonas Argent de formes diverses déterminer. Potentiel des bactéries marines à synthétiser des NPs démontré.

1.9 Activité anticancéreuse

La littérature actuelle explique que le potentiel anticancéreux des nanoparticules d'argent passe par la génération de ROS, de nombreuses études suggèrent que l'activité antitumorale des nanoparticules d'argent et d'or colloïdales sur les cellules cancéreusespasse par la formation de ROS à l'intérieur de la cellule. La formation accrue de superoxyde et de peroxyde d'hydrogène affecte également la transduction du signal déclenchant l'apoptose. Les radicaux superoxydes contribuent également au découplage de la respiration avec la production d'ATP. Une autre explication possible de la mort des cellules cancéreuses est la libération d'ions d'argent par les nanoparticules d'argent car la concentration d'ions d'argent détermine la mort cellulaire. En distinguant les cellules normales des cellules cancéreuses, De plus, la libération d'ions argent par les AgNPs est également dépendante du pH du milieu (plus le pH est bas, plus la libération d'ions est importante) et il est clairement établi que le pH de la tumeur cellules est légèrement plus acide que le pH des cellules normales. Ainsi, dans les cellules tumorales, où le pH est plus acide, les AgNP libèrent plus d'ions d'argent, suivis de la formation de ROS qui conduit à la mort des cellules cancéreuses. Récemment, les argents ont montré un énorme effet cytotoxique. Contre les cellules leucémiques, le cancer du sein, le carcinome hépatocellulaire, les cellules hépatiques humaines, le cancer du poumon. … Les nanoparticules d'argent peuvent être préparées en creux pour agir spécifiquement sur une tumeur. La chimie de surface des AgNPs peut influencer l'interaction des nanoparticules d'argent avec une cellule tumorale ciblée. La charge de surface doit être négative ou neutre sur les nanoparticules d'argent afin de pouvoir sélectionner le site spécifique de la tumeur. De plus, la modification des nanoparticules d'argent avec un biomarqueur peut aider à cibler ce site tumoral particulier. La taille des nanoparticules est également un facteur très important dans le ciblage du site tumoral (Chauvel 2018).

CHAPITRE 2. MATERIELS & METHODES

CHAPITRE 2. PRODUITS, MATÉRIELS & MÉTHODES

2.1 L'isolement et classification scientifique des souches bactériennes

Les Actinomycètes se situent dans l'ordre des *Actinomycètes*. Certains représentants de ces Actinomycètes, surtout parmi les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de leur morphologie, parfois fongoïde(Lanone et al .,2011). Il s'agit d'un groupe supra générique, rassemblant des bactéries très diverses, dispersées dans la systématique, où l'on rapproche les genres *Nocardia*, *Actinomyces*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*, *Bifidobacterium*… Ces actinomycètes sont importants pour le microbiologiste, ce sont les agents de maladies humaines ou animales (actinomycoses, *nocardioses*, tuberculose, mycétomes…) abondants dans la nature (sols, eaux, composts). Ils jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols, dans la biodégradation des composés organiques voire de polluants (pesticides)(Lanone et al.,2011). Nous aven certaines maladies des végétaux ; ils sont enfin à l'origine de nombreux antibiotiques(Lanone et al .,2011) .Dans cette étude ont été isolées à partir de différents échantillons du sol.dans cette étude ont été isolées à partir du vagin Nous avent bien culture dans milieu ISP2 et soja , , incubation pendent 24 h 37C° pour cette travail

Tab 2.1 classification scientifique d'*Actinomycètes*

Suspension	*Actinomycètes*
Règne	*Bactérie*
Division	*Actinomycètes*
Ordre	*Actinomycètes*

Le *Streptocoque B*est une bactérie qui peut se trouver dans le vagin de certaines femmes sans provoquer de symptômes. Cette bactérie est cependant dangereuse pour la femme enceinte et son bébé, chez qui elle est responsable d'infections graves à la suite de l'accouchement. Elle est donc recherchée en fin de grossesse Sont définis comme des cocci à Gram positif disposés, le plus souvent en chaînettes qui ont un métabolisme anaérobie, et peuvent être cultivées in vitro en atmosphère aérobie(Lanone et al .,2011), Nous avent bien culture dans milieu ISP2 , incubation pendent 24 h 30C° pour cette travail

Tab 2.2 Classification scientifique de***Streptocoque B***

Division	*Firmicutes*
Classe	*Bacilli*
Ordre	*Lactobacillales*
Famille	*Streptococcaceae*

2.2 Souche bactériennes pour le test antimicrobien

Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, Staphylocoque, Candida, Bacillus.

2.3 Produits chimiques. Argent poudre, Violé Christo, NaCl.

2.3.1Matériels

Autoclave, bain marie, balance électrique, étuve, réfrigérateur, congélateur, microscope optique, pH-mètre, plaque chauffante, agitateur rotatif, shaker, spectrophotomètre infrarouge, anses de platine, papieraluminium, pince en platine, tube eppendorf ,spatule, bec bunsen , micropipette, portoir pour tube, les micro plaque 96.

2.3.2Verreries et consommables

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

2.4 Milieux de culture

2.4.1 Composition de L'ISP2

Tab 2.4.1 Composition de L'ISP2, (International Streptomyces Project 2)

D-glucose	2 g
Mannito	l10 g
L'agar	10g
eau distillée	0,800l
NACL	.3%

2.4.2Muller Hinton

Tab 2.5 Composition de Muller Hinton

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

2.4.3 Composition de Soja

Tab 2.6 Composition de Soga

Peptone papaïnique de soja	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	15,0g
Eau distillée	1l
pH	7,3

2.4.4BHIB

Tab 2.7 Composition de Braine Heart InfusionBrouth

Peptone	10,0 g
infusion de cervelle de veau	12,5g
infusion de crue de bœuf	5,0 g
glucose	2,0 g
chlorure de sodium	5,0 g
hydrogénophosphate de sodium	2,5 g
pH	7,4

2.6 Méthode

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

2.6.1 Stérilisation des milieux de culture

La stérilisation des milieux de culture s'effectue à 120°C dans un autoclave.

Les fioles d'erlenmeyer de 500 ou de 250 ml et contenant respectivement 100 ou 50 ml de milieu, sont stérilisées pendant 20 min à 120°C (sous 1 bar).

2.6.2 Méthode de synthèse de nano argent par isolat d'*Actinomycète*

Suivant la méthode de *Li et al. (2011)* pour bio synthétiser des nanoparticules, l'isolat a ensuite été cultivé dans deux milieux liquides une avec 100g de ISP2 et outre avec milieu SOJA après incubation dans des conditions de croissance pour les deux à 37 C, pH 7,2 et 220 rpm pendant 72 h. La séparation de la biomasse et du filtrat cellulaire (CF) a été effectuée par centrifugation à 4 °C, .6000rpm de manière à 20 minutes,

Avec centrifugeuse obtenons des biomasses et de surnageant séparés dans deux niveaux deux flacon Pour la bio réduction, AgNO3 (Qualités 99,8%) a été ajouté chez les deux milieux.

