

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE
LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Appliquée



Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master Professionnalisant
Filière : Sciences biologiques, Spécialité : Microbiologie et Hygiène
Hospitalière

Par : AIT HAMOUDA AMINA
GUECHI KELTHOUM

Le : 15-09-2020

Thème

Effet antibactérien des nanoparticules
« cuivre, argent »

Jury d'évaluation:

Président : Pr. BENLABED. K Prof. CHU de Constantine, Algérie

Encadreur : Pr. BELMAHI Prof. CHU de Constantine, Algérie

Examinatrice : Dr. CHENTLI prof. Université des frères Mentouri Constantine, Algérie

ANNEE UNIVERSITAIRE : 2019/2020



Dédicaces

*D'un profond amour et d'une immense gratitude nous dédions
ce mémoire*

A nos chers parents

*Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leur
encouragement*

A nos frères

A toutes nos familles

A tous nos amis

*On vous aime du fond du cœur. Que dieu vous guide vers le
chemin de la paix et du bonheur.*

Remerciement

Au terme de ce mémoire nous tenons à remercier tout d'abord et en premier lieu ALLAH tout puissant qui nous a donné la force, le courage et la patience de bien mener ce travail.

Après; nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Pr.Belmañi pour toute l'aide qu'il nous a fourni, pour sa patience et sa générosité durant la réalisation de ce travail.

Nous voudrions aussi, remercier Pr.Benlabed responsable de laboratoire de microbiologie qui nous a permis de réaliser notre travail malgré les conditions de COVID et Dr.Chantli pour le temps qu'ils vont consacrer quant à l'examen de ce mémoire. Sans oublier de remercier tous les enseignants qui nous ont soutenus tout au long de nos études.

Notre remerciements vont enfin à tous ceux qui ont aidé et contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES TABLEAUX	x
LISTE DES ABREVIATIONS	xi
INTRODUCTION	Erreur ! Signet non défini.
CHAPITRE 01 : GENERALITES SUR LES NANOPARTICULES	3
I. 1. Définition des nanoparticules (NPs)	3
I. 2. Les sources des nanoparticules	5
I. 2.1. Les nanoparticules naturelles	5
I. 2.2. Les nanoparticules non manufacturées.....	5
I. 2.3. Les nanoparticules manufacturées.....	5
I. 3. Propriétés des nanoparticules	6
I. 3.1. Propriétés mécaniques	8
I. 3.2. Propriétés électriques	8
I. 3.3. Propriétés optiques	9
I. 3.4. Propriétés magnétiques.....	9
I. 3.5. Propriétés de barrière.....	9
I. 3.6. Propriétés thermiques	9
I. 3.7. Inflammabilité	10
I. 3.8. Propriétés catalytiques.....	10
I. 4. Classification des nanoparticules	10
I. 4.1. Nanoparticules organiques	11
A. Système micellaire/lipidique	11
B. Nanoparticules à base de polymères.....	12
C. Les nanotubes de carbone et Les fullerènes	12
I. 4.2. Nanoparticules inorganiques	13
A. Puits quantiques	13
B. Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et supermagnétique	14
C. Nanoparticules de diamants photoluminescents	14
D. Sondes Raman.....	14

I. 5. Procédés de fabrication	14
I. 5.1. Méthodes physiques	16
A. Evaporation/condensation	16
B. Ablation laser	16
C. Méthode aérosol	16
I. 5.2. Méthodes chimiques	16
I. 5.3. Méthodes mécaniques	17
A. Mécanosynthèse et activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres... 17	
B. Consolidation et densification	17
C. Forte déformation (hypercorroyage)	17
I. 6. Applications médicales des nanoparticules	18
I. 6.1. Biocapteurs	20
I. 6.2. Hyperthermie magnétique	20
I. 6.3. Bioimagerie	20
I. 6.4. Délivrance ciblée des médicaments.....	21
I. 6.5. Photothérapie dynamique et photothermale	21
I. 6.6. Cuivre	21
I. 6.7. Argent.....	22
CHAPITRE 02 : LA CINETIQUE DES NANOPARTICULES	24
II. 1. Cadre de l'exposition	24
II. 1.1. Situations d'exposition professionnelle.....	24
II. 1.2. Situations d'exposition extraprofessionnelle.....	24
II. 2. La cinétique des nanoparticules	24
II. 2.1. Absorption.....	24
A. Voie pulmonaire.....	25
B. Voie digestive	26
C. Voie cutanée.....	26
II. 2.2. Distribution.....	27
II. 2.3. Métabolisme	28
A. Les enzymes lytiques	28
II. 2.4. Elimination	28
A. Elimination pulmonaire.....	28
B. Elimination urinaire	30
C. Elimination hépatobiliaire.....	32

CHAPITRE3 : TOXICITE DES NANOPARTICULES	34
III. 1. Les effets toxiques des nanoparticules sur la santé :.....	34
III.1.1. Mécanismes moléculaires de la toxicité des NP.....	34
A. Stress oxydant	35
B. Inflammation.....	35
C. Génotoxicité.....	36
D. Interaction directe des NPs avec les composants cellulaire	36
III.1.2. La toxicité à l'échelle tissulaire.....	38
A. Pneumotoxicité.....	38
B. Toxicité Cardio-vasculaire	38
C. Neurotoxicité.....	38
D. Immunotoxicité.....	39
E. Toxicité de la flore intestinale.....	39
F. Reprotoxicité.....	40
III. 2. Les effets toxiques des nanoparticules sur l'environnement	40
III.2.1. Toxicité pour la flore.....	41
III.2.2. Toxicité pour la faune.....	41
III. 3. Facteurs influençant la toxicité des nanoparticules	41
III.3.1. Les caractéristiques physiques	41
A. La taille des nanoparticules.....	41
B. La forme des nanoparticules	42
III.3.2. Les caractéristiques chimiques	42
A. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules.....	42
B. Les types cellulaires	43
III.3.3. Les caractéristiques secondaires.....	43
CHAPITRE 4 : ACTIVITE ANTIBACTERIEN DES NANOPARTICULES CUIVRE ARGENT	44
IV. 1. Définition.....	44
IV. 1.1. Cuivre.....	44
IV. 1.2. Argent.....	44
IV. 2. Sources.....	44
IV. 2.1. Cuivre.....	44
IV. 2.2. Argent.....	45
IV. 3. Propriétés	45

IV.	3.1. Cuivre.....	45
	A. Propriétés chimiques.....	45
	B. Propriétés biologiques.....	46
	C. Propriétés mécaniques.....	46
	D. Propriétés physique.....	46
IV.	3.2. Argent.....	47
	A. Propriétés physiques.....	47
	B. Propriétés mécaniques.....	48
IV.	4. Classification périodique.....	48
IV.	4.1. Cuivre.....	48
IV.	4.2. Argent.....	48
IV.	5. Toxicité sur la santé.....	48
IV.	5.1. Cuivre.....	48
IV.	5.2. Argent.....	50
	A. Contact avec l'œil.....	50
	B. Contact avec la peau.....	50
	C. Risques d'inhalation.....	50
IV.	6. Toxicité sur l'environnement.....	50
IV.	6.1. Le cuivre.....	50
IV.	6.2. Argent.....	51
IV.	7. Mécanisme de pénétration des nanoparticules dans les bactéries.....	52
IV.	7.1. Effets antibactérien des nanoparticules.....	53
	A. Argent.....	54
	B. Cuivre.....	55
	Chapitre 5 : matériels et méthodes.....	56
	L'OBJECTIF.....	56
	I. Matériels.....	56
	I.1. Souches bactériennes.....	56
	I.2. Milieux de culture.....	57
	I.3. Solvants.....	57
	I.4. Réactifs.....	57
	I.5. Les sels utilisés.....	57
	II. Méthodologies.....	58
	II.1. Identification des souches bactériennes.....	58

II.1.1. Caractères morphologiques	58
II.1.2. Caractères biochimiques	59
II.1.3. Antibiogramme	61
II.2. La méthode de diffusion sur milieu gélosé	64
Chapitre 6 : résultats et discussions	67
I. Identification et isolement des souches bactériennes	67
I.1. Caractères morphologiques	67
I.2. Caractères biochimiques	68
I.2.1. Recherche de la catalase	68
I.2.2. Recherche d'oxydase	68
I.2.3. Macrogalerie	69
I.3. Antibiogramme	71
II. Résultats de la méthode de diffusion sur milieu gélose	74
Discussion	76
Conclusion	81
Bibliographie.....	82
Résumé	
Abstarct	
المخلص	
Annexe	

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nanoparticules de phosphate d'argent [2].	3
Figure 2: Images field emission gun scanning electronmicroscopy (FEG-SEM) révélant la variation de la morphologie des particules et la présence de caractéristiques de surface des particules de cuivre Cu et oxyde de cuivre CuO. a) microparticules Cu et b) microparticules CuO à un grossissement de 500 pour une vue d'ensemble; c) microparticules Cu et d) microparticules CuO à un grossissement de 50 000 pour une vue plus détaillée des caractéristiques de surface et de la morphologie des particules nanodimensionnées agrégées/agglomérées présentes. e) nanoparticules Cu et f) nanoparticules CuO à un grossissement de 50 000 [5].	4
Figure 3 : Déformation superplastique d'un nanomatériau massif à base de Cu [10].	8
Figure 4 : Nanomatériaux avec différentes morphologies (A, B, C, D, E, F) [6].	10
Figure 5: Représentation d'un liposome, vésicule constituée d'un cœur aqueux entouré d'une couronne lipidique [9].	11
Figure 6 : Représentation d'une micelle, structure polymère de forme sphérique dont le cœur est hydrophobe et la couronne hydrophile [9].	11
Figure 7: Différentes formes de balles (A) Fullerènes/Buck C60 et(B) C70 [12].	12
Figure 8 : Structure de base des nanoparticules inorganiques [14].	13
Figure 9 : Représentation schématique et visuelle d'un point quantique [15].	14
Figure 10 : Représentation schématique des deux types de préparation de nanoparticules "Bottom up" et "Top down" [16].	15
Figure 11 : Schéma d'un biocapteur typique [18].	20
Figure 12 : Schéma montrant le processus photocatalytique des nanoparticules de TiO ₂ [18].	21
Figure 13 : Schéma de la structure de la peau [26].	27
Figure 14 : La clairance pulmonaire des nanomatériaux NM in vivo [40].	29
Figure 15 : Filtration glomérulaire de nanomatériels NM vivo [40].	31
Figure 16 : Clairance hépatique des NM in vivo [40].	33
Figure 17 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NP [44].	34
Figure 18 : Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries [7].	53
Figure 19: Site d'action des ions Ag ⁺ sur les cellules bactériennes [76].	55
Figure 20: Examen à l'état frais	59
Figure 21: Emplacement des disques d'antibiotiques choisis	64

Figure 22 : Les différentes concentrations d'acétate de cuivre et de nitrate d'argent avec le mélange entre les deux	65
Figure 23: les cinq suspensions bactériennes	65
Figure 24: imbibition des disques par les solutions Cu-Ag.....	66
Figure 25: Le dépôt des disques imbibés par les solutions Cu-Ag sur le milieu MHensemencée de la suspension bactérienne.....	66
Figure 26 : Aspect macroscopique des colonies d' <i>Escherichia coli</i> sur milieu Chocolat.....	67
Figure 27: Aspect macroscopique des colonies de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sur milieu Hektoen	67
Figure 28: Echantillon de résultats de la galerie biochimique pour <i>Escherichia coli</i>	69
Figure 29 : Echantillon de résultats de la galerie biochimique pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	70
Figure 31: Résultats de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> (H).....	71
Figure 30 : Résultats de l'antibiogramme d' <i>Escherichia coli</i> (R).....	71
Figure 33: Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (H).....	72
Figure 32 : Résultats de l'antibiogramme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R).....	72
Figure 34: Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> (R).....	73
Figure 35 : Résultats de la diffusion sur gélose d' <i>Escherichia coli</i> (H).....	74
Figure 36: Résultats de la diffusion sur gélose d' <i>Escherichia coli</i> (R)	74
Figure 37: Résultats de la diffusion sur gélose de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R).....	75
Figure 38: Résultats de la diffusion sur gélose de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (H)	75
Figure 39: Résultats de la diffusion sur gélose de <i>Staphylococcus aureus</i> (R).....	76

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Evolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique [7].	7
Tableau 2 : Exemples d'applications actuelles des nanomatériaux [17].	19
Tableau 3 : Domaines d'applications médicales de produits contenant des nanoparticules d'argent (AgNps) [21].	23
Tableau 4 : La toxicité aigüe et chronique induite par le cuivre	49
Tableau 5: Souches cliniques pathogènes étudiées.	56
Tableau 6: Souches de références pathogènes étudiées.	57
Tableau 7: les différentes concentrations des disques d'antibiotiques utilisées.	62
Tableau 8: Aspect macroscopique et microscopique des colonies d' <i>Escherichia coli</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	68
Tableau 9: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour <i>Escherichia coli</i>	69
Tableau 10: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	70
Tableau 11: Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches d' <i>Escherichia coli</i> hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations	71
Tableau 12: Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations	72
Tableau 13: Résultats de l'antibiogramme de <i>Staphylococcus aureus</i> (R) et leurs interprétations	73
Tableau 14: Les résultats de l'effet antibactérien de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre et leur mélange équimolaire avec différents concentrations sur chacune des souches d' <i>Escherichia coli</i> hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations.	74
Tableau 15: Les résultats de l'effet antibactérien de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre et leur mélange avec différentes concentrations sur chacune des souches <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations	75
Tableau 16: Les résultats de l'effet antibactérien de nitrate d'argent, acétate de cuivre et mélange équimolaire avec différentes concentrations sur et leurs interprétations de <i>Staphylococcus aureus</i> (R)	76

LISTE DES ABREVIATIONS

Ag : argent

AgNps : nanoparticules d'argent

Al₂O₃ : Alumine

AM : Les macrophages des voies respiratoires et alvéolaires

BHE : barrière hémato-encéphalique

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

CMI : concentration minimale inhibitrice

CNP : nanoparticules de carbone

CNT : nanotubes de carbone

COX2 :cyclooxygénase-2

Cu : cuivre

CuO : oxyde de cuivre

CT : tomodensitométrie

E. coli : *Escherichia coli*

FEG-SEM : field emission gun scanning electronmicroscopy

Fe₂O₃ : Oxyde de fer

GBM : la membrane de sous-sol glomérulaire

H : hospitalière

H : liaison hydrogène

H₂S : d'hydrogène sulfuré

IRM : imagerie par résonance magnétique

IMs : macrophages interstitiels

IACS : International Annealed Copper Standard

Kcs : cellules de Kupffer

M : masse molaire

MH : (Mueller Hinton

NM : nanomatériels

NPs : nanoparticules

NPM : nanoparticules manufacturées

NV : lescentres azote-lacune

P. aeruginosa : *pseudomonas aeruginosa*

PEG : polyéthylène glycol

PUF : particules atmosphériques «ultrafines»

ROS : espèces réactives d'oxygène

R : référence

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

SH : groupes thiol

TiO₂ : dioxyde de titane

TEP : la tomographie par émission de positrons

TSI : triple SugarIron

TDA : tryptophane désaminase

Qds : quantum dots

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Des millions de vies ont été sauvées grâce à la découverte d'antibiotiques dans les années 1940. Cependant, avec l'utilisation croissante et parfois inappropriée des antibiotiques, de nombreuses souches microbiennes ont commencé à s'adapter et à développer des résistances face à cette thérapeutique. Le problème de la résistance bactérienne est un enjeu très important dans le domaine médical ajoutant à cela le problème des contaminations bactériennes et les infections causées par des espèces comme (*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus*) qui sont devenus un problème majeur de santé mondiale.