- *surnageant* :ajoutent 1 g d'$AgNO_3$
- *biomasse* : 10ml l'eau distillé stérile et 1 mol d'$AgNO_3$

2.6.3 Méthode de synthèse de nano argent par isolat du *streptocoque B*

Selon la méthode de Li et al. (2011) pour biosynthétiser des nanoparticules, l'isolat a ensuite été cultivé en milieu liquide ISP-2, dans des conditions de croissance à 30 C, pH 7,2 et 220 rpm pendant 72 h. La séparation de la biomasse et du filtrat cellulaire (CF) a été réalisée par centrifugation à 4°C, 10 000 rpm pendant 10 min. Pour la bio réduction, $AgNO_3$ (Qualigens 99,8%) a été ajouté

Après 72 heures, avec centrifugation, nous obtenons la biomasse et le surnageant séparés dans deux flacons à deux niveaux Pour la bioréduction, $AgNO_3$ (Qualigens 99,8%) a été ajouté dans les deux milieux

- Surnageant :ajouter 1g d'$AgNO_3$
- Biomasse :ajouter 1g d'$AgNO_3$

2.6.4Biosynthèse des AgNPs

La production de nanopatiques d'argent 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.

La réaction : $AgNo_3 = AG^0 = NpsAg$

(NpsAg) Au niveau de la biomasse : réactions extracellulaires entre les bactéries et le produit chimique $AgNO_3$.

Les AgNPs ont été synthétisés selon la méthode avec des modifications.



Fig.2.1. Echantillon avent virage de couleur

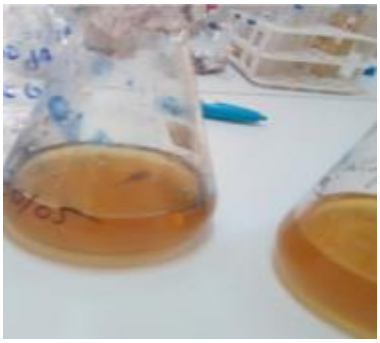


Fig.2.2. Echantillon avec virage de couleur

2.6.5 Biosynthèse de nanoparticules par microorganismes

En général, les micro-organismes qui vivent dans des habitats riches en métaux sont très résistants à ces métaux en raison de leur absorption et de leur chélation par les protéines intracellulaires et extracellulaires (Charrakh et al., 2019).

Par conséquent, cette méthode, qui imite le processus naturel de bio-minéralisation, pourrait être une approche favorable pour la synthèse des MtNPs .

La figure 2.3 montre une illustration schématique des mécanismes intracellulaires et extracellulaires de la biosynthèse des MtNPs(Charrakh et al., 2019).

La biosynthèse intracellulaire implique des systèmes de transport uniques dans les micro-organismes dans lesquels la paroi cellulaire joue un rôle important en raison de sa charge négative : des ions métalliques chargés positivement sont déposés dans les parois cellulaires chargées négativement par le biais d'interactions électrostatiques (Charrakh et al., 2019).

Après le transport dans les cellules du micro-organisme, les ions sont réduits à l'aide de réactions métaboliques méditées par des enzymes telles que la nitrate réductase pour former des MtNPs. Les

MtNPs accumulés dans l'espace périplasmique peuvent ensuite être passés à travers la paroi cellulaire (Charrakh et al., 2019).

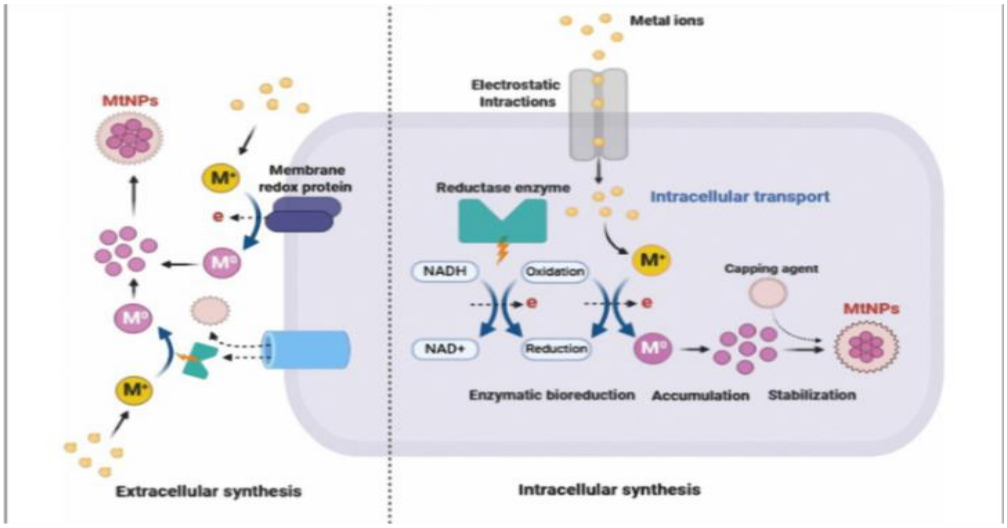


Fig.2.3. Biosynthèse de nanoparticules par microorganismes(Charrakh et al., 2019).

2.6.6 Définition du biofilm

Un biofilm est une communauté de différents micro-organismes aérobies ou anaérobies (bactéries, champignons, algues, protozoaires, etc.) qui se caractérisent par des cellules fixées les unes aux autres dans toutes les positions d'orientation de la surface, dans un milieu où l'humidité est au-dessus du point de saturation ou bien dans un milieu aquatique. (www.TSBcentreFr.COMconsulte le 22-4-2021). Les micro-organismes sécrètent une matrice complexe de substances exopolymèriques appelés classiquement EPS, sécrétion dans laquelle serait impliquée le système de Quorum Sensingt(www.TSBcentreFr.COMconsulte le 22-4-2021).

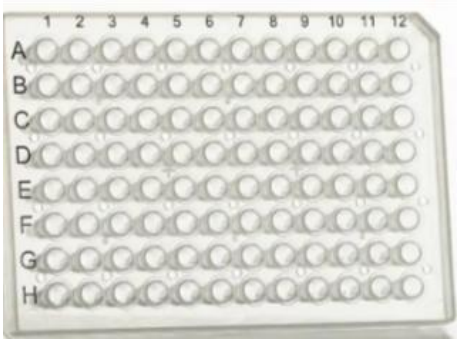


Fig. 2.4. Les microplaque 96

2.7 Biofilm avec *Klebsiella*

Klebsiella est un genre de bactéries Gram-négatives, oxydase-négatives, très résistance (voir la figure 2.6)en forme de bâtonnet avec une capsule à base de polysaccharide bien visible.

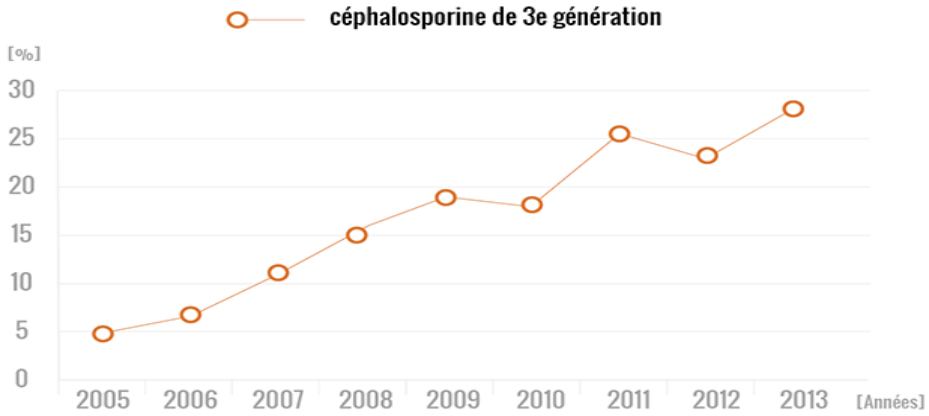


Fig.2.5. Evaluation de résistance de *Klebsiella* en France (www.TSBcentreFr.COMconsulte le 22-4-2021)

Dans Microplaque 96 stérile Appliquer 0,150 ml de milieu de culture liquide BHIB contenant la souche bactérienne *Klebsiella* et utiliser Voltax à plusieurs reprises

Avec une pipetteélectronique prendre 0,150ml du milieu préparé est placé dans une microplaque 96 aux rang 1 zone A , et en va répéter sa avec tous les zone et les rangs 1, 3, 6, 8, 9 et 12. Le but de cette disposition est d'obtenir une vision claire des résultats, et le quantité minimale de l'échantillon. Ceci est d'obtenir un biofilm après 24 heures d' incubation après incubation il y 'a l'étapede lavage avec l'eau distillée stérile doucement, afin d'éviter un effet mécanique violent sur l'échantillon, laisser sécher à l'envers avec l'ouverture vers le bas où se trouve le papier absorbant pour absorber la quantité d'eau restante après plusieurs minutes pour sécher sur biofilm préparé par pipette Électronique règles 0,100 ml de BHIB sur toutes les zones préalablement appliquées sur la microplaque puis Au niveau du premier rang A seulement on rajoute 0.08ml de BHIB puis sur le même rang Ajouter 0,02ml de les nanoparticules de Ag de *Streptocoque B* à l'aide du même pipette électronique mélanger le tout et prélever 0,150 ml et transférer dans l'espace suivant

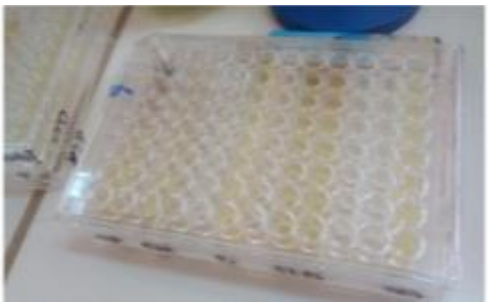


Fig 2.6. Les microplaques avecpréparation dele biofilm

. Mélanger et transférer dans l'espace suivant de la même rangée jusqu'à la fin.
Jeter le dernier 0,150 ml, incubation 37°C à24heures l'étape de violet Christo après incubation Lavage à l'eau distillée stérile délicatement Laisser sécher sur papier absorbant Ajouter 0.200ml de Violet Christo Laisser reposer 20m en atmosphère laboratoire puis vider délicatement les micro plaque et laisser sécher et remarquer la couleur.

Ce étapes va répéter avec les nanoparticules d' *Actinomycètes*de soja et*Actinomycètes*de ISP2 a autre microplaque

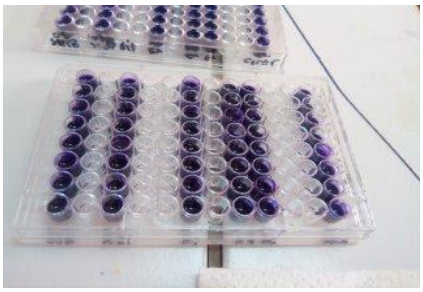


Fig.2.7. Application violet Christo

2.8 Analyse Antimicrobiennes

2.8.1 Préparation des milieux de les analyse antimicrobiennes

En boîte Pétré verser 15 à 25 ml de milieu Muller Hinton et laisser solidifier quelques minutes. Par écovionage prélevé dans un tube à suspension bactérienne *Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, staphylocoque, Candida, Bacillus* étalonnage avec méthode quatre cadre est effectué.

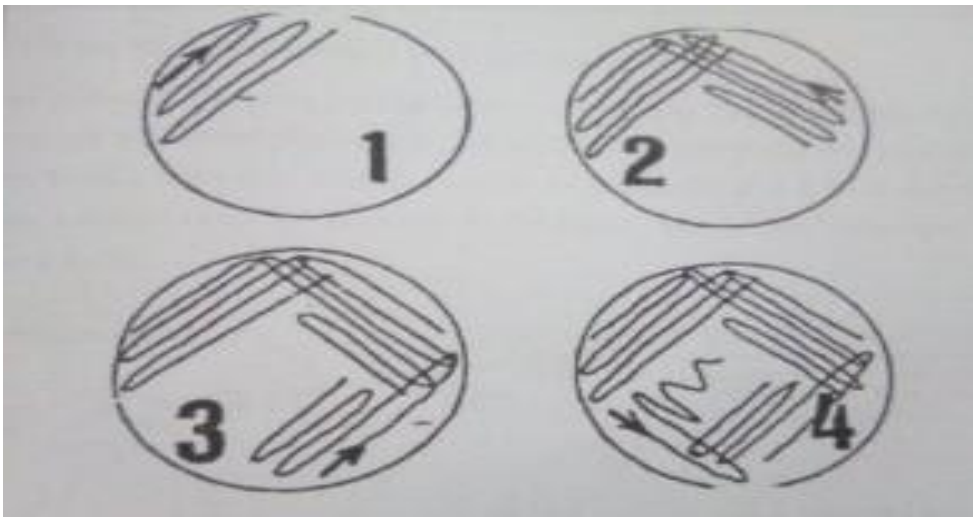


Fig.2.8. Méthode quetre cadre (Ouared et al., 2020)

2.8.2 L'ensemencement

Parles micropipettes ou pipettes Pasteur Faire un trou qui n'atteint pas le fond et mettre 0.020ml du surnageant du *Actinomycétes* de ISP2 et faire un autre trou comme le premier et mettre le surnageant 0.020ml du *Actinomycétes* de Soga. Un autre trou inséré 0.020ml du surnageant de *Streptocoque B*boîte de pétri cette étapes répéter avec autre boit

2.8.3 L incubation

L'incubation a été faite avec de la paraffine *Codida* et *Bacillus* a 30°C pendant 24 heure.
Prédominance et *Escherichia* coli et *Micrococcus*et *Klupsilla* et *staphylocoque* à température 24h 37°C.elle a été répétée avec les biomasses des *Actinomycétes* de ISP2, *Actinomycétes* de Soja, *Streptocoque B* ISP2

2.9 Analyse par spectrophotométrie UV-visible

Le spectrophotomètre que nous avons utilisé est un appareil qui permet de mesurer directement les densités optiques. Les analyses sont effectuées sur un Spectrophotomètre. Les longueurs d'ondes maximales sont obtenues directement par balayage automatique entre 300 et 800 nano mater.
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 lacourbe
La spectroscopie ultraviolet-visible ou spectrométrie ultraviolet-visible est une technique de spectroscopie mettant en jeu les photons dont les longueurs d'onde sont dans le domaine de

l'ultraviolet (100 nm – 400 nm), du visible (400 nm – 750 nm) ou du proche infrarouge (750 nm – 1 400 nm).

Soumis à un rayonnement dans cette gamme de longueurs d'onde, les molécules, les ions ou les complexes sont susceptibles de subir une ou plusieurs transition électronique(s).