Comme on peut le constater, la recherche pour la conception et le développement de nouvelles substances à activité antibactérienne alternatives aux antibiotiques conventionnels constitue un enjeu scientifique très important. Les études effectuées dans ce contexte sont nombreuses, citons les antibactériens organiques tels que les acides organiques, les huiles essentielles, les bactériocines et les enzymes qui étaient largement étudiés. Récemment, les nanosciences et la nanotechnologie ont ouvert une nouvelle voie qui a révolutionné toutes les technologies dans le monde.

Un grand nombre de nanoparticules (NPs) à un effet antibactérien sur différentes souches bactériennes. Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction de la nature et des caractéristiques des nanoparticules comme la forme et la taille ou l'état d'agglomération. Ainsi les nanoparticules métalliques d'argent (Ag) et de cuivre (Cu) qui présentent une forte activité bactéricide.

Aujourd'hui, et malgré le développement considérable de la recherche en nanotoxicologie, ce domaine présente encore plusieurs lacunes majeurs. De ce fait l'évaluation des effets potentiels des NPs sur la santé, à court et à long terme, chez l'homme (en milieu de travail ou en population générale) constitue un enjeu de santé publique.

Dans cette optique, l'objet du travail présentés dans ce mémoire ayant pour but de confirmer le mécanisme d'action et l'activité antibactérienne des deux nanoparticules d'oxydes métalliques d'argent (Ag) et de cuivre (Cu) sur les deux souches bactériennes de Gram différents : *Escherichia coli*(G-) et *Staphylococcus aureus*(G+), sont les principaux bactéries responsables des infections enregistrées en milieu hospitalier ainsi qu'elles sont même extrêmement résistantes aux antibiotiques.

Dans le présent travail, sera tout d'abord présenté un état de l'art donnant une vue générale sur tous qui concernent les nanoparticules ainsi leur profil de toxicité, et les facteurs influençant

INTRODUCTION

cette toxicité. Après avoir présenté les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, matériel et méthodes utilisés et les résultats seront décrits.

CHAPITRE 01 :

GENERALITES SUR LES NANOPARTICULES

CHAPITRE 01 : GENERALITES SUR LES NANOPARTICULES

I.1. Définition des nanoparticules (NPs)

Le terme de « nanoparticule » est utilisé lorsque la particule a au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm. Le rayon typique d'un atome étant de l'ordre de 0,1 nm, une nanoparticule peut-être constituée de quelques dizaines à plusieurs centaines d'atomes. Par exemple, les nanoparticules les plus célèbres, les fullerènes, sont constituées de seulement 60 ou 70 atomes de carbone. Leur très petite taille donne aux nanoparticules des surfaces spécifiques très importantes (figure1) [1].

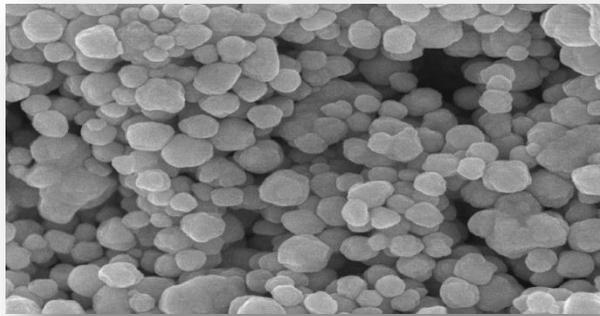


Figure 1 : Nanoparticules de phosphate d'argent [2].

Cette caractéristique dimensionnelle confère à ces matériaux des comportements particuliers et des propriétés très intéressantes. Les nanotubes de carbone par exemple, sont 100 fois plus résistants que l'acier [3].

Le terme de nanoparticules fait référence à différentes familles de particules telles que :

- Les oxydes de métaux (titane, cuivre, zinc, aluminium, silicium) (figure2).
- Les nanotubes de carbones, qui forment des fibres solides aux propriétés électriques particulières.
- Les fullerènes [C60, C70], utilisées pour améliorer les propriétés électriques et optiques de polymères ou pour des applications pharmaceutiques.
- Les nano poudres d'argent, dont les propriétés antibactériennes sont mises à profit notamment dans le textile [4].

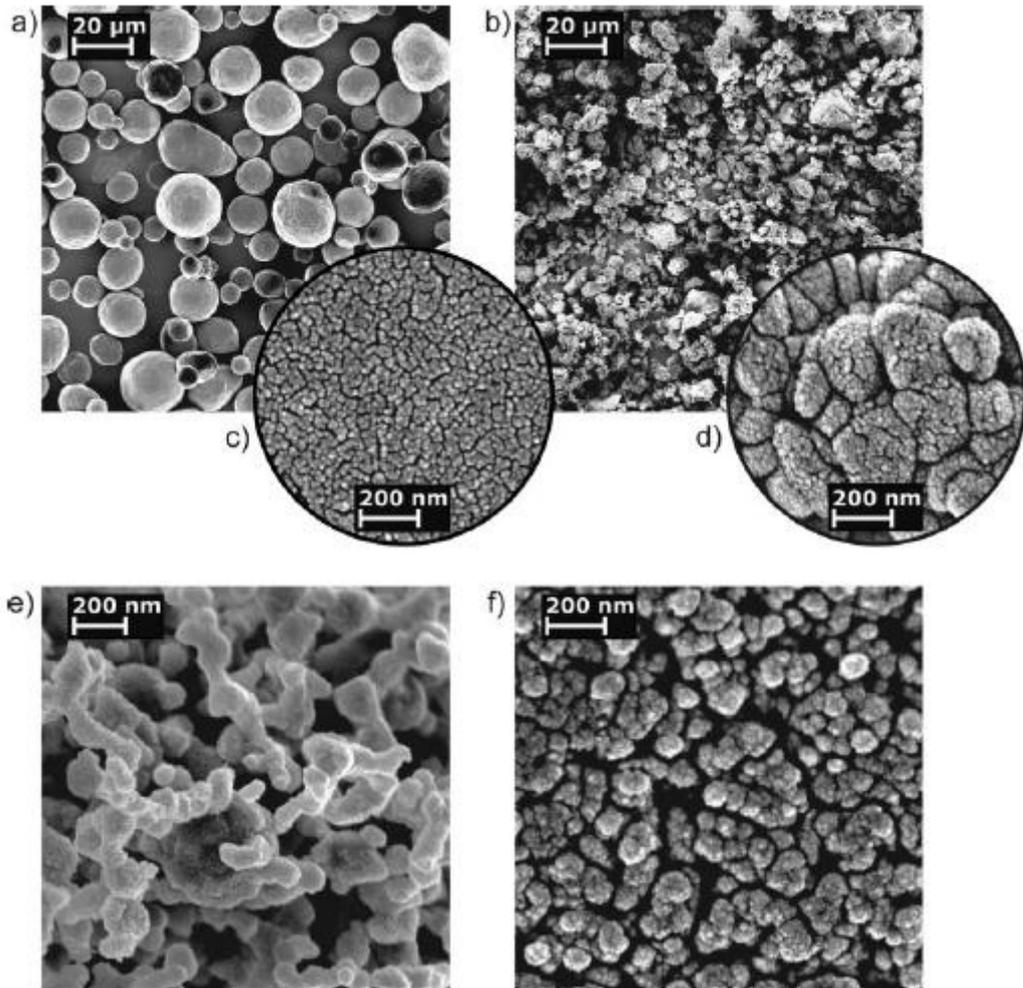


Figure 2: Images field emission gun scanning electronmicroscopy (FEG-SEM) révélant la variation de la morphologie des particules et la présence de caractéristiques de surface des particules de cuivre Cu et oxyde de cuivre CuO. a) microparticules Cu et b) microparticules CuO à un grossissement de 500 pour une vue d'ensemble; c) microparticules Cu et d) microparticules CuO à un grossissement de 50 000 pour une vue plus détaillée des caractéristiques de surface et de la morphologie des particules nanodimensionnées agrégées/agglomérées présentes. e) nanoparticules Cu et f) nanoparticules CuO à un grossissement de 50 000 [5].

On distingue par exemple les nanoparticules organiques (constituées majoritairement de polymères), des métalliques (ex : nanoparticules d'or ou d'argent), d'oxydes métalliques, ex : oxyde de fer (Fe_2O_3), dioxyde de titane (TiO_2) ou encore des composites (ex : quantum dots CdSe- ZnS)[1].

I.2. Les sources des nanoparticules

Les sources de nanoparticules peuvent être classées en trois grandes catégories en fonction de leur origine : les nanoparticules produites naturellement, que l'on peut trouver dans les plantes, les animaux et les corps humains. Ou les nanoparticules qui sont produites incidemment comme sous-produit de processus industriels tels que les gaz d'échappement des moteurs de véhicules, ou encore les nanoparticules manufacturées qui ont été fabriqués par les humains pour avoir certaines propriétés requises pour les applications souhaitées [6]

I.2.1. Les nanoparticules naturelles

Les nanoparticules naturelles sont produites dans la nature par des espèces biologiques ou par des activités anthropiques. Les NPs d'origine naturelle sont présentes dans les sphères terrestres (c'est-à-dire dans l'hydrosphère, l'atmosphère, la lithosphère et même dans la biosphère), [6] elles sont essentiellement le résultat des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère, [7] Indépendamment des actions humaines [6]

I.2.2. Les nanoparticules non manufacturées

Les nanoparticules non manufacturées sont produites par l'homme de façon non intentionnelle ; dans cette catégorie nous retrouvons les particules atmosphériques «ultrafines» (PUF).

En milieu urbain, les PUF peuvent être formées de plus de 80 % de suies fines (inférieur à $1\mu m$) 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 et le soudage [8].

I.2.3. Les nanoparticules manufacturées

Les nanoparticules manufacturées sont produites par l'homme de façon intentionnelle car le développement récent des nanotechnologies, regroupement de l'ensemble des techniques visant à concevoir, caractériser et produire des matériaux à l'échelle du nanomètre, il 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 [8].

I.3. Propriétés des nanoparticules

Les nanoparticules présentent des propriétés qui sont en fonction de leur composition, leur structure, et de la surface exposée ainsi que de leur procédé de synthèse. Cependant, quelle que soit leur origine, les nanoparticules possèdent des propriétés physiques communes qui découlent notamment de leur dimension (tableau 1) [9].

Tableau 1 : Evolution des propriétés des particules à l'échelle nanométrique [7].

Propriétés	Exemple
Catalytique	Efficacité catalytique élevée due au rapport surface/volume élevé
Electrique	Augmentation de la conductivité électrique des céramiques et des nano composites magnétiques Augmentation de la résistance électrique des métaux
Magnétique	Augmentation de la coercivité magnétique, comportement super paramagnétique
Mécanique	Augmentation de la dureté et de la solidité des métaux et des alliages, de la ductilité et de la Super élasticité des céramiques
Optique	Changement spectral de l'absorption optique et des propriétés fluorescentes, augmentation de l'efficacité quantique des cristaux semi-conducteurs
Stérique	Augmentation de la sélectivité Sphères creuses pour un transport spécifique de médicaments et une distribution contrôlée
Biologique	Augmentation de la perméabilité vis-à-vis des barrières biologiques (membrane, barrière épithéliale), augmentation de la biocompatibilité

I.3.1. Propriétés mécaniques

L'effet de la nanostructure se traduit par un phénomène de superplasticité. L'exemple ci-dessous présente un allongement extrêmement important (de plus de 5.000 %) pour un matériau de cuivre nanocristallin obtenu par laminage à froid (figure 3).

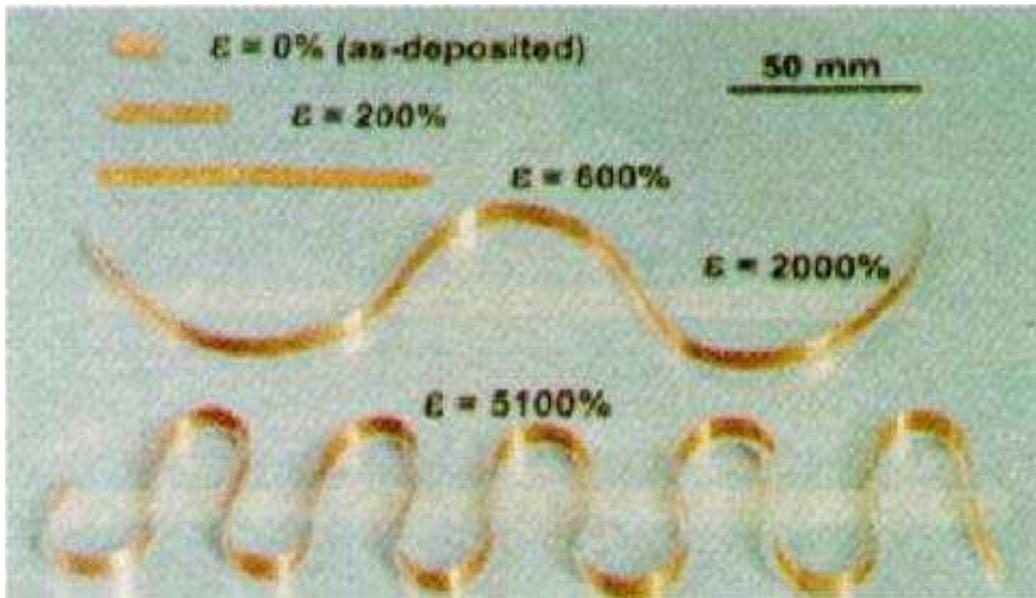


Figure 3 : Déformation superplastique d'un nanomatériau massif à base de Cu [10].