Cette spectroscopie fait partie des méthodes de spectroscopie électronique. Les substrats analysés sont le plus souvent en solution, mais peuvent également être en phase gazeuse et plus rarement à l'état solide

2.11 Protocole

Considérant que la concentration nano est inconnue, car la quantité de bactéries est fondamentalement donc plusieurs niveaux de dilution doivent être essayé la centrifugeuse plusieurs foisà une vitesse de 20000 rpm donc plusieurs niveaux de dilution doivent être essayés. Divisez l'échantillon de les nanoparticules de *Streptocoque B*uniquement, car la quantité de nanoparticules produites par *Actinomycétes* de ISP2 et *Actinomycétes* Soja est faible, ce qui ne permet pas de terminer l'analyse UV. L'échantillon est divisé en plusieurs tubes qui sont de petite taille destinée aux centrifugeuses à grande vitesse, comme dans l'expérience, en tenant compte de la distance de milieu léger et stérile.



Fig. 2.9. Tube Eppandorf

Pour dilution à l'aide de pipetteélectroniqueréglé et d'eau distillée stérile placée dans une centrifugeuse à 20000rpm pendant 20 minutes, plusieurs fois, en séparant le surnageant à chaque fois et en augmentant à chaque fois une quantité déterminée d'eau distillée stérile.



Fig. 2.10. Séparation avec centrifugeuse

Avec mesure sur le niveau UV pour obtenir une lecture complète Et la mesure est effectuée plusieurs fois dans des agents stériles faiblement éclairés sur l'échantillon.



Fig.2.11. Mesure dans des conditions de faible luminosité

Après avoir essayé plus d'une fois, les résultats sont enregistrés et appariés pour avoir une vision claire de l'avancement du processus, dans le but de déterminer l'orientation appropriée et à chaque fois la suppression de la surnageant Et suffit de biome Et dilution de suivi par des standards stériles.

2.12 Analyse spectroscopique par l'infrarouge

2.12.1 principe

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.

2.12.2 Préparation d'échantillons solide

Un échantillon solideNps AG de *Streptocoque B* est broyé avec du bromure de potassium (KBr), qui est transparent dans l'IR, et pressé sous forme de pastille, ou préparé en fine lame et placé entre deux fenêtres KBr, tandis que les liquides sont mesurés directement ou dilués avec un solvant transparent dans l'IR.



Fig. 2.12. NaCl

Si un échantillon est assez fin comme par exemple un film polymère, un revêtement sur une surface métallique ou une section de tissu biologique, suffisamment de lumière IR peut passer à travers un échantillon pour être analysé directement sans dilution dans du NaCl.



Fig.2.13. Verser l'échantillon dans l'engrenage



Fig. 2.14. Fixation et compression de l'échantillon



Fig. 2.15. Echantillons de l'infrarouge



Fig.2.16. Pied presseur



Fig. 2.17. Appareille d'infrarouge

Une presse hydrolyque est utilisée pour former la pastille. La figure ci-contre montre l'outillage (cliquer dessus pour un agrandissement). L'échantillon est placé entre deux pastilles métalliques tenues dans le cylindre. La connexion latérale sert à évacuer l'air, ce qui est nécessaire pour éviter l'inclusion de bulles qui provoqueraient la cristallisation du NaCl.

- Piston
- Pastilles métalliques
- Cylindre
- Echantillon de NaCl
- Branchement du vide (http://www.edu.upmc.fr/chimie/chiminorga/TechExp/IR/IR.html consulte le 1-7-2021)

CHAPITRE 3. RESULTATS & DISCUSSION

CHAPITRE 3. RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1 Analyse spectroscopique par infrarouge des nanoparticules

Le décalage du nombre d'ondes ou les changements d'intensité de pic explique les types de groupes fonctionnels impliqués dans les mécanismes de liaison. L'extrait de spectre à 2,5 g de dose d'E. spiralis a montré les bandes d'absorption à 3 399, 2 932, 1 614, 1 522, 1 445, 1 381, 1 258, 1 072 et 530 cm-1, comme le montre la figure 1. Selon Pavia et al. (2009), les pics allant de 3 200 à 3 600 cm−1 sont liés aux vibrations d'étirement O-H (hydroxyle) et -NH_2 (amine) dans l'extrait d'E. spiralis. Le pic à 2 932 cm-1 peut être attribué à l'étirement C-H. Le pic à 1 614 cm-1 représente la flexion N-H du composé glycoside dans l'extrait d'E. spiralis. Le pic à 1522 cm-1 correspond au cycle aromatique de la structure terpénoïde-saponine.

Le groupe carboxylate peut être confirmé par les 1 445 cm-1. Le pic à 1381 cm-1 correspond à la courbure C-H des groupes aldéhyde de la structure du glucose dans l'extrait d'E. spiralis. Le pic à 1 258 cm-1 correspond à l'étirement C-C(=O)-0 de l'ester (Silverstein et al., 1991).

Le pic à 1 072 cm-1 correspond à l'étirement C-O. Le pic à 530 cm-1 est lié à la liaison de l'oxygène des groupes hydroxyle.

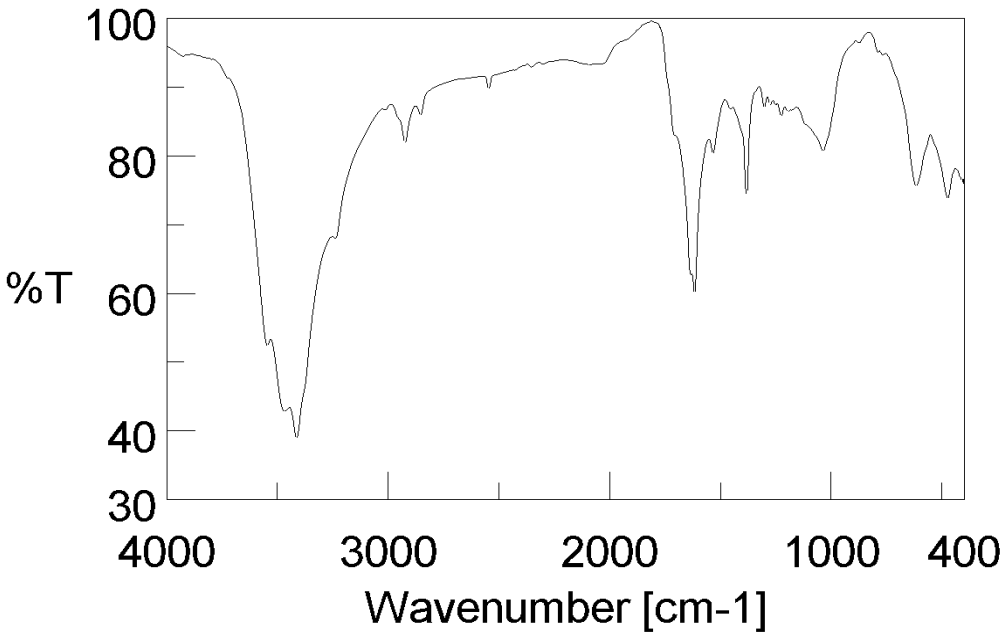


Fig.3.1. Analyse spectroscopique par IR des nanoparticules.

3.2 Analyse spectroscopique par UV-visible des nanoparticules

La spectroscopie UV-vis est une technique très utile et fiable pour la caractérisation primaire de nanoparticules synthétisées qui sont également utilisées pour surveiller la synthèse et la stabilité des AgNPs. Les AgNPs ont des propriétés optiques uniques qui les font interagir fortement avec des longueurs d'onde spécifiques de la lumière. De plus, la spectroscopie UV-vis est rapide, facile, simple, sensible, sélective pour différents types de NP, n'a besoin que d'une courte période pour la mesure, et enfin un étalonnage n'est pas nécessaire pour la caractérisation des particules de suspensions colloïdales se produisant en raison de l'oscillation collective de électrons de nanoparticules d'argent en résonance avec l'onde lumineuse. L'absorption des AgNPs dépend de la taille des particules, du milieu diélectrique et de l'environnement chimique. Observation de ce pic. La stabilité des AgNPs préparés à partir de méthodes a été observée pendant plus de 6 jours plus que 100 fois avec condition stérile, et un pic à la même longueur d'onde en utilisant Une spectroscopie UV-vis a été observée (Xi-Feng Zhang et al 2016). Lorsqu'une très petite quantité est utilisée, un pic apparaît à longredound265 absorption 1 comme le montre la figure 3.2. D'après la figure 3.2, Il a été trois pics caractéristiques, dont deux sont très nets en d onde plus longue 265 et 249. Le troisième pic est apparu en 349, l'absorption maximale 3, et le troisième pic a donné une absorption à 1 selon le changement de couleur que l'on obtenu précédemment, c'est à dire jaune clair avec la certitude qu'il est possible d'attendre pour obtenir sur le marron foncé, mais par souci de temps et la situation exceptionnelle due à la situation actuelle, il a donc été arrêté au jaune. Ces résultats confirment, selon à l'absorption montrée, la présence d'$AgNO_3$.

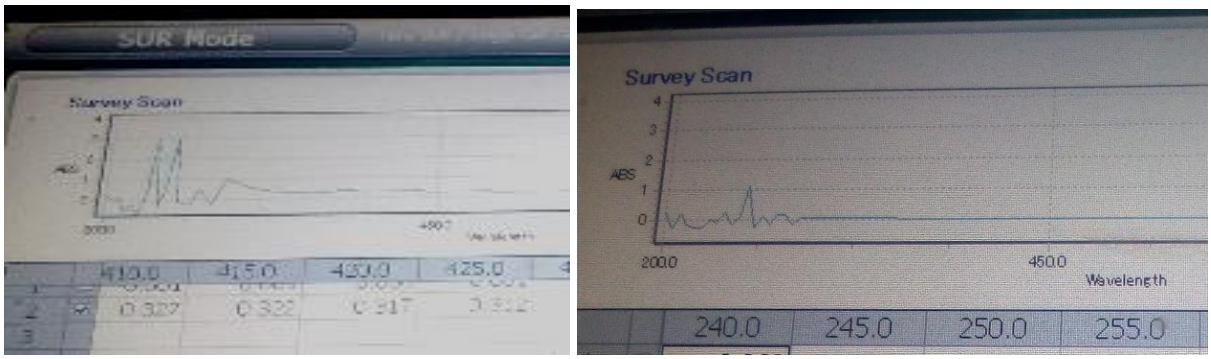


Fig. 3.2. Résultat de UV-vis

3.3 Effet antibactérien des AgNPs

L'activité antibactérienne des AgNPs synthétisés contre les agents pathogènes humains testés a été évaluée sur la base de la zone d'inhibiteurs, il a été observé que les AgNPs biogènes présentaient une activité antibactérienne rela. Cette activité antibactérienne relativement élevée peut être attribuée à la taille et à la grande surface spécifique des AgNPs qui leur ont permis d'atteindre facilement le contenu nucléaire des bactéries. Pour les souches bactériennes sélectionnées, aucune zone d'inhibition n'a été observée pour la solution d'AgNO3 ainsi que l'extrait.

Cela symbolise que le potentiel antibactérien de l'extrait et de l'$AgNO_3$ à leurs concentrations sélectionnées n'a montré aucune zone d'inhibition. La libération irrégulière de concentrations insuffisantes d'ions argent à partir d'$AgNO_3$ peut être la raison de son efficacité limitée en tant qu'agents antimicrobiens, qui peut être améliorée à l'aide d'AgNPs car leur grande surface les rend très réactifs. Il est suggéré que les AgNPs peuvent se fixer à la surface de la membrane cellulaire bactérienne et libérer des ions d'argent qui peuvent perturber la perméabilité de la membrane cellulaire et la réplication de l'ADN bactérien. De plus, les nanoparticules possèdent une surface extrêmement grande qui offre un meilleur contact et une meilleure interaction avec les cellules bactériennes. Sans aucun doute, l'activité bactéricide est due aux cations d'argent libérés par les AgNPs liés à des changements dans la structure membranaire des bactéries, qui conduisent à une augmentation de la perméabilité membranaire des bactéries et finalement à un destructeur de cellules.

Il ressort également des données que l'augmentation de la concentration des AgNPs biogènes a conduit à une augmentation significative de l'activité antibactérienne. Ont rapporté les

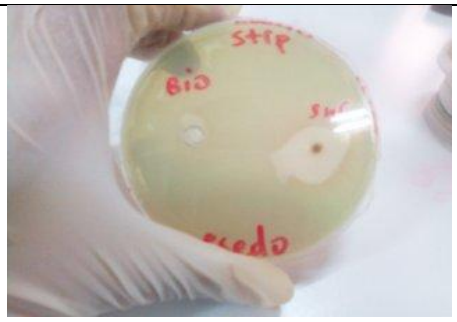
propriétés antibactériennes des AgNPs produites par streptocoque et *Actinomycètes* de ISP2et 50% avec *Actinomycètes* de SOGA

3.3.1 Biomasse et surnagent de *streptocoque b*

Les résultats de biomasse et surnagent de s*treptocoque* sont dans le tableau 3.1.

Tab.3.1. Biomasse et surnagent de *streptocoque b*

Bactérie	**Zone**		**Photo**
Bacilles	**Biomasse**	**Surnagent**	
	14,5	11,6	
Micrococuce	**1,84**	**13,5**	
Staphylococcie	**15,7**	**14,8**	

Klepsiella	**8,9**	**9**	
Psodomonace	**9,5**	**12,6**	
Candida	**8,1**	**24**	

3.3.1 Biomasse d'actinomycètes de ISP2

Les résultats de biomasse et surnagent d'actinomycète de ISP2 sont dans le tableau 3.2

Tab.3.2. Biomasse d'*actinomycètes* de ISP2

Bactérie	**Zone**	**Photo**
Bacilles	9	
Micrococuce	12,5	
Staphylococcie	13,3	
Klepsiella	8,90	

Psodomonace	10,8	
E.coli	12,1	

3.3.3 Surnagent actinomycètes de ISP2

Les résultats de biomasse et surnagent d'actinomycète de ISP2 sont dans le tableau 3.3.

Tab.3.3. Surnagent de l'*actinomycètes* de ISP2

Bactérie	**Zone**	**Photo**
Bacilles	11,7	
Micrococuce	**14**	

Staphylococcie	**14,8**	
Klepsiella	**9,5**	
Psodomonace	**18,5**	

3.3.4 Biomasse d'Actinomycètes de Soga

Concernant l'effet de biomasse sur l'a*ctinomycètes* de soga a été négative.

3.3.5 Surnagent Actinomycètes de Soga

Les résultats de biomasse et surnagent d'actinomycète de soga sont résumé dans le tableau 3.4.