Des nanocéramiques nanostructurées peuvent également être mises en forme par déformation superplastique [10].

I.3.2. Propriétés électriques

L'introduction de nanoparticules et/ou de nanotubes peut modifier de façon drastique la conductivité électrique de matériaux réputés isolants. Dans l'exemple ci-dessous, la conductivité électrique atteint 3345 S/m pour un ajout de 15 % vol. De nanotubes de carbone de type mono feuillet dans une matrice d'alumine, correspondant à une modification de 13 ordres de grandeur de la valeur initiale [10].

I.3.3. Propriétés optiques

La réduction de la taille d'un objet semi-conducteur ou métallique à l'échelle nanométrique conduit à de fortes modifications de sa réponse dans le domaine optique, comparée à celle du massif. Les nanoparticules métalliques exhibent une résonance plasmon de surface. Les caractéristiques (position spectrale, amplitude et largeur spectrale) de cette dernière dépendent de la taille, de la forme et de l'environnement des nanoparticules [11].

I.3.4. Propriétés magnétiques

Les matériaux ferromagnétiques se caractérisent par un alignement spontané des moments magnétiques de chaque entité élémentaire dans la même direction, contrairement aux matériaux paramagnétiques pour lesquels l'orientation est aléatoire. A haute température, les matériaux ferromagnétiques subissent une transition vers un état paramagnétique. En effet, l'énergie thermique désorganise le système et vient contrer l'alignement, laissant une orientation aléatoire des moments magnétiques. La température de transition est appelée température de Curie. Celle-ci décroît avec la taille du matériau étudié. Au-dessous d'une certaine taille, le système se comporte comme un matériau paramagnétique du point de vue de sa courbe d'aimantation, même en-dessous de sa température de Curie, alors qu'il devrait être ferromagnétique. C'est le super paramagnétisme [11].

I.3.5. Propriétés de barrière

Dans les nano composites à matrice polymère, l'incorporation d'argile augmente les propriétés de barrière vis-à-vis de l'eau et des gaz du fait de l'augmentation de la distance à parcourir pour les molécules qui diffusent. Les lamelles de silicate sont imperméables à l'eau et aux gaz [10].

I.3.6. Propriétés thermiques

Il est bien connu que les métaux NPs ont des conductivités thermiques plus élevées que celles des fluides sous forme solide. Par exemple, la conductivité thermique du cuivre à température ambiante est environ 700 fois supérieure à celle de l'eau et environ 3000 fois supérieure à celle de l'huile motrice. Même les oxydes comme l'alumine (Al_2O_3) ont une conductivité thermique supérieure à celle de l'eau. Par conséquent, les fluides contenant des particules solides en suspension devraient présenter des conductivités thermiques

significativement améliorées par rapport à celles des fluides conventionnels de transfert de chaleur [12].

I.3.7. Inflammabilité

Le caractère ignifuge des polymères est amélioré par l'utilisation de nanocomposites silicate polymère. L'introduction de lamelles d'argile de taille nanométrique dans une matrice polymère retarde sa dégradation et permet la formation d'une couche superficielle carbonisée qui ne se fracture pas mais forme une nanostructure multicouche de silicate améliorant les propriétés de barrière et de résistance, jouant le rôle d'un isolant et réduisant les émissions de produits volatils issus de la combustion [10].

I.3.8. Propriétés catalytiques

La diminution de la taille des nanoparticules entraîne un rapport surface sur volume important qui joue un rôle prédominant dans les propriétés mettant en jeu des échanges à l'interface entre l'objet considéré et son environnement. Ce large pourcentage d'atomes de surface rend les matériaux plus réactifs d'un point de vue chimique, ce qui en fait des candidats potentiels très prometteurs pour les applications en catalyse hétérogène [11].

I.4. Classification des nanoparticules

Les NPs sont généralement classés en différentes catégories selon leur morphologie (figure 4), leur taille et leurs propriétés physiques et chimiques.

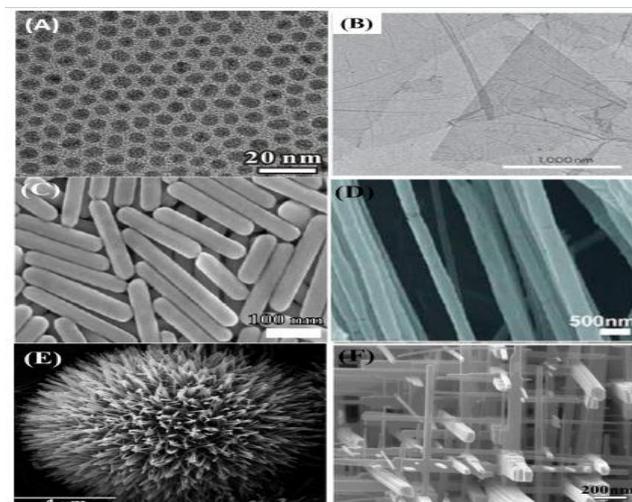


Figure 4 : Nanomatériaux avec différentes morphologies (A, B, C, D, E, F) [6].

I.4.1. Nanoparticules organiques

Nanoparticules organiques inclus le système micellaire et lipidique, les nanoparticules à base de polymères et aussi les nanotubes de carbone et les fullerènes.

A. Système micellaire/lipidique

Récemment, les micelles polymériques de taille entre 10-200nm ont retenu l'attention en tant que véhicules de vectorisation du médicament. Les micelles polymériques sont formées par auto-assemblage des copolymères consistant en 2 ou plusieurs chaînes polymériques à différents degrés de solubilité dans l'eau. Ces copolymères s'assemblent spontanément pour former une structure micellaire dans un milieu aqueux afin de minimiser l'énergie libre du système. Plus précisément, lors d'un contact direct avec de l'eau, la partie hydrophobe centrale minimise l'exposition au milieu aqueux, alors que la partie hydrophile forme l'enveloppe externe qui stabilise le centre de la micelle (figure 5) [13].

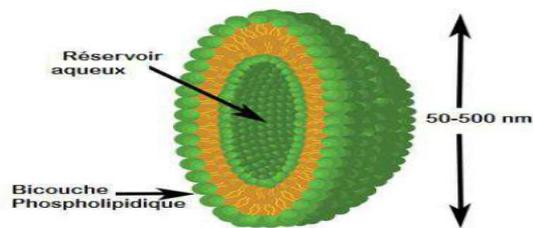


Figure 5: Représentation d'un liposome, vésicule constituée d'un cœur aqueux entouré d'une couronne lipidique [9].

Les liposomes se différencient des micelles par la présence d'une double couche lipidique délimitant un compartiment central hydrophile. Les micelles et les liposomes sont des NPs lipidiques qui permettent le transport de substances hydrophiles ou hydrophobes. (Figure 6) [14].

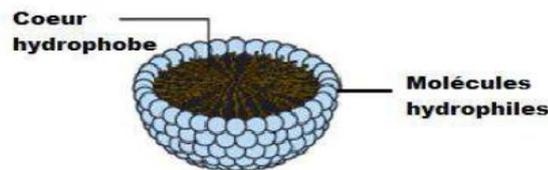


Figure 6 : Représentation d'une micelle, structure polymère de forme sphérique dont le cœur est hydrophobe et la couronne hydrophile [9].

B. Nanoparticules à base de polymères

De nombreux polymères organiques courants peuvent être produits dans des dimensions nanométriques. Le chlorure de polyvinyle ou le latex ainsi produits, par exemple, peuvent être, dans certaines conditions, solubilisés ou modifiés chimiquement. Plusieurs de ces polymères organiques sont à même d'être préparés sous forme de nanofils, donnant lieu à leur utilisation dans l'élaboration de systèmes d'ultrafiltration en phase liquide ou gazeuse, ou comme senseurs notamment. Certaines nanofibres organiques biodégradables pourraient être utilisées en médecine pour la réingénierie tissulaire, la régénération osseuse ou encore pour contrôler le relargage de médicaments [15].

C. Les nanotubes de carbone et Les fullerènes

Les fullerènes et les nanotubes de carbone (CNT) représentent deux grandes classes de nanoparticule à base de carbone. Les fullerènes contiennent des nanomatériaux constitués d'une cage globuleuse creuse, comme des formes allotropes de carbone. Ils ont créé un intérêt commercial remarquable en raison de leur conductivité électrique, leur haute résistance, leur structure, leur affinité électronique et leur polyvalence. Ces matériaux possèdent des unités pentagonales et hexagonales de carbone, tandis que chaque carbone est sp^2 hybridé (Figure 7) montre quelques-uns des fullerènes bien connus composés de C₆₀ et C₇₀ avec un diamètre de 7,114 et 7,648 nm, respectivement [12].

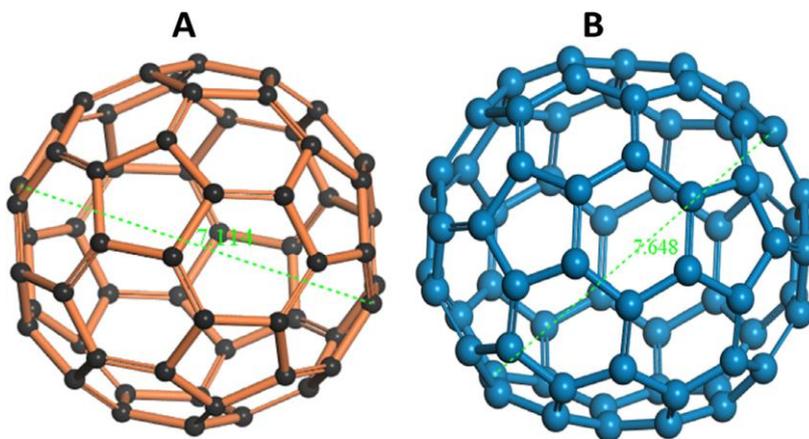


Figure 7: Différentes formes de balles (A) Fullerènes/Buck C₆₀ et(B) C₇₀ [12].

I.4.2. Nanoparticules inorganiques

Elles ont la même structure de base que les NPs organiques, avec un noyau aux propriétés fluorescentes, magnétiques ou optiques et une couche protectrice organique en surface. À cette pellicule de surface peuvent être attachées des molécules vectrices (figure 8) [14].

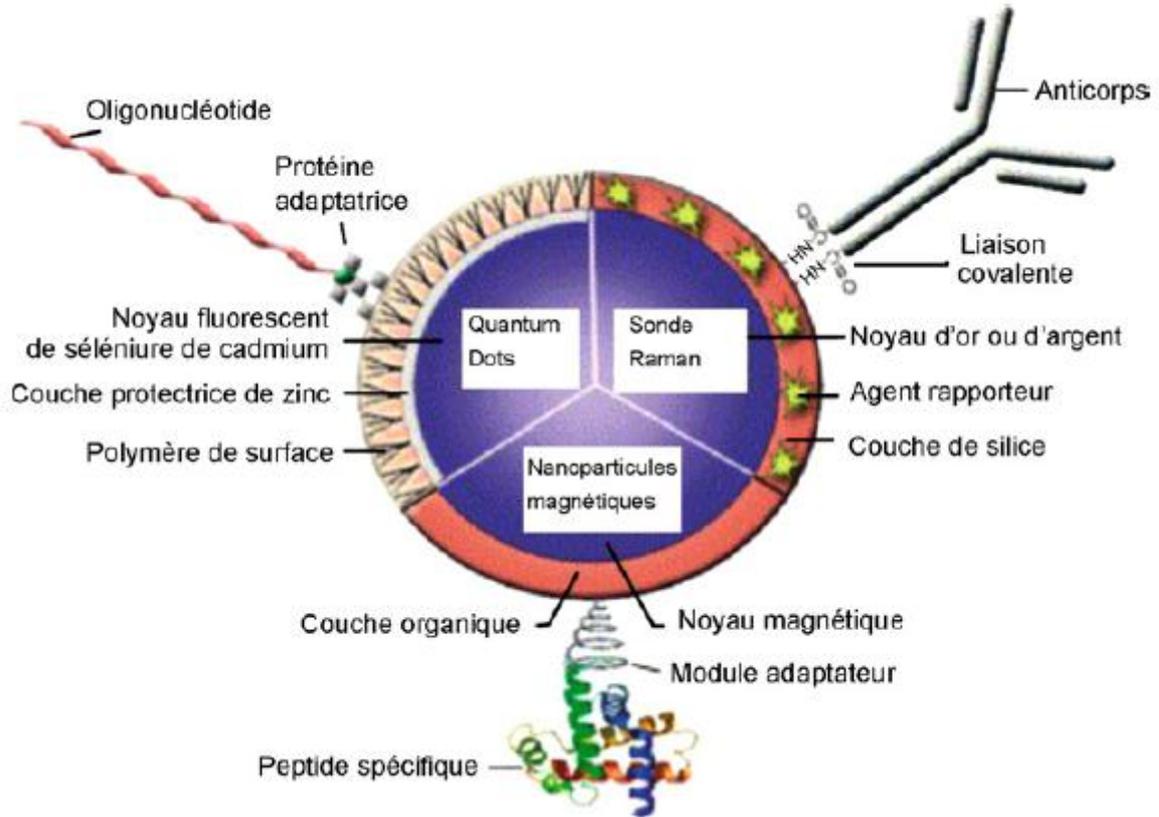


Figure 8 : Structure de base des nanoparticules inorganiques [14].

A. Puits quantiques

Puits quantiques ou quantum dots ou encore les points quantiques sont typiquement composés de combinaisons d'éléments des groupes II et IV ou des groupes III et V du tableau périodique. Ils ont été élaborés sous forme de semi-conducteurs, d'isolants, de métaux, de matériaux magnétiques ou d'oxydes métalliques. Le nombre d'atomes des points quantiques, qui peuvent varier de 1 000 à 100 000, n'en font ni une structure solide étendue ni une entité moléculaire (figure 9) [15].