Tab.3.4. Surnagent a*ctinomycètes* de Soga

Bactérie	Zone	Photo
Bacilles	8	
Micrococque	7	
Staphylococcie	8	
Klepsiella	11	

Psodomonace	8	
E.coli	11	
Candida	11	

3.4 Activité antibactérienne des AgNPs

Les AgNP semblent être des agents antibactériens alternatifs aux antibiotiques et ont la capacité de surmonter la résistance bactérienne aux antibiotiques.

Par conséquent, il est nécessaire de développer des AgNPs en tant qu'agents antibactériens. (CHAUVEL, 2018).

Parmi les nombreux nanomatériaux prometteurs, les AgNPs semblent être des agents antibactériens potentiels en raison de leurs grands rapports surface-volume et de leur structure de surface cristallographique. L'article fondateur rapporté par Sondi et Salopek-Sondi a démontré l'activité antimicrobienne des AgNPs contre Escherichia coli, dans laquelle les cellules d'E. coli traitées avec des AgNPs ont montré l'accumulation d'AgNPs dans la paroi

cellulaire et la formation de « pits » dans la cellule bactérienne. Parois, conduisant finalement à la mort cellulaire. Dans la même souche d'E. coli, des particules plus petites avec un rapport surface/volume plus important ont montré une activité antibactérienne plus efficace que les particules plus grosses. De plus, l'activité antibactérienne des AgNPs dépend non seulement de la taille, mais aussi de la forme, montrant une activité antimicrobienne et bactéricide élevée contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, y compris les souches hautement multirésistantes telles que Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline. Comme mentionné précédemment, non seulement la taille est importante pour déterminer l'efficacité, mais aussi la forme, car les AgNP subissent une interaction dépendante de la forme avec l'organisme Gram-négatif E. coli. En outre, une étude détaillée a été menée pour étudier l'efficacité des effets antimicrobiens des AgNPs contre la levure, E. coli et Staphylococcus aureus. Les résultats suggèrent qu'à de faibles concentrations d'AgNPs, une inhibition complète de la croissance a été observée chez la levure et E. coli, alors qu'un effet modéré a été observé chez S. aureus ; l'efficacité de divers antibiotiques, tels que la pénicilline G, l'amoxicilline, l'érythromycine, la clindamycine et la vancomycine contre Staphylococcus aureus et E. coli a été augmentée en présence d'Ag-NPs(CHAUVEL,2018).

AgNPs produites biologiquement en utilisant des surnageants de culture de Staphylocoque. Les mécanismes de la mort cellulaire induite par l'AgNP ont été observés chez E. coli par la fuite de sucres réducteurs et de protéines. De plus, les AgNPs sont capables de détruire la perméabilité des membranes bactériennes via la génération de nombreuses et lacunes, indiquant que les AgNPs (CHAUVEL,2018). Le résultat est mesuré par Pied mètre numérique.



Fig.3.3. Pied mètre numérique.

3.5 Résultat du test de l'élimination de la biofilm

Cette expérience a été menée au niveau de la microplaque, où un biofilm a été produit à partir de la bactérie Klebsiella, qui a été incubée pendant des heures 24. Les résultats utilisant 0,02 ml de nanoparticules d'argent ont montré clairement l'élimination du biofilm des zones A, B et C à l'œil nu observé. Sous la lumière, ce qui confirme l'efficacité des nanoparticules d'argent. L'objectif est de surveiller la capacité des nanoparticules à éliminer le biofilm, et ne détermine pas une concentration inférieure à celle requise pour l'élimination.**Tableau 3.1** montrent les résultats d'une expérience d'élimination du biofilm chez *Streptocoque, Actinomycètes* de ISP2, Actinomycètes de SOGA**Figure**.**3.5** et **Figure. 3.6** Comparaissent entre le témoin et l'effet des nanoparticules

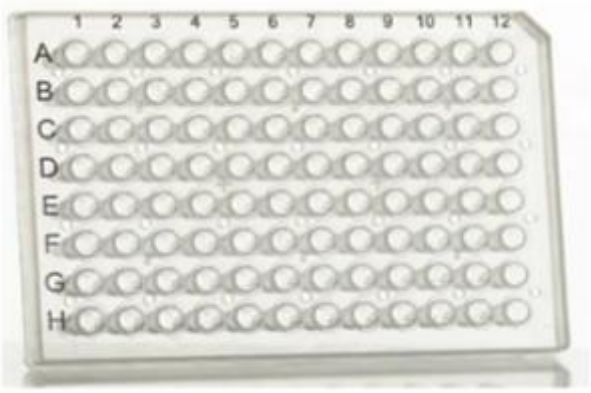


Fig3.4 Une microplaque avec La numérotation et les lettres sont claires (Prescott et al ., 2015)

Tab 3.1 Les resultat de leffet de NpsAg de *Streptocoque b*,*Actinomycètes* de ISP2,*Actinomycètes* de SOGA

anoparticule	**Biomasse**	**Surnagent**
Streptocoque b		
***Actinomycètes* de ISP2**		
***Actinomycètes* de SOGA**		

3.6. Comparaissent entre le témoin et l'effet des nanoparticules

Les **figure**.**3.5 et figure. 3.6** Elimination de la biofilm dans la zone A, B, C.



Fig.3.5 Effet de les NpsA

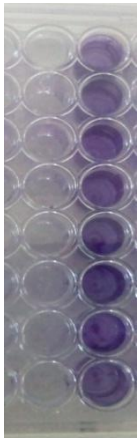


Fig. 3.6 Témoin

3.6Mécanisme d'action " Anti quorum sensing» des nanoparticules d'argent

Un autre mécanisme est à mettre en avant concernant les nanoparticules d'argent : l'«anti quorum sensingactivity ». Les nanoparticules d'argent inhient la production du AHLs. En l'absence de AHLs, l'expression des gènes menant aux facteurs de virulence est inhibée.

Ces mécanismes n'étant pas encore précisément compris, des études ultérieures sont donc en attente pour cerner le fonctionnement exact des activités que peuvent avoir les nanoparticules d'argent sur les différents organismes.

Le Quorum sensing (QR) est un mode de communication intercellulaire qui fonctionne par production et réception de signaux émis par les molécules. Ce procédé est utilisé par les bactéries pour comprendre les changements opérés dans leur environnement et de s'adapter en conséquence dans l'espace et dans le temps. Les composés qui inhibent ou interfèrent avec le QS sont vus actuellement comme des nouvelles classes d'agent antimicrobien et anti biofilm. Surtout que le développement de résistance anti-QS est minime car ces agents visent uniquement les mécanismes de virulence et non pas la croissance, alors que les antibiotiques conventionnels empêchent la division des cellules bactériennes ou la tuent, augmentant la pression sélective vers des bactéries plus résistantes aux antibiotiques. Les molécules de QS permettent de passer au stade pathogène pour la plupart des bactéries et sont donc importantes pour la mise en place de l'infection et donc la formation de biofilm(CHAUVEL,2018).

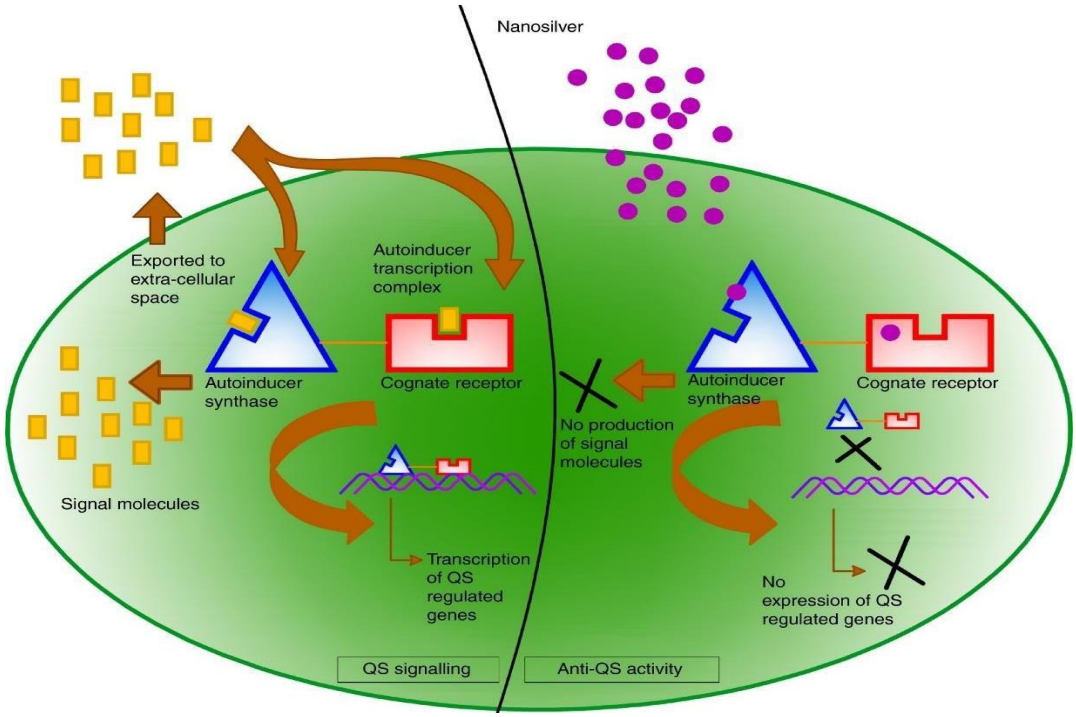


Fig.3.7. Mécanisme d'action "*Antiquorumsensing*" des nanoparticules d'argent

Récemment, les nanoparticules d'argent ont prouvé avoir un effet potentiel anti-QS. Donc la nanoparticule élimine biofilm de la zone A, B, C cette résultat est observé avec les yeux.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Les nanoparticules d'argent ont donc un bel avenir devant elles, sont très prometteuses et vont permettre des avancées notables dans le milieu médical, avec de nouveaux effets sans cesse découverts. Il ne faut cependant pas de qu'elles ont-elles aussi une certaine toxicité et qu'il va falloir en mesurer leur usage dans le futur. Le nombre important d'études le concernant vont permettre dans les 5 à 10 prochaines années de mieux cerner ces AgNPs de plus en plus présentes dans notre quotidien et donc d'optimiser leur utilisation, que ce soit dans le milieu médical ou dans bien d'autres secteurs (Cauvel, 2018). Cette étude a été réalisée sans exposition à aucune intoxication ni aucun accident, grâce à l'adoption de mesures préventives et à la prise de normes d'hygiène par rapport aux résultats atteints, ce qui est le début de nombreux résultats futurs.

PERSPECTIVES

La peur qui apparaît à cette époque et la restriction dans l'utilisation des nanotechnologies, en particulier la nanobiologie, disparaîtront, car les années à venir nous permettront d'obtenir plus de facilités et de précision.

- L'intervention de la nanobiologie dans l'industrie pharmaceutique, et cela se manifeste dans sa capacité à vaincre les maladies en tant que traitement complémentaire, dans les années à venir, où elle pourra être utilisée sans crainte remplacera de nombreux noms médicaux
- Nano se distingue par sa capacité à donner des résultats impressionnants en moins de temps, et cela nécessite étude et équipement, et c'est ce que l'étude a apporté malgré le manque d'outils
- En permettant aux laboratoires universitaires de disposer de ressources et d'outils de plus en plus précis, cela ouvre des perspectives, des défis et des résultats impressionnants dans le futur.
- L'utilisation de nanobots et de nanolabs à l'avenir donne des résultats rapides et immédiats

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Abdle Basite** Liver Nanotechnologie la science en est encore a ses balbutiements syrie damas **2006/ 1**
2. **Amine MEZNI** Synthèse et Caractérisation de Nanoparticules Métalliques Vers la NanomédecireNanophysique Présentée et soutenue par : THÈSE DOCTORAT Le 21 Novembre **2013** DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE
3. **Alaa H. Al-Charrakh2, Nawfal H. Al-Dujaili3ArticleDouaa Hamza Khair-Allah1**, Thèse. RÉSISTANCE : Chez les champignons, elle n'est pas toujours génétique Actualité publiée **5/12/2020**. Nature Wound warrior
4. **Balashanmugam Pannerselvam1,2 • Tamil Selvi Alagumuthu1 • Senthil Kumar Cinnaiyan1 •Naif Abdullah Al-Dhabi3 • Karuppiah Ponmurugan3 • Muthupandian Saravanan4 • Swarna V. Kanth1 •KalaichelvanPudupalayam Thangavelu2** Received Cytotoxicité in vitro et activité antibactérienne de l'argent optimisé, Thèse ,univercity de baisane **2010**
5. **Crlond** Nanoparticules contre les bactéries infectieuses des plaies et leurs Études AFM, Journal de Cluster Science Morphologiques .: **2 October 2019**
6. **Céline Elie –caille** institut ,Nanobiologie : la révolution diagnostique , FEMTO-ST may**2009**
7. **Charrakh et al** Association d'antibiotiques et d'Ag-NPsAl: Activité antimicrobienne des AgNPs **Décembre 2019** Article Vol. 22 (2019)
8. **(Cpp)Comite prevention et précation** Article Nanotechnologie – Nanoparticules :Quels dangers, quels risques ?Depuis le 1er rapport du Comité de la prévention et de la précaution en **3 Février 2020** France
9. **Douaa Hamza Khair-Allah1, Alaa H. Al-Charrakh2, Nawfal H. Al-Dujaili3**Thèse. RÉSISTANCE : Chez les champignons, elle n'est pas toujours génétique Actualité publiée Article **5/12/2020**. Nature Wound warrior
10. **GeethalakshmI, R. et D.V.L Sarada** , Activité larvicide et antimicrobienne contre les moustiques de particules d'argent nanocristallines synthétisées à l'aide de feuilles et d'extraits de baies vertes de Solanum nigrum L. (Solanaceae : Solanales). Acta Tropica. Sous presse. cellule de veille Nano _Bulletin , **(2013).**
11. **Gharibe .M** ,Amiche Nanobiologie une nouvelle ére de la science. I ,Autorité générale égyptienne du livre **2012** EGYPTE
12. **Gopi, d., et al** Caractérisation, évaluation antioxydante et cytotoxicité de nanoparticules d'argent synthétisées vertes en utilisant l'extrait de Cleistanthuscollinus comme modificateur de surface. Bulletin de recherche sur les matériaux. cellule de veille Nano _Bulletin . **(2013).**
13. **GOPINATH, K., et al** Biosynthese_verte_nanoparticérences Article, cellule de veille Nano _Bulletin . **(2013).**