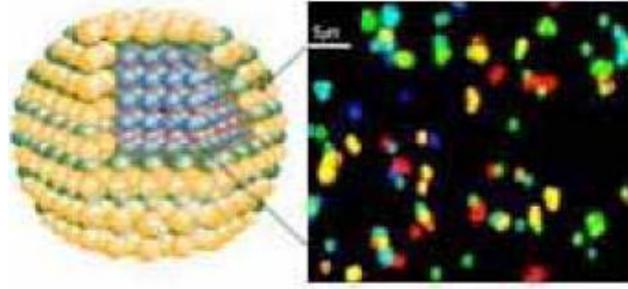


Figure 9 : Représentation schématique et visuelle d'un point quantique [15].

B. Nanoparticules d'oxyde de fer magnétique et supermagnétique

Elles sont formées d'un noyau métallique magnétiquement actif et sont utilisées comme agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Elles sont couvertes d'une couche organique protectrice sur laquelle peuvent être attachées des molécules vectrices. Elles peuvent être encapsulées dans des micelles [14].

C. Nanoparticules de diamants photoluminescents

L'ajout d'une impureté (atome d'azote et/ou de nickel) lors de la production d'un diamant synthétique peut conduire à la formation de centres colorés photoluminescents (exemple : les centres azote-lacune (NV)) [14].

D. Sondes Raman

Formées d'un noyau métallique (or, argent ou bismuth) possédant des propriétés physiques permettant l'étude spectroscopique en imagerie optique, elles sont recouvertes d'une couche de silice [14].

I.5. Procédés de fabrication

Les voies de production de ces nanomatériaux sont extrêmement variées. Les nanoparticules sont synthétisées selon différentes approches : essentiellement par la méthode ascendante « *bottom-up* », ou la méthode descendante « *top-down* » [9].

Par l'approche ascendante ou « *bottom-up* », les nanoparticules sont construites atome par atome ou molécule par molécule (hydrolyse ou condensation d'alkoxydes). Dans l'approche descendante ou « *top-down* », une grande structure est graduellement sous dimensionnée, jusqu'à atteindre des dimensions nanométriques après application de sollicitations mécaniques sévères, de chocs violents et de fortes déformations (broyage) [9].

L'approche ascendante permettrait la production d'une plus grande diversité d'architectures et, souvent, un meilleur contrôle de l'état nanométrique (tailles et distribution granulométrique relativement mono disperse positionnement des molécules, homogénéité des produits). Par opposition, l'un des avantages de la méthode descendante serait une capacité de production plus volumineuse mais un contrôle de l'état nanométrique plus délicat (figure 10) [9].

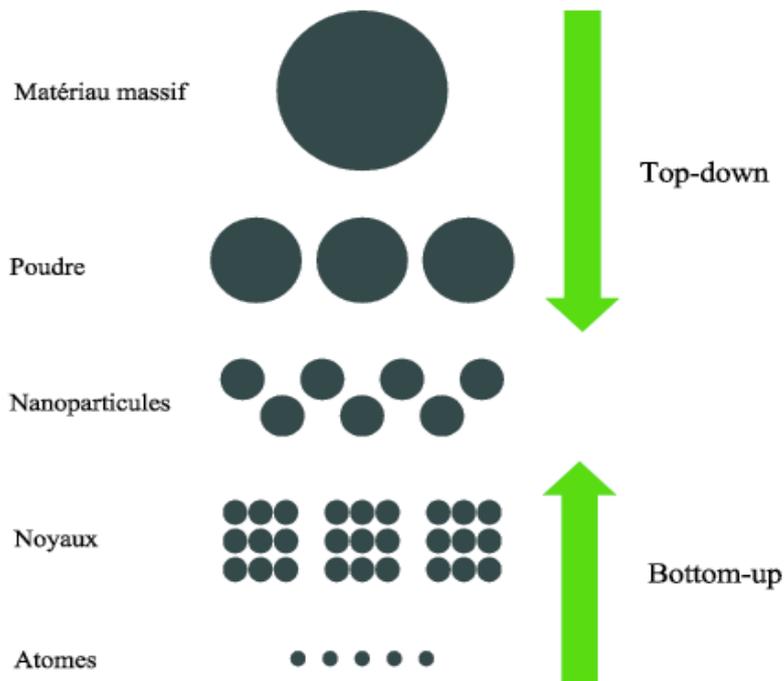


Figure 10 : Représentation schématique des deux types de préparation de nanoparticules "Bottom up" et "Top down" [16].

I.5.1. Méthodes physiques

Dans les procédés physiques récents, les nanoparticules sont généralement synthétisées par évaporation-condensation.

A. Evaporation/condensation

Cette méthode consiste à évaporer un métal par chauffage puis à condenser la vapeur métallique afin d'obtenir des nanopoudres formées de particules nanométriques dispersées. La difficulté de cette technique est le contrôle absolu et homogène des particules à l'échelle nanométrique. Les nanoparticules sont obtenues par refroidissement très rapide de la vapeur métallique. Ce procédé permet de produire de très grandes quantités de particules [9].

B. Ablation laser

Avec cette méthode la poudre cristalline organique de taille micrométrique en suspension dans un non solvant est exposée à un faisceau laser qui induit la fragmentation du cristal. Par conséquent, la suspension opaque est convertie en une solution colloïdale limpide [16].

C. Méthode aérosol

Un aérosol est un ensemble de particules, solides ou liquides, d'une substance chimique donnée en suspension dans un milieu gazeux. La synthèse de nanoparticules peut être obtenue par oxydation dans des flammes à très haute température ou plasma thermique à partir de précurseurs gazeux ou liquides amenés sous forme d'aérosol [9].

I.5.2. Méthodes chimiques

Principaux procédés chimiques:

- Les réactions en phase vapeur (carbures, nitrures, oxydes, alliages métalliques)
- Les réactions et les précipitations en milieu liquide (la plupart des métaux et oxydes)
- les réactions en milieu solide (la plupart des métaux et oxydes)
- Les techniques sol-gel (la plupart des oxydes)
- Les fluides super-critiques avec réaction chimique (la plupart des métaux, oxydes et quelques nitrures)
- Les réactions par coprécipitation chimique ou hydrolyse (métaux et oxydes métalliques);

- La polymérisation en chaîne par étape en phase liquide (polymères organiques tels les dendrimères et les dendrons)
- La polymérisation en phase gazeuse, greffage, électrofilage (polymères organiques tels les dendrimères et les dendrons) [15].

I.5.3. Méthodes mécaniques

Les nanoparticules peuvent être synthétisées selon plusieurs méthodes mécaniques telles que mécanosynthèse et activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres, Consolidation et densification ou encore par forte déformation.

A. Mécanosynthèse et activation mécanique de procédés de la métallurgie des poudres

La mécanosynthèse consiste à broyer des poudres micrométriques (1 à 50 μm) de plusieurs alliages pour les mélanger. Les poudres sont introduites dans un container scellé, accompagnées de billes en acier ou en tungstène. L'ensemble agité fortement, va permettre une déformation plastique accompagnée d'une usure mécanique de haute énergie. La matière est alors raffinée en continu jusqu'à l'obtention d'une taille nanométrique [10].

B. Consolidation et densification

Les techniques de consolidation permettent d'obtenir des pièces massives à partir de matériaux pulvérulents (poudres métalliques, céramiques, semiconducteurs et organiques), Les méthodes de frittage classiques ne permettent pas de conserver la nanostructure initiale des poudres [10].

C. Forte déformation (hypercorroyage)

Une forte déformation permet de raffiner la structure d'un matériau cristallin (métal, céramique), jusqu'à obtenir une taille de grains de quelques dizaines de nanomètres, Les techniques utilisées sont l'extrusion, laminage, coude, torsion, friction, haute vitesse, Cette technique permet généralement une amélioration des propriétés de ténacité et de ductilité du matériau [10].

I.6. Applications médicales des nanoparticules

De nombreux domaines d'activité utilisent déjà des nanoparticules pour améliorer leurs applications. Entre autres, l'industrie automobile, l'industrie chimique, l'industrie électronique, la cosmétologie, la santé, la recherche, l'habitation [9].

Les avantages et applications que procurent les nanoparticules sur le plan médical, environnemental et commercial intéressent les professionnels de la santé, les industriels et les consommateurs [9].

Les nanoparticules permettent d'accroître les performances de nombreux produits. Les performances particulièrement recherchées sont l'absorption des rayons ultra-violet, l'amélioration des qualités textiles, l'effet antimicrobien, l'apport d'une fonction autonettoyante ou antiadhésive de surface, l'augmentation de la dureté ou encore l'apport d'une fonction antiagglomérante ou fluidifiante [9] (Tableau 2).

Tableau 2 : Exemples d'applications actuelles des nanomatériaux [17].

SECTEUR D'ACTIVITE	EXEMPLE D'APPLICATIONS ACTUELLES ET POTENTIELLES
Automobile, aéronautique et aérospatial	Matériaux renforcés et plus légers, peintures extérieures avec effet de couleur plus brillantes, anti-rayures, anti-corrosion et anti-salissures. Capteurs optimisant les performances des moteurs, détecteurs de glace sur les ailes d'avion, pneumatiques plus durables et recyclables. Additifs pour diesel permettant une meilleure combustion...
Electronique et communication	Mémoire à haute densité et processeurs miniaturisés, cellules solaires, bibliothèque électronique de poche, ordinateurs ultra-rapides, technologie sans fil, écrans plats et souples...
Agroalimentaire	Emballages actifs, additifs tels que les colorants, anti-agglomérants et émulsifiant innovants...
Chimie et matériaux	Pigments, charges, inhibiteurs de corrosion, catalyseurs multifonctionnels, revêtements antibactériens et ultra résistants...
Construction	Ciments autonettoyants et antipollution, vitrage antisalissure. Peintures, vernis et colles innovants...
Pharmacie et santé	Médicaments et agents actifs, surfaces adhésives médicales anti-allergènes, médicaments sur mesure délivrés spécifiquement, surfaces biocompatibles pour implants. Vaccins et imagerie innovants...
Cosmétique	Crèmes solaires transparentes, pâte à dentifrice abrasive, maquillage de meilleure tenue...
Energie	Nouveaux types de batteries, fenêtres intelligentes, matériaux isolants plus efficaces...
Environnement et écologie	Diminution des émissions de dioxyde de carbone, production d'eau ultra pure à partir d'eau de mers, pesticides et fertilisants plus efficaces et moins dommageables...
Défense	Systèmes de surveillance miniaturisés, systèmes de guidage précis, textiles légers et protecteurs se réparant eux-mêmes...

I.6.1. Biocapteurs

Un biocapteur est un dispositif analytique utilisé pour analyser des échantillons biologiques. Il convertit une réponse chimique, biologique ou biochimique en signal électrique.

Un biocapteur contient trois composants essentiels :

- bioélément ou biorécepteur
- le transducteur
- l'unité électronique qui contient l'amplificateur, le processeur et l'écran (figure 11) [18].

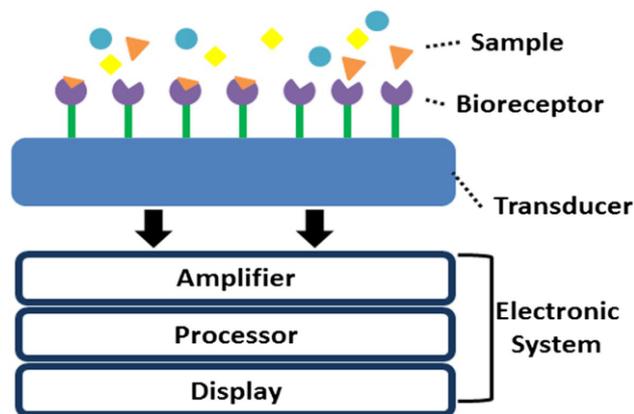


Figure 11 : Schéma d'un biocapteur typique [18].

I.6.2. Hyperthermie magnétique

Le principe de l'hyperthermie est de cibler les cellules cancéreuses avec des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées. Une fois les nanoparticules attachées aux cellules cancéreuses via des ligands, l'application d'un champ magnétique alternatif externe à haute fréquence permet d'engendrer une élévation très localisée de la température (par un échauffement des nanoparticules en précession, en réponse à la rapide variation du champ magnétique). Cette élévation de température permet de détruire ou d'endommager uniquement les cellules cibles ou tumorales [19].

I.6.3. Bioimagerie

Il existe différentes techniques de bioimagerie telles que l'IRM, la tomodensitométrie (CT), la tomographie par émission de positrons (TEP) et l'échographie qui sont utilisées pour la détection et le diagnostic des maladies. Afin d'améliorer le temps d'imagerie et d'augmenter la biocompatibilité des agents de contraste, différents composés tels que les nanoparticules noyau-coquille ont été étudiés comme agents de contraste possibles [18].

I.6.4. Délivrance ciblée des médicaments

Dans le cas de nanoparticules, pour qu'elles puissent effectivement transporter le principe actif jusqu'au tissu ciblé, elles doivent pouvoir rester dans la circulation pendant longtemps sans être éliminées afin d'améliorer l'efficacité du traitement grâce à l'augmentation de la concentration du médicament dans la cible [13].

I.6.5. Photothérapie dynamique et photothermale

Une fois que les photosensibilisateurs, tels que les nanoparticules TiO_2 , sont exposés à la lumière à une longueur d'onde spécifique, des électrons et des trous photo induits sont créés. Les électrons et les trous photo-induits peuvent réagir davantage avec des ions hydroxyles ou de l'eau et peuvent former des radicaux oxydatifs sous la forme d'espèces réactives d'oxygène (ROS) et d'oxygène simple, cette énergie lumineuse peut être convertie en énergie thermique qui peut provoquer une hyperthermie entraînant la mort cellulaire (figure 12) [18].

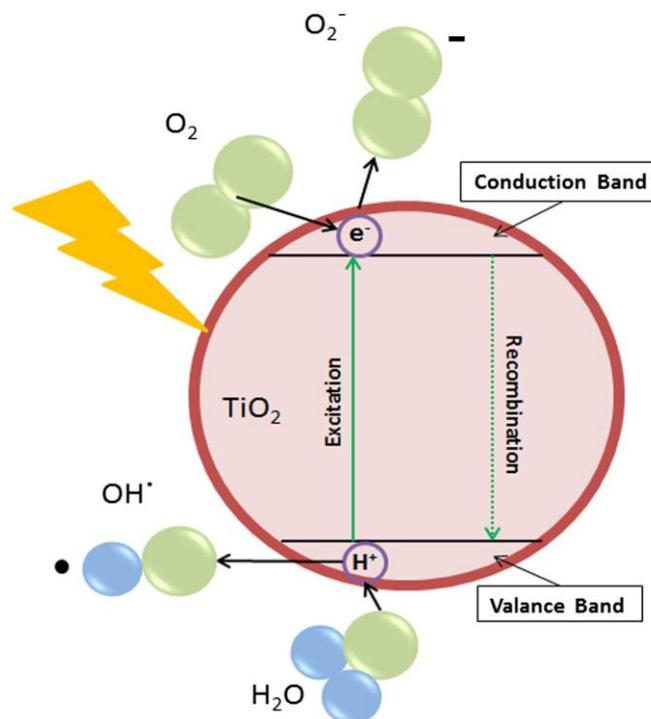


Figure 12 : Schéma montrant le processus photocatalytique des nanoparticules de TiO_2 [18].

I.6.6. Cuivre

Le cuivre (Cu) est un métal de transition bien connu. A l'échelle nanométrique, il se caractérise par une surface spécifique importante et une conductivité élevée.

Ces propriétés en font tout d'abord un matériau intéressant pour des applications électriques, telles que les films, pates, encres ou enduits conducteurs utilisés notamment en micro-électronique, mais aussi dans l'industrie automobile [20].

Il est également utilisé en tant qu'additif dans des lubrifiants, afin d'améliorer leurs propriétés. Le cuivre est aussi utilisé comme matériau de construction, soit en tant que tel, soit sous la forme d'alliages (avec le zinc). Il peut ainsi entrer dans la composition de certains goudrons. Sa résistance à la corrosion permet également son utilisation pour la plomberie, les pièces de monnaie, certains bijoux. Enfin, il peut aussi être utilisé pour la fabrication de polymères plastiques (caoutchouc des pneumatiques par exemple), de textiles, ou encore de certains produits cosmétiques. Les propriétés de réactivité chimique sont aussi exploitées en industrie métallurgique et pétrochimique, où le cuivre nanométrique est utilisé en tant que catalyseur pour la production de composés tels que le méthanol ou le glycol [20].

Sur le plan biochimique, le cuivre est également un élément essentiel, puisqu'il intervient en tant que cofacteur ou catalyseur dans un grand nombre de réactions biologiques et chimiques (transfert d'électrons). Il peut de ce fait être intégré à certains compléments de régime alimentaire. En revanche, s'il est présent en trop grande quantité, il peut causer des dommages cellulaires importants, ce qui lui confère notamment des propriétés antimicrobiennes et antifongiques, les microorganismes étant plus sensibles aux changements d'homéostasie des métaux. De même, des applications biotechnologiques et biomédicales peuvent être envisagées dans le cadre de traitements ciblés (tumeurs, ostéoporose), ou pour le développement de biosenseurs et biomarqueurs pour le diagnostic [20].

I.6.7. Argent

L'utilisation la plus répandue de l'argent sous forme de nanoparticules correspond aux pansements et des masques chirurgicaux aux différents soins employés dans le domaine médical. De plus, l'argent participerait à la guérison anticipée des blessures. En outre, leurs applications et retraits quotidiens sont moins douloureux et ne provoquent pas d'irritations pour le patient que les crèmes (tableau 3) [21].

Tableau 3 : Domaines d'applications médicales de produits contenant des nanoparticules d'argent (AgNps) [21].

Domaines	Applications	Utilités
Hygiène des personnes	-Déodorant (Shiseido), savon, gel bactéricide pour les mains, -Produits cosmétiques, -Sièges des toilettes publiques -Vêtements et textiles...	-Retarder le développement des bactéries et champignons, -Eviter les mauvaises odeurs, -Empêcher l'adhésion des pollens allergènes.
Désinfection des surfaces	-Peintures murales, revêtement de sol, -Revêtement de surfaces d'acier inoxydable pour les équipements médicaux, industries agroalimentaires ou pharmaceutiques ...	-Surtout pour les personnes allergiques aux désinfectants habituels...

Des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux ont également été fabriqués à partir de polymères imprégnés d'argent sous forme métallique ou oxydée, afin de prévenir la formation de biofilms bactériens et donc réduire les coûts d'hospitalisation [21].

L'argent est employé dans l'industrie alimentaire pour éviter les contaminations microbiennes et prévenir l'apparition d'un goût métallique. Des équipements en argent sont utilisés pour la manipulation d'huiles essentielles, de sirops et de jus de fruits et aussi des compléments alimentaires [22].

Les nanoparticules d'argent sont également utilisées pour empêcher le développement d'agents infectieux, notamment les *Legionella*, dans les circuits de distribution d'eau potable, De manière similaire, des systèmes de filtration de l'air contiennent des nanoparticules d'argent incorporées dans le charbon actif composant la membrane [22].

CHAPITRE 02 :

LA CINETIQUE DES NANOPARTICULES

CHAPITRE 02 : LA CINETIQUE DES NANOPARTICULES

II.1. Cadre de l'exposition

L'exposition aux nanoparticules peut avoir lieu dans un cadre professionnel ou privé.

II.1.1. Situations d'exposition professionnelle

En effet, les travailleurs impliqués dans le secteur des nanotechnologies peuvent être exposés au moment de la production même des nanoparticules, ou dans des activités aval telles que la récupération, l'emballage, le transport ou encore de leur stockage [23].

De même l'utilisation et plus précisément la manipulation et l'incorporation dans diverses matrices et usinage de nanoparticules constituent des sources d'exposition supplémentaire. Ainsi que l'exposition peut se produire à la fin de la vie du produit lors du traitement de déchets [24].

II.1.2. Situations d'exposition extraprofessionnelle

Les nanoparticules peuvent être libérées dans l'environnement, dans le cadre de leur cycle de vie, et de ce fait atteindre la population générale qui peut aussi être exposée du fait de l'utilisation de produits contenant des nanoparticules. Ces produits sont déjà disponibles sur le marché [23].

II.2. La cinétique des nanoparticules

Comme toute substance chimique, le devenir des NPs dans l'organisme humain et la toxicité potentielle associée vont dépendre notamment de leurs propriétés physico-chimiques (taille, forme, caractère soluble). Les phénomènes d'absorption, de distribution, le métabolisme et l'excrétion semblent être différents par rapport à une entité chimique classique, à cause de leurs caractéristiques spécifiques.

II.2.1. Absorption

Il est considéré classiquement que les nanoparticules peuvent rentrer au contact direct de l'organisme par trois principales voies d'exposition comprennent l'inhalation, la pénétration cutanée, l'ingestion. Il faut noter de plus que les voies parentérales (intraveineuse, intramusculaire) sont aussi à considérer dans le cadre du développement de la nanomédecine [23] [25].

A. Voie pulmonaire

Cette voie constitue la voie majeure de pénétration des NPs dans l'organisme humain, Leur pénétration pulmonaire est d'autant plus importante que l'individu pratique une activité physique ou présente des fonctions pulmonaires altérées. En effet, pendant la phase d'inhalation, les voies respiratoires apportent l'oxygène nécessaire à l'organisme, mais constituent aussi une porte d'entrée idéale pour les polluants de l'air, dont les nanoparticules qui sont en suspension dans l'air [26].

Les NPs, une fois inhalés peuvent soit être exhalés soit se déposer dans la différente région de l'arbre respiratoire, [27] Ce dépôt varie considérablement par l'action combinée de cinq mécanismes, qui sont [26] :

- **Sédimentation** : action de la gravité sur les particules. Son effet augmente avec la taille, la densité de la particule et son temps de résidence dans les voies respiratoires.
- **Impaction** : liée à l'inertie des particules qui ne peuvent suivre l'écoulement de l'air, du fait des changements de direction imposés par la géométrie des voies respiratoires et des vitesses de l'air. Son effet s'accroît avec la taille et la densité de la particule et la vitesse de l'air.
- **Interception** : lorsque l'extrémité d'une particule rentre en contact avec la paroi d'un conduit, elle se dépose. La probabilité qu'une particule se dépose suivant ce mécanisme augmente lorsque la longueur de la particule augmente relativement au diamètre des conduits des voies respiratoires.
- **Diffusion** : mouvement aléatoire des particules causé par les chocs des molécules d'air sur la particule. Mécanisme important lorsque la vitesse de l'air est proche de zéro et que les particules sont caractérisées par un coefficient de diffusion brownien élevé lié à leur très petite taille ; le dépôt par diffusion est le mécanisme prédominant de dépôt pour les nanoparticules.
- **Attraction électrostatique** : concerne les particules chargées électriquement

Après la déposition des nanoparticules dans région de l'arbre respiratoire, elles semblent migrer facilement vers des sites extrapulmonaires et atteignent alors différents organes cibles avec 2 mécanismes :

- La transcytose à travers l'épithélium du système respiratoire dans l'interstitium, ce qui permet aux nanoparticules d'atteindre le système sanguin directement ou par les lymphatiques et conduit à la distribution de ces nanoparticules dans tout l'organisme.

- Le passage des nanoparticules par les nerfs sensitifs présents dans l'épithélium des voies aériennes, puis leur translocation (processus d'élimination physique) vers les structures du système nerveux central.

Ces mécanismes permettent donc aux nanoparticules inhalées d'atteindre des organes extrapulmonaires, tels que le système sanguin ou le système nerveux [26].

B. Voie digestive

Les NPs peuvent être ingérés directement, par exemple, s'ils sont contenus dans la nourriture ou de l'eau ou comme des médicaments ou des dispositifs d'administrations de médicaments ou par contact avec la bouche et une contamination alimentaire dans certains lieux de travail, bien indirectement suite à leur déglutition après l'élimination respiratoire via l'escalator mucociliaire [28] [29].

Il existe une grande variabilité dans l'absorption gastro-intestinale des NPs, et cela dépend particulièrement de la chimie de la surface des particules et de leur taille. Les données chez l'être humain sont très rare [30]. Le mécanisme le plus commun d'absorption de NPs dans les cellules épithéliales intestinale semble être l'endocytose [31] avec passage systémique surtout avec la translocation dans la lymphe mésentérique, puis par voie systémique vers les différents organes (foie, rate, sang, moelle osseuse, et rein).

C. Voie cutanée

Cette voie représente une importante voie d'absorption des NPs. L'épiderme représente une barrière étroite contre la pénétration des NPs, quantitativement, la translocation dermique sera donc minime ou inexistante dans les conditions normales, mais elle augmente dans les zones de flexion de la peau et de la peau lésée [32] (figure 13).

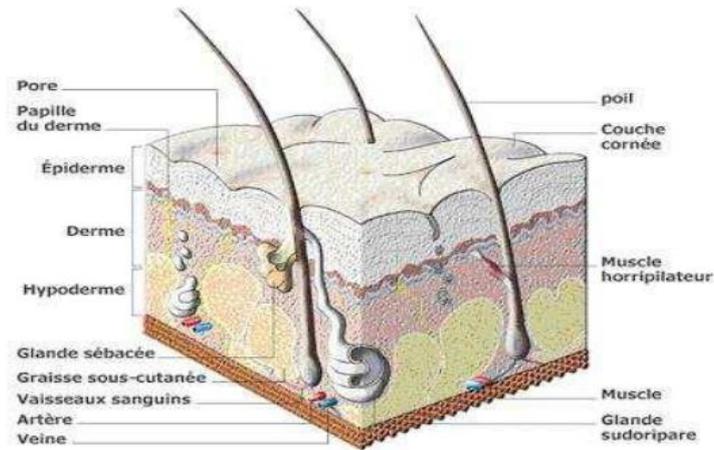


Figure 13 : Schéma de la structure de la peau [26].

Une fois dans le derme, les NPs seront transportés vers les ganglions lymphatiques par les macrophages de la peau et les cellules dendritiques (Langerhans) [33] et ils se retrouvent ainsi dans les ganglions lymphatiques régionaux. Le transport neuronal le long des nerfs sensoriels de la peau et bien établi pour certains NPs, on cite l'exemple de la ferritine nanométrique [34].

Les effets nocifs résultant de l'exposition cutanée peuvent se produire localement après avoir traversé les trois couches constituant la peau ou bien la substance peut être absorbée par la peau et disséminée par la circulation sanguine, ce qui peut entraîner des effets systémiques [26] [29].

II.2.2. Distribution

Une fois les NPs ont été transférés dans la circulation sanguine, ils peuvent être distribués dans tout le corps dans le cerveau, les poumons, le cœur, les reins, les intestins, l'estomac, le foie et la rate [26].

Le foie et le principal site de distribution par absorption par les cellules de Kupffer, suivi par la rate comme autre organe du système réticulo-endothélial, bien que l'enrobage de polyéthylène glycol (PEG) empêche presque complètement la localisation hépatique et splénique [35].

II.2.3. Métabolisme

Peu d'études ont évalué le métabolisme et la dégradation des NPs chez l'être humain [36]. Cependant, Une fois la nanoparticule internalisée, des mécanismes cellulaires de dégradation vont être activés. Pendant cette phase, les phagosomes fusionnent avec les lysosomes, organites intracellulaires de diamètre de 250 à 500 nm possédant une activité enzymatique lytique. Les phagosomes sont considérés comme le « système digestif » de la cellule. La vésicule résultant de cette fusion est appelée phagolysosome et assure la dégradation et le tri des éléments phagocytés [17].

A. Les enzymes lytiques

Les enzymes lytiques des lysosomes appartiennent toutes au groupe des hydrolases acides. Celles-ci peuvent être des protéases, des nucléases, des phosphatases, des lipases, des phospholipases, des glycosidases ou des sulfases et sont présentes en quantité variable selon les types cellulaires [17].