14. **HowraBahrulolum ,SaghiNooraei,Nahid Javanshir, Hossein Tarrahimofrad, Vasighe Sadat Mirbagheri, Andrew J. Easton and Gholamreza Ahmadian** Green synthesis of metal nanoparticles using microorganisms and their application in the agrifood sector Journal of Nanobiotechnology **(2021)**
15. **H.KARBERN** , anomatériaux **2013** éd 2 médicales attache Liver P112 116
16. **KANIPANDIAN, N., et al** Caractérisation et activité antimicrobienne des nanoparticules d'or et d'argent synthétisées à l'aide de saponine isolée de Trianthemadecandra L. IndustrialCrops and Products 51 : 107- 115. cellule de veille Nano _Bulletin **(2013).**
17. **M. CHAUVEL Romain** Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique Thèse **2018**
18. **Rania Dadi** . Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Matériaux. Université Paris-Nord - Paris XIII, **2019**. Français..
19. **S.Shantkriti1* and P.Rani** Biological synthesis of Copper nanoparticles using Pseudomonas fluorescens , Article Department of Biotechnology, National College, Tiruchirapalli-620001, Tamilnadu, India Department of Biotechnology **2009**
20. **Lanone a, J. Boczkowski** Les sources de nanoparticules.,Article ,article université Paris 12, 8 ,Disponible sur Internet le 11 mars2011
21. **M. Chauvel romain** Application des nanoparticules d'argent en thérapeutique these **2018** faculte de pharmacie Institut des sciences pharmaceutiques et biologiques universiteclaudebernard - lyon 1
22. **Messaoudi . O et BendahouM.** Biologie Syntheses de Nanoparticules UtilisEndophyticMicroorganisms: Article **2020** LagroutAmareteligi
23. **Malhotra, a., et al** Nouvelle voie verte médiée par la pectine de peau de banane pour la synthèse de nanoparticules d'hydroxyapatite et leur caractérisation spectrale. Spectrochimica Acta Partie A : Spectroscopie moléculaire et biomoléculaire. cellule de veille Nano _Bulletin . . **2013**
24. **RAWANI, A., et al**. Synthèse verte de nanoparticules d'or à partir d'extrait de feuille de Terminaliaarjuna, pour l'amélioration de la division cellulaire mitotique et de l'activité de germination du pollen. **2019** .cellule de veille Nano _Bulletin 50 : 737-742
25. **Sondi, I. ; B.** Nanoparticules d'argent en tant qu'agent antimicrobien : Une étude de cas sur E. coli en tant que modèle pour les bactéries Gram-négatives. J. Interface colloïdale Sci. **2004**, 275, 177-182. [CrossRef] [PubMed]
26. **sherrwood,** Microbiologie Liver 4°édition, Prescott , Willey, Woolverton de doeck ,**2015**
27. **Tromas, laurent ,Christophe** Développement d'une nouvelle approche hybride combinant AFM et MEB pour la métrologie dimensionnelle des nanoparticules Thèsedevoilledocteur de l'universite de poitiers Faculté des Sciences Fondamentales et Appliquées Soutenance le **17 Juillet 2020 .**
28. **Salopek-Sondi** Biosynthèse de nanoparticules d'or et d'argent à l'aide d'une nouvelle souche marine de Stenotrophomonas. Technologie des bioressources Cultures et produits industriels **2013** ,142 : 727-731

29. WWW;TSI.france ;com consulte le **12-5-2021**

BIOSYNTHESE DES NANOPARTICULES PAR DE MICRO-ORGANISMES ET EVALUATION DE LEUR ACTIVITE BIOLOGIQUE

RESUME. Les **nanoparticules** ont été synthétisées par méthode biologique avec des bactéries ***Actinomycètes*** et ***Streptocoques B*** avec du **métal argenté pour sa stabilité chimique**, ce qui donne une nanoparticule à l'aide de particules d'argent où incubation pendant 24 heures, puis centrifugation et obtention de biomasse, puis faire l'étape de réaction avec du métal particules d'argent.

Dans cette étude, l'efficacité des nanoparticules résultantes au niveau de l'élimination des accumulations bactériennes de ***Klepsiella*** qui ont atteint C sur **microscopiques plaques 96** et l'interaction des antimicrobiens sur chacune des bactéries ***Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, Staphylocoque, Candida, Bacillus*** *donnés* Les résultats suivants La plus petite superficie est 1, la plus grande superficie est 24, de la biomasse des **Actinomycètes** à Soja n'a pas donné de résultats.

L'échantillon a réussi le test infrarouge, qui a montré **les fonctions d'amino et d'hydroxyde.**

MOTS-CLES. Biosynthèses ; Nanoparticules ; *Actinomycète* ; *streptocoque B ;* Biofilm.

BIOSYNTHESIS OF NANOPARTICLES BY MICROORGANISMS AND EVALUATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITY

ABSTRACT. The nanoparticles were synthesized by biological method with ***Actinomycete*** and ***Streptocoque B*** bacteria with **silver metal for its chemical stability**, which gives a nanoparticle using silver particles where incubation for 24 hours, then centrifugation and obtaining biomass, then do the reaction step with metal silver particles.

In this study, the efficiency of the resulting nanoparticles at the level of the elimination of bacterial accumulations of ***Klepsiella*** which reached C on **microscopic plates 96** and the interaction of antimicrobials on each of the bacteria ***Escherichia coli, Micrococcus, Klepsiella, Staphylococcus, Candida, Bacillus.*** She gave the following results The smallest area is 1, the largest area is 24, Soybean **Actinomycetes** biomass did not give results.

The sample passed the infrared test, which showed **the functions of amino and hydroxide**.

KEY WORDS. Biosyntheses; Nanoparticles; Actinomycete; Streptococcus B; Biofilm

التخليق الحيوي للجسيمات النانوية بالكائنات الحية الدقيقة ودراسة نشاطها.

ملخص. الجسيمات النانوية تم تصنيعها بالطريقة البيولوجية ببكتيريا **الفطريات الشعاعيةوالمكورات العقدية** مع **معدن الفضة** لاستقراره الكيميائي مما يعطي جسيمات متناهية الصغر حيث تحضن لمدة 24 ساعة ثم اجتيازطرد مركزي والحصول الكتلة الحيوية ثم القيام بخطوة التفاعل بجزيئات الفضة المعدنية.

في هذه الدراسة ، تم تسليط الضوء على كفاءة الجسيمات النانوية الناتجة على مستوى القضاء على التراكمات البكتيرية الكليبسيلا الذي وصل إلى C على الصفائح **الميكروسكوبي 96** وتفاعل مضادات الميكروبات على كل من بكتيريا **الإشراكية القولونية ، المكورات الدقيقة ، كليبسيلا ، المكورات العنقودية ، المبيضات ، العصيات** أعطت النتائج التالية أقل المساحة هي 1، والمساحة الأكبر هي 24 ، الكتلة الحيوية للفطريات الشعاعية في سوجا لم تعطِ نتائج.

اجتازت العينة اختبار الأشعة تحت الحمراء ، والذي أظهر **وظائف الأمينو والهيدروكسيد** .

الكلمات الرئيسية. التخليق الحيوي؛ الجسيمات النانوية ؛ الفطريات الشعاعية و المكورات العقدية ؛ التراكمات البكتيرية.