II.2.4. Elimination

Il existe trois voies principales d'excrétion et de clairance des NPs :

A. Elimination pulmonaire

Deux procédés sont impliqués :

- **L'élimination chimique** qui consiste en la dissolution des nanomatériaux solubles dans les fluides biologiques. Les processus d'élimination chimique se produisent dans toutes les régions du système respiratoire [37]. Cette élimination chimique comprend également la lixiviation et la fixation protéique.
- **L'élimination physique** qui consiste au transport des NPs non solubles ou peu solubles vers un ou plusieurs autres sites de l'organisme. Les mécanismes impliqués dans l'élimination physique diffèrent selon les régions du système respiratoire considérées. Les NPs insolubles qui se déposent dans les voies aériennes supérieures et dans l'arbre trachéobronchique sont principalement éliminés par transport mucociliaire en direction du nez et de la bouche. Ils peuvent alors être soit déglutis (et accéder au système digestif) ou soit être rejetés vers l'extérieur (éternuement, mouchage) [38].

Au niveau des alvéoles pulmonaires, ce sont généralement des cellules épuratrice nommées macrophages qui prennent en charge l'élimination des NPs insolubles via le mécanisme de la phagocytose [39].

Les macrophages des voies respiratoires et alvéolaires (AM) sont à l'avant-garde de la défense pulmonaire. L'absorption phagocytaire, de concert avec le transport mucociliaire, est le principal mécanisme pour l'enlèvement des intrus étrangers [40].

La clairance médiée par les AM est sélective selon la taille et la phagocytose des NPs inférieurs à 100 nm est tout à fait inefficace. Les NPs ont tendance à s'agglomérer en raison des forces interpartites à la double couche électrique. Les ions dans les voies aériennes aqueuses où les NPs rencontrent les AM comprimeront la double couche électrique sur la surface du NPs, ce qui mènera à d'autres agglomérations. On trouve toujours dans les alvéoles, au stade initial de l'exposition, des lomérates de taille et de forme remarquablement augmentées, surtout lorsque les NPs sont administrées à des concentrations élevées d'aérosols ou en suspension (instillation intratrachéale/intranasale) [40] (Figure 14).

Ces agglomérats sont assez grands pour être efficacement éliminés par l'absorption phagocytaire suivie par le mouvement mucociliaire, Par conséquent, l'absorption phagocytaire peut être améliorée après la formation d'une corona protéique [40].

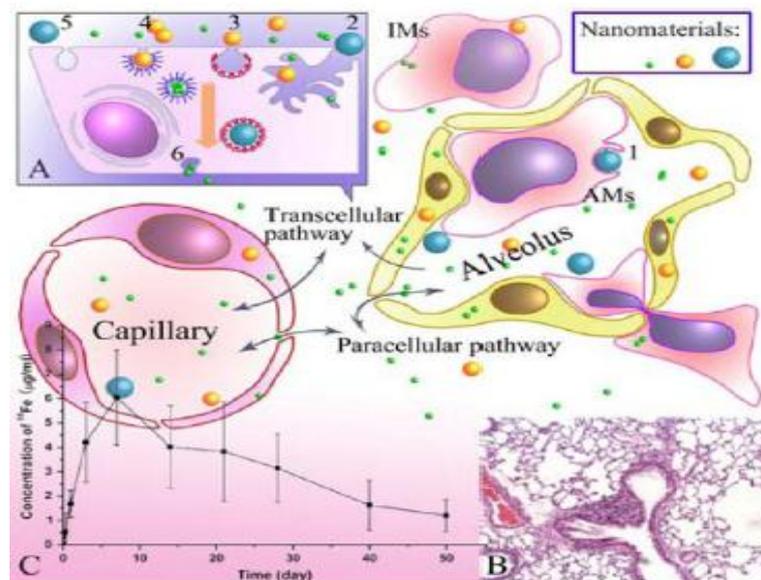


Figure 14 : La clairance pulmonaire des nanomatériaux NM in vivo [40].

La phagocytose « 1 » avec dégagement ultérieur des voies respiratoires par transport mucociliaire est inefficace pour le dégagement des NPs.

D'autres mécanismes d'internalisation « A » comprennent la macropinocytose « 2 », l'endocytose à médiation de clathrine « 3 », l'endocytose à médiation de caveolae « 4 », l'endocytose indépendante de clathrine et de caveolae « 5 ».

Les NPs dans l'alvéole pourraient être transférés dans l'interstitiel par une voie paracellulaire ou transcellulaire, qui est l'absorption cellulaire des NPs avec l'exocytose subséquente dans les vésicules sécrétoires « 6 ».

Les NPs peuvent se déposer dans l'interstitiel pendant une période extrêmement longue en raison de leur résistance à l'absorption phagocytaire, ce qui entraînerait un emphysème pulmonaire et un prosignation de fibrose pulmonaire « B ». Certains des NPs interstitiels pourraient éventuellement pénétrer dans la circulation sanguine « C », IMs : macrophages interstitiels ; AMs : macrophages alvéolaires [40].

B. Elimination urinaire

En général, les NPs ayant un diamètre inférieur à 5-6 nm sont éliminés rapidement du corps par filtration rénale et excréation urinaire [41]. C'est l'exemple des points quantiques dont le diamètre est inférieur à 5,5 nm, excrété dans l'urine rapidement et efficacement [42].

Clairance des NPs. Par rapport au foie, le rein est peu impliqué dans le catabolisme intracellulaire. L'excrétion rénale représente une voie de clairance préférable pour les NPs du corps, La compréhension de la clairance rénale des NPs est fondamentale pour l'évaluation de la toxicité et l'application in vivo des NPs [40].

La clairance rénale comprend la filtration glomérulaire, la sécrétion tubulaire et la réabsorption tubulaire. La filtration glomérulaire est la première étape du dégagement rénal des NPs et affecte directement la capacité de dégagement rénal [40].

Le glomérulon est un lit vasculaire spécialisé composé de trois couches distinctes mais en interaction étroite : un endothélium fenestré (d'un diamètre de 80 100 nm), la membrane de sous-sol glomérulaire (GBM), d'une épaisseur moyenne de 200 400 nm selon les espèces, et les podocytes qui forment une structure extracellulaire spéciale appelée le diaphragme de fente (avec la largeur de fente de 30 40 nm et la taille des pores physiologiques de 4 5 nm dans le

diaphragme de fente entre les podocytes), La taille des pores de GBM, le diaphragme fendu et les composants fixes chargés négativement de l'endothélium tels que les protéoglycanes rendent la barrière glomérulaire très importante et sélective en charge.

L'adsorption des protéines a un effet profond sur le diamètre hydrodynamique et la charge superficielle des NPs, ce qui influence à son tour la filtrabilité rénale et déplace probablement la voie d'excrétion du rein au foie [40] (figure 15).

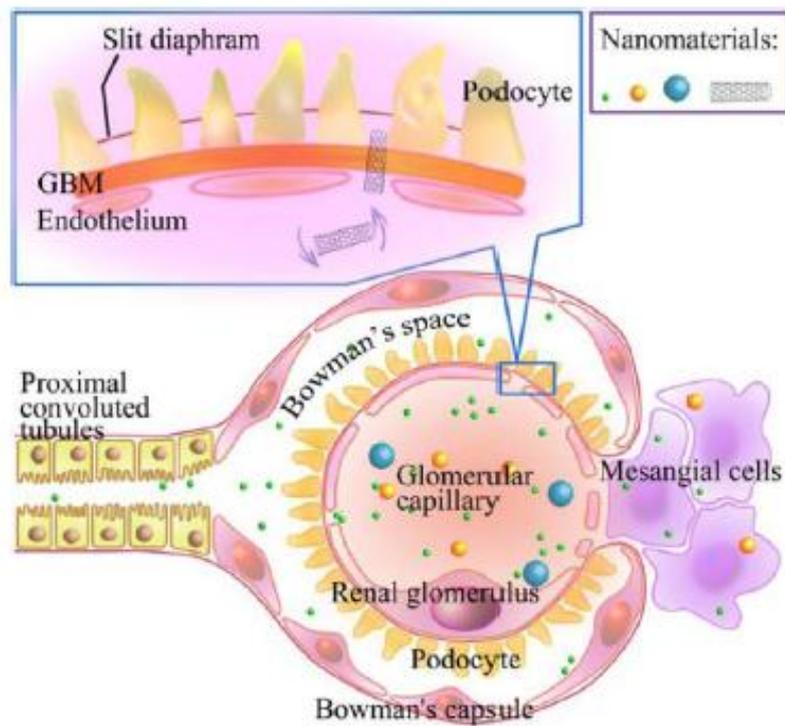


Figure 15 : Filtration glomérulaire de nanomatériels NM vivo [40].

NPs est large que la taille des pores dans le GBM mais inférieure à la taille des pores endothéliaux peut entrer dans le mésangium glomérulaire et s'accumuler dans les cellules mésangiales ou à travers le pore endothélial et le dépôt dans le GBM. NPs est plus petite que la taille des pores du diaphragme à fente peut être filtrée par glomérulus. Des degrés élevés d'alignement des CNT perpendiculaires au filtre glomérulaire augmentent la probabilité que les CNT se déplacent à travers le glomérulon [40].

C. Élimination hépatobiliaire

L'une des fonctions physiologiques du foie est de capturer efficacement et d'éliminer les particules à l'échelle de 10-20 nm pour la clairance des virus et autres petites particules. À la suite de cette adaptation, les agents de cette gamme de taille subissent souvent une absorption hépatique rapide, et ce sont les cellules de Kupffer (Kcs) phagocytaires qui servent de pièges mécaniques hautement adaptés pour l'élimination des NPs du sang [43].

Les Kcs phagocytaires et les hépatocytes (les cellules dominantes dans le foie) représentent deux voies principales pour la clairance hépatique des NPs [40].

La taille des NPs joue un rôle important dans la modulation du type de cellule cible ainsi que la voie de dégradation dans le foie. En général, les NPs de plus de 200 nm sont efficacement éliminés par les Kcs parce que la lenteur du flux sanguin dans les sinusoides du foie laisse suffisamment de temps pour la phagocytose et la macropinocytose des NPs [40].

Les NPs de polystyrène (20 nm) étaient internalisés par les hépatocytes et observés dans les canaux biliaires, ce qui indique une élimination possible par la bile [40].

L'interaction biophysique entre les NPs et les composants biologiques (fluides biologiques, phagosome, endosome, lysosome, protéines, enzymes, etc.) détermine la voie de clairance spécifique des NPs. La dégradation lysosomale associée est une voie dominante pour la clairance Kcs des NPs en raison des activités supérieures des enzymes lysosomiques [40].

Lorsque les NPs sont piégés dans le lysosome Kc, le microenvironnement acide des Kcs et le grand nombre d'enzymes hydrolasiques acides peuvent causer la dissolution ou la dégradation enzymatique des NPs.

Toutefois, pour les NPs qui sont difficiles à décomposer par des processus intracellulaires, tels que les nanoparticules d'or inertes, les NPs sont présentes dans les cellules et se déposent dans le foie pendant longtemps. Dans les études thérapeutiques ou toxicologiques, lorsque les doses de NPs dépassent la capacité de biodégradation hépatique, l'excès de NPs s'accumule également dans l'organe sur une longue période [40] (Figure 16).

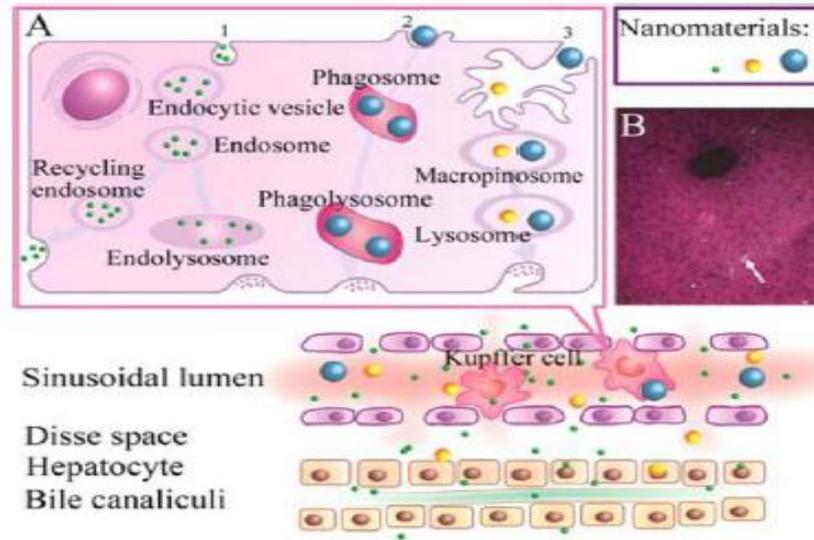


Figure 16 : Clairance hépatique des NM in vivo [40].

Les NPs plus grands peuvent être absorbés et éliminés par les cellules de Kupffer; les NPs plus petits peuvent également traverser l'endothélium dans l'espace de Disse, puis être retournés à la circulation lymphatique ou être absorbés par les hépatocytes et par la suite impliqués dans une voie d'excrétion biliaire. (A) Kupffer voies de clairance à médiation cellulaire de NPs : (1) NPs via caveolae- ou clathrine-médiée endocytose ont trois destins différents, l'accumulation dans la vésicule endocyttaire, le transport dans le compartiment endosome, puis être clairance par une voie endolysosomique, ou le transport vers un endosome de recyclage et la libération dans la circulation sanguine en tant que NPs intacts(2) NPs via phagocytose peut être intériorisé en phagosome et ensuite être nettoyé par voie phagolysosomique; (3) NPs peut être pris en macropinosomes par macropinocytose et ensuite être dégradé par fusion de macropinosomes avec lysosomes. (B) Images de fluorescence de quantum dots(QDs) dans le foie. Les flèches montrent les Qds agrégés accumulés dans les lobules hépatiques [40].

CHAPITRE 3 :

TOXICITE DES NANOPARTICULES

CHAPITRE3 : TOXICITE DES NANOPARTICULES

L'étude des effets biologiques des nanoparticules sur la santé de l'Homme et l'environnement, est nécessaire au développement des nanotechnologies.

III.1. Les effets toxiques des nanoparticules sur la santé :

III.1.1. Mécanismes moléculaires de la toxicité des NP

Plusieurs mécanismes biologiques ont été décrits comme potentiellement responsables de la toxicité des NP. La présence d'un stress oxydant et l'induction d'une réponse inflammatoire, généralement liées, sont les deux mécanismes les plus souvent évoqués. Cependant, des données plus récentes de la littérature suggèrent également l'importance de la génotoxicité, mais aussi de la corona protéique, dans la toxicité des NP [44] (Figure 17).

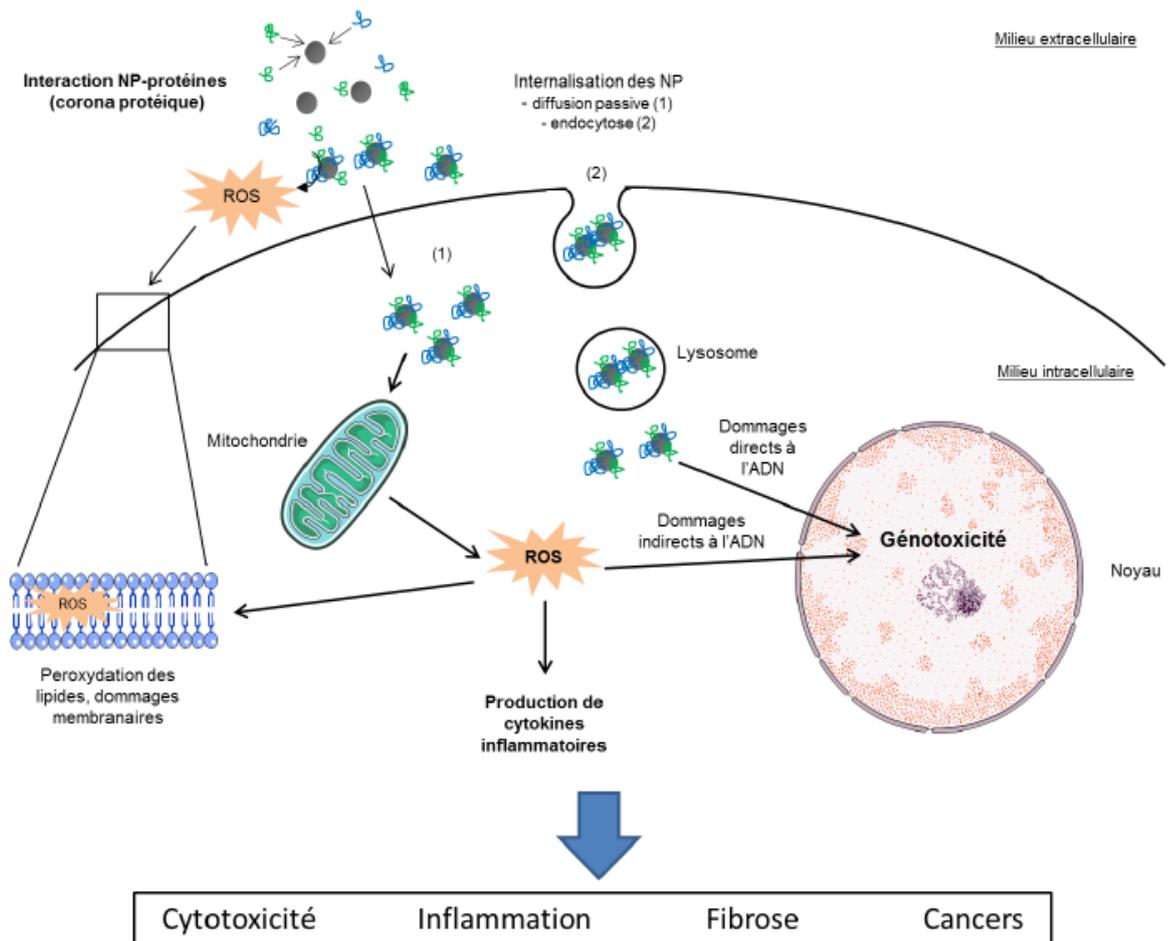


Figure 17 : Mécanismes potentiellement impliqués dans la toxicité des NP [44].

A. Stress oxydant

Le stress oxydatif est une perturbation de l'équilibre prooxydant-antioxydant en faveur du premier, entraînant des dommages. Le stress oxydant est un des principaux mécanismes de cytotoxicité des NPs [45].

Dans sa forme la plus simple, le stress oxydatif est alors un processus potentiellement nocif, qui se produit lorsqu'il y a un excès de radicaux libres, une diminution des défenses antioxydantes, ou une combinaison de ces événements [39].

Pour compliquer, il a récemment été démontré que de faibles niveaux de stress oxydatif sont impliqués dans les voies de signalisation à l'intérieur de la cellule, en particulier ceux impliqués dans la régulation des réponses immunitaires. Par conséquent, toutes les formes de stress oxydatif ne sont pas nuisibles à la cellule, et, en fait, certains pourraient être très bénéfiques [46].

Dans des circonstances normales, les électrons orbitent autour des atomes par paires, ayant des spins opposés. Quand un atome a un seul électron non apparié, sa réactivité augmente considérablement, et il est désigné comme un radical libre [46].

En milieu biologique, les radicaux libres sont potentiellement très dangereux car ils peuvent réagir indistinctement avec les molécules voisines. Ce processus de « vol d'électrons » conduit à l'oxydation, et souvent à l'inactivation des molécules cibles [46].

B. Inflammation

L'induction d'une réponse inflammatoire est un phénomène fréquemment décrit suite à l'exposition à des NP en général, et de NP de TiO₂ en particulier. Cette inflammation se manifeste généralement précocement et est caractérisée par un afflux de cellules inflammatoires, pouvant être transitoire ou persistant, [44] Ce processus prédominant impliqué dans plusieurs effets pathologiques des NPs tel que les maladies pulmonaires, les maladies neurodégénératives et le cancer [43].

Le recrutement de cellules inflammatoires s'accompagne d'une production de cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α , CXCL1, IL-1 β , IL-6, ou IL-8, qui vont participer à l'entretien et l'amplification de la réponse inflammatoire ainsi que l'induction d'une réponse inflammatoire peut également résulter d'un stress oxydant [44].

Des NP induisent un stress oxydant à l'origine d'une inflammation dans des cellules épithéliales bronchiques. En effet, la catalase, un antioxydant, prévient l'inflammation induite par ces NP. De plus, *in vivo*, l'administration de NAC chez des rats exposés à des NP de TiO₂ prévient la production d'IL-6 et de TNF- α [44].

C. Génotoxicité

La génotoxicité d'une substance se définit comme sa capacité à induire des lésions de l'ADN se traduisant par un dysfonctionnement cellulaire pouvant conduire à des cancers. Les effets génotoxiques des NP peuvent résulter d'une génotoxicité directe, ou bien d'une génotoxicité indirecte [44].

Génotoxicité primaire : induite par une interaction directe des NPs avec le matériel génétique ou indirectement par production d'espèce réactive d'oxygène, libération des ions toxiques par des NP soluble ou encore inhibition de la réparation de l'ADN [47].

Génotoxicité secondaire : principalement liée à l'inflammation via des composants oxydants provenant notamment de l'endocytose et ou phagocytose des NPs [44].

D. Interaction directe des NPs avec les composants cellulaires

Les NPs, du fait de leur taille ainsi que de leurs propriétés de surface particulières peuvent adsorber des molécules biologiquement actives [48] comme des molécules de signalisation cellulaire (des hormones) ou de protéines structurales (la tubuline), induisant ainsi une souffrance et parfois la mort cellulaire [45].

A titre d'exemple, la toxicité des particules de ZnO pour les cellules normales peut être inférieure à celle des cellules tumorales correspondantes. De plus, les fuites de LDH ont reflété des dommages à la membrane cellulaire et le degré de nécrose cellulaire. La forte élévation du LDH indique que les particules de ZnO ont détruit l'intégrité de la membrane cellulaire et pourraient causer la nécrose cellulaire. Cependant, à faible dose, 5 g/ml de 10-30 nm ZnO et 10 g/ml d'autres particules de ZnO de trois tailles ont évidemment réduit la viabilité cellulaire, mais n'ont pas induit l'élévation du niveau de LDH par rapport à le témoin, ce qui implique qu'une faible dose de particules de ZnO n'a pas causé de dommages à la membrane cellulaire et de nécrose cellulaire, mais a induit une apoptose [49].

L'interaction des NPs avec des protéines de surface cellulaire telles que les récepteurs peuvent induire des réponses biologiques divers notamment une stimulation de la prolifération cellulaire, apoptose ou induisant une réponse inflammatoire. Les NPs peuvent également avoir une action directe sur les organites cellulaire comme : les mitochondries [45].

Certaines nanoparticules ont entraîné une cytotoxicité pour de nombreux types de cellules, comme les cellules épithéliales bronchiques humaines, les cellules épithéliales pulmonaires humaines; cellules de kératinocyte humain, cellules épidermiques humaines, cellules épithéliales et macrophages alvéolaires chez le rat, cellule de macrophage chez la souris, mésothéliome et cellules de fibroblastes chez les rongeurs, fibroblastes embryonnaires de souris primaires, fibroblastes pulmonaires embryonnaires humains, astrocytome humain (astrocytes-like) cellules [49].

Interaction avec la corona protéique

La formation de ces complexes NP-protéines est communément désignée sous le nom de « corona protéique ». L'adsorption et la désorption de biomolécules à la surface des NP est un phénomène dynamique, intervenant au site d'entrée des NP dans l'organisme et qui dépend des caractéristiques physico-chimiques des NP et de la nature de l'environnement physiologique (sang, liquide interstitiel, cytosol...). De plus, les protéines adsorbées à la surface des NP peuvent elles aussi être modifiées et altérées [44].

La corona protéique la plus décrite est celle se formant dans le plasma sanguin, la majorité des biomolécules adsorbées à la surface des NP sont des protéines. L'adsorption des protéines à la surface des NP est gouvernée par les affinités de liaison entre NP et protéines mais aussi entre les protéines entre elles [44].

La nature de l'interaction entre NP et protéines peut modifier la structure et donc la fonction des protéines adsorbées, affectant ainsi la bioréactivité des NP. Dans la plupart des cas, ces changements conformationnels des protéines sont irréversibles après désorption. Par exemple, les NP de TiO₂ pouvaient induire des changements conformationnels de la tubuline, une protéine essentielle du cytosquelette, réduisant ainsi sa polymérisation [44].

III.1.2. La toxicité à l'échelle tissulaire

A l'échelle tissulaire, la toxicité des NPs est dominé par :

A. Pneumotoxicité

En raison de la plus grande surface des poumons, les NPs ont une voie d'entrée primaire.

Bien que les particules les plus grosses (plus de 10 μ m) tendent à se déposer dans la partie supérieure du système respiratoire et à être éliminées facilement par la toux et les éternuements, des particules nanométriques plus petites peuvent atteindre les surfaces d'échange gazeux et y rester plus longtemps [50].

La pénétration, la déposition, la translocation et l'élimination pulmonaire des NPs ont des effets biologiques potentiels sur l'appareil respiratoire (stress oxydant, inflammation, génotoxicité) [3].

L'exposition par inhalation est associée à des affections respiratoires aiguës allant de :

- L'irritation et de l'inflammation à la bronchite, à la fibrose pulmonaire, à l'asthme et à l'œdème pulmonaire [51].
- La survenue ou l'aggravation de pathologies respiratoires.
- Aussi de graves infections pulmonaires (tel que la grippe et la tuberculose) [52].

B. Toxicité Cardio-vasculaire

Les NPs peuvent atteindre la circulation systémique par plusieurs voies et augmentent les risques d'accident cardiaque [3] car le cœur est le premier organe à recevoir du sang des poumons et, par conséquent, le deuxième au poumon, potentiellement la plus forte concentration de NP [53].

En effet, une fois les NPs présentes dans le sang, elles ont tendance à s'accumuler sur les vaisseaux endommagés et fragiles des patients ayant déjà été victimes d'un accident cardiaque [54]. Il existe une possibilité théorique d'effets vasculaires directs, ou de stress oxydatif dans le poumon causant la libération de médiateurs qui pourraient altérer l'homéostasie endothéliale et hématie et affecter la coagulation sanguine [53]. Cependant, l'exposition aux particules peut induire des événements cardiovasculaires morbides et mortels tels que l'athérosclérose [52].

C. Neurotoxicité

Les NPs peuvent pénétrer dans le corps humain par diverses voies et peuvent ensuite être distribuées par circulation systémique à divers organes, notamment le cerveau [55]. Les NPs peuvent atteindre le cerveau par le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) après

perturbation directe des membranes cellulaires de cette barrière. Ils peuvent également passer par la voie du nerf olfactif [56].

Les données humaines sur les dangers potentiels pour le cerveau de l'exposition aux NPs dans des conditions réelles sont limitées. On cite comme exemple des études menées à Mexico indiquent que l'exposition à une pollution atmosphérique sévère, y compris les particules d'échappement diesel, est associée à une inflammation cérébrale par augmentations de la production de cyclooxygénase-2 (COX2) (un médiateur de l'inflammation) et accumulation de β -amyloïde (marqueur de la maladie d'Alzheimer) [56].

D. Immunotoxicité

Des NPs peuvent entraîner des effets adjuvants (pouvant induire des réactions d'hypersensibilité ou d'allergie) dans le cas des NPs utilisées à cette fin dans les vaccins [12].

Par ailleurs, de nombreuses interactions avec le système immunitaire ont été mises en évidence : réactions inflammatoires très fortes, immunostimulation, immunosuppression (par exemple des nanotubes de carbone par blocage des lymphocytes B), ou encore réactions auto-immunes [3].

Les cellules de l'immunité ne parviennent pas nécessairement à éliminer les NPs et peuvent elles-mêmes s'en trouver dégradées voire éliminées (ex : apoptose des macrophages) [57].

Des altérations in vitro de la fonction normale de présentation de l'antigène d'un mélange macrophage/cellule T à l'antigène protéique de l'ovalbumine se sont produites avec les SWCNT et les MWCNT (tous deux 50 $\mu\text{g/ml}$), mais pas avec les fullerènes. Des résultats similaires ont été obtenus pour les macrophages alvéolaires et de moelle osseuse. Les changements étaient dus aux nanoparticules de carbone (CNP) accumulées dans la membrane de plasma cellulaire qui ont perturbé les radeaux de lipides membranaires. La réponse des voies respiratoires à la méthacholine nébulisée 24 heures après l'administration intranasale de 150 μg de CNP/souris a été améliorée par les trois CNP [53].

E. Toxicité de la flore intestinale

Des NPs (argent, zinc, titane...) sont très utilisées industriellement pour leurs propriétés bactéricides, avec des conséquences inquiétantes sur la flore intestinal. De ce fait, une perturbation du microbiote gastro intestinal a été mise en évidence par plusieurs études récentes, à titre d'exemple l'exposition orale à des NPs d'argent a été associée avec l'inflammation du colon (colite) ainsi une abondance des bactéries gram négatifs [58].

F. Reprotoxicité

Le terme général de reprotoxicité désigne deux aspects : la toxicité développementale et la toxicité sur la reproduction.

Concernant la toxicité sur le développement embryonnaire, un grand nombre d'études expérimentales animales est déjà paru et montre un passage transplacentaire de certaines NPs et une perturbation du développement embryonnaire.

Sur la reproduction, les NPs sont responsable d'une atteinte des cellules gonadiques masculines par plusieurs mécanismes [59].

III.2. Les effets toxiques des nanoparticules sur l'environnement

L'état des connaissances sur les effets des nanoparticules de la pollution atmosphérique fait craindre des effets des nanoparticules fabriquées par l'homme sur la santé. Cependant, très peu de données fiables dans le sens de reproduites par différentes équipes de recherche sont disponibles actuellement dans ce domaine. Mais les études publiées font état d'interactions des nanoparticules avec le vivant au niveau cellulaire, études qui incitent à la prudence [60].

Les effets sont réputés être corrélés à la quantité de produit auquel l'animal ou l'homme sont exposés : Plus grande est la masse absorbée, plus grand est l'effet [60].

Cependant, pour beaucoup de NPs les informations sont partielles voire manquantes sur le devenir dans l'environnement (photodégradation, stabilité en solution aqueuse, transport entre compartiments, biodégradation) qu'il soit aquatique, terrestre ou aérien. La faible production de données d'écotoxicologie et d'évaluation du risque environnemental conduit à concentrer les discussions sur les seuls bénéfiques. La prise de considération insuffisante des risques dans les décisions, notamment pour les écosystèmes, joue probablement un rôle dans le rejet des NPs par le public et la défiance envers les scientifiques et les industriels [61].

On peut envisager deux types d'impacts des nanoparticules industrielles sur les organismes vivants :

- Un effet direct lié à une toxicité intrinsèque (assimilation cellulaire directe des nanoparticules par les différents organismes).
- Un effet indirect lié à la présence de polluants adsorbés à leur surface (oxydes, phosphates, silicates) ou dans leur structure (nanotubes de carbone, fullerènes, etc.) [10].

III.2.1. Toxicité pour la flore

Il n'existe pas de données concernant la toxicité directe ou indirecte des nanoparticules sur la flore. Compte tenu de leur taille, les plantes pourraient absorber les nanoparticules présentes dans les sols par leur système racinaire et celles présentes dans l'air par leurs stomates. Par ailleurs, ces nanoparticules pourraient entraîner des effets indirects sur les végétaux du fait de la présence de polluants à leur surface ou piégés dans leur structure [10].

III.2.2. Toxicité pour la faune

En ce qui concerne la toxicité de ces nanoparticules vis-à-vis de la faune, il faut noter le faible nombre et le caractère contradictoire des données disponibles. La majorité des données disponibles provient de trois équipes de recherche. Cependant, aucune mortalité n'a été enregistrée après 48 h sur *Pimephalespromelas* (poisson de la famille des cyprinidae) exposés à [0,5 mg/l] [10].

III.3. Facteurs influençant la toxicité des nanoparticules

La surface spécifique, le nombre de particules, la taille et la distribution granulométrique, la concentration, l'état de surface (charge électrique et contamination), le degré d'agglomération des particules et le site de déposition dans les poumons, la charge électrique de surface, la forme, la porosité, la structure cristalline, le potentiel d'attraction électrostatique, la méthode de synthèse des particules, le caractère hydrophile/hydrophobe et les modifications post-synthèse (le recouvrement de surface pour empêcher l'agglomération) [53].

III.3.1. Les caractéristiques physiques

A. La taille des nanoparticules

La taille des nanoparticules serait un paramètre déterminant au regard des phénomènes d'internalisation intracellulaire et de la taille des vésicules formées. Bien que la majorité des nanoparticules puissent être internalisées par des cellules, différentes études tendent à démontrer que ces dernières privilégient l'internalisation des nanoparticules dont le diamètre est autour de 20-50 nm.

B. La forme des nanoparticules

La forme des nanoparticules (sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes) semble également conditionner leurs effets biologiques, Des particules de polystyrène sphériques sont plus internalisées par des macrophages NR8383 que des particules en forme de bâtonnets.

III.3.2. Les caractéristiques chimiques

Pour les mêmes raisons de capacité d'interaction avec la membrane cellulaire, la fonctionnalisation chimique de la surface de la nanoparticule pourrait moduler la pénétration des nanoparticules au travers des membranes cellulaires

A. La fonctionnalisation de surface des nanoparticules

La fonctionnalisation de surface des nanoparticules, par différents groupements chimiques, leur confère un potentiel de surface spécifique. Seulement, actuellement il n'est pas possible de mesurer le potentiel de surface des nanoparticules à cause des couches ioniques qui les entourent en solution. Cependant, leur charge électrique globale, caractérisée par le potentiel zêta de la suspension de nanoparticules au niveau de la couche de cisaillement délimitant le milieu qui suit la particule, peut être mesuré. Le potentiel zêta est relié à la mobilité électrophorétique des nanoparticules en solution ce qui permet de le mesurer, comme la taille de la nanoparticule, par la technique de diffusion dynamique de la lumière.

Les nanoparticules présentant des groupements de surface induisant un potentiel zêta positif interagissent plus facilement avec les membranes cellulaires de potentiel de surface électro statiquement négatif indépendamment du matériau composant la nanoparticule.

Des nanoparticules super-paramagnétiques enrobées de silice et mises au contact des cellules issues de cancers du sein (MCF10A) et de prostate (PC-3) n'étaient pas internalisées lorsqu'elles étaient fonctionnalisées avec des groupements carboxyles tandis qu'elles l'étaient lorsqu'elles étaient fonctionnalisées avec des groupements amines [17].

B. Les types cellulaires

Des nanoparticules de polystyrène de 100 nm de diamètre, a montré que des monocytes non phagocytaires (THP-1) ingèrent bien préférentiellement les nanoparticules cationiques, mais qu'à l'inverse ces cellules différenciées en macrophages phagocytaires ingèrent préférentiellement les nanoparticules anioniques. Ainsi, la nature de la cellule semble conditionner les interactions avec les nanoparticules.

La forme de la particule a plus d'impact que sa charge ou encore sa taille sur l'internalisation par les macrophages [17].

III.3.3. Les caractéristiques secondaires

Le degré d'agglomération des nanoparticules, généralement imputé aux forces de Van der Waals, est lié aux forces électrostatiques et aux tensions de surface de la nanoparticule dues à la composition du milieu environnant. Ainsi, les nanoparticules tendent plus ou moins à s'agglomérer entre elles en fonction de leur forme et des groupements chimiques fixés à leur surface. Les nanoparticules peuvent également s'agréger entre elles sous l'action de forces plus importantes, rendant ainsi leur séparation plus difficile. Les phénomènes d'agglomération et d'agrégation des nanoparticules peuvent laisser supposer une interaction différente avec les cellules du fait de la modification de leur diamètre géométrique et de leur potentiel zêta. Les nanoparticules ont aussi tendance à former des agrégats en milieu biologique avec les autres constituants du milieu comme les protéines [17].

CHAPITRE 4 :

ACTIVITE ANTIBACTERIEN DES

NANOPARTICULES CUIVRE ARGENT

CHAPITRE 4 : ACTIVITE ANTIBACTERIEN DES NANOPARTICULES CUIVRE ARGENT

IV.1. Définition

IV.1.1. Cuivre

Le cuivre est un oligo-élément, présent dans l'organisme à faible concentration (1.5 à 3 mg/kg/jour apport quotidien) et il est nécessaire au bon fonctionnement de certains enzymes ainsi que la stimulation du système immunitaire contre les infections et un élément essentiel pour maintenir l'homéostasie. Cependant, Il joue un rôle bénéfique pour les organismes supérieurs (animaux) et non pour les organismes inférieurs (virus et bactéries). Donc sa présence à l'intérieur de la cellule bactérienne est considérée comme étrangère donc il est connu toxique envers les microorganismes [62].

IV.1.2. Argent

Le nom scientifique « argent » vient du latin *argentum* qui dérive du mot grec *argyros* qui signifie blanc étincelant ou blanc clair. Le mot néerlandais *zilver* dérive de l'ancien saxon *silubar* qui est devenu *silbar* en allemand ancien et *silber* en allemand moderne [63].

IV.2. Sources

IV.2.1. Cuivre

Le cuivre est présent naturellement dans la croûte terrestre et dans les océans, les lacs, les rivières sous différentes formes et concentrations. C'est un des métaux existant à l'état natif, cependant il est majoritairement présent sous la forme de minerais. La teneur moyenne en cuivre de l'écorce terrestre est de 55 ppm¹⁸. La concentration moyenne en cuivre varie entre 13 et 24 mg/kg dans les sols.

Les principales sources de cuivre dans l'alimentation sont les fruits de mer, les abats (notamment foie), les céréales à grains entiers, les noix, le raisin, les légumes et le chocolat [64]. Les eaux minérales peuvent également être une bonne source de cuivre [65].

Le cuivre est raffiné à partir de minerais présents en de nombreux endroits de la surface du globe. Les cinq plus grands pays extracteurs sont le Chili, les Etats-Unis, le Pérou, l'Australie et la Russie [64].

IV.2.2. Argent

L'argent est un élément assez rare à la surface de la Terre. Son clarke est à 0,1 g par tonne. Il est présent à l'état naturel dans les sols des pays suivants :

- Pérou
- Mexique
- Saxe
- Norvège

On le trouve sous la forme de fils, parfois en veines dans d'autres matériaux mais aussi quelques fois sous la forme de cristaux ou pépites, isolés ou non [66].

IV.3. Propriétés

IV.3.1. Cuivre

Avec l'or, le cuivre est le seul métal naturellement coloré et le meilleur conducteur d'électricité et de la chaleur après l'argent. La présence moyenne dans l'ensemble de l'écorce terrestre est de 55 g à la tonne. Sa présence dans les organismes vivants est de 1 à 10 mg/kg.

A. Propriétés chimiques

Aptitude à la constitution d'alliages

La plupart des éléments sont solubles dans le cuivre, et peuvent constituer avec lui des alliages dont certains ont des applications d'un intérêt considérable. On peut introduire dans le cuivre jusqu'à 100 % de nickel, 40 % de zinc, 25 % d'étain et 15 % d'aluminium.

Résistance à la corrosion

Le cuivre et ses alliages ne sont pas attaqués par l'eau ni par un grand nombre de produits chimiques. Cette propriété est mise à profit pour fabriquer des canalisations en cuivre ou des récipients et conteneurs pour de nombreuses industries. La robinetterie est en laiton ou en bronze. Les toitures en cuivre défient le temps.

B. Propriétés biologiques

Le cuivre est un oligoélément indispensable à la vie sur terre : l'homme et les animaux ont besoin d'absorber quotidiennement quelques milligrammes. Il est par exemple indispensable pour assurer la formation de l'hémoglobine du sang. Le cuivre a des propriétés hygiéniques reconnues. Il élimine naturellement les micro-organismes et les bactéries et assainit les canalisations qui sont utilisées dans le monde entier pour la distribution de l'eau. Le cuivre est également utilisé dans la fabrication de la bière, de certains fromages, des confitures et pour la distillation des alcools.

C. Propriétés mécaniques**Usinabilité et traitements de surface**

Le cuivre n'a pas en lui-même une grande aptitude à être usiné. En revanche, certains de ses alliages, et tout particulièrement le laiton ont d'excellentes capacités d'usinabilité et notamment aux grandes vitesses. Le cuivre et ses alliages se prêtent très bien à la plupart des traitements de surface.

Malléabilité et plasticité

Le cuivre est un métal extrêmement ductile. Non allié, il n'y a pratiquement pas de limite à son travail à froid. Le cuivre et les alliages cuivreux se laminent facilement en tôles, se martèlent en feuilles très minces et s'étirent en fils extrêmement fins. Ils se prêtent particulièrement bien à la déformation à chaud.

Soudabilité

Le cuivre et ses alliages se soudent bien, qu'il s'agisse de soudage autogène, de soudure électrique, de brasage ou de soudage à l'étain.

D. Propriétés physique**Propriété électrique**

La caractéristique essentielle du cuivre est sa qualité de bon conducteur de l'électricité. La conductibilité électrique du cuivre a été prise comme référence par la Commission Électrotechnique Internationale en 1913 et la résistivité du cuivre, d'une valeur de 1,724 microhm. cm à l'état recuit, est l'étalon de cette mesure. La conductibilité du cuivre est, par définition, égale à 100 % IACS (International Annealed Copper Standard). Seul l'argent a des performances légèrement meilleures sur ce point (environ 106 IACS).

La solidité du fil cuivre et la fiabilité des contacts qu'il permet d'obtenir sont les raisons essentielles de l'emploi généralisé du cuivre dans toute l'industrie de la construction électrique, dans la distribution de l'énergie électrique, dans la fabrication du matériel électrique et des composants électroniques. A titre d'exemple, 95 % des fils conducteurs d'un Airbus sont en cuivre. Si une très haute fiabilité de contact est nécessaire, comme dans un satellite, on envisage alors une dorure, une argenture ou un étamage : le cuivre s'adapte très bien à ces revêtements de surface.

Conductibilité thermique

Le cuivre étant le métal usuel conduisant le mieux la chaleur. Cette propriété est mise à profit pour chauffer ou refroidir rapidement un liquide ou un gaz : chauffe-eau ou chaudières murales, radiateurs de véhicules, condenseurs et réchauffeurs des centrales électriques, thermiques, nucléaires. Ce dernier exemple représente environ 200 tonnes d'alliages de cuivre pour 1000 mégawatts installés.

Amagnétisme

Le cuivre est amagnétique. Cette propriété lui vaut de nombreuses applications, en tout premier lieu dans l'horlogerie, mais aussi dans la construction électrique et électronique, et dans l'armement (dragageurs de mines) [67].

IV.3.2. Argent

A. Propriétés physiques

L'argent cristallise dans le système cubique. La maille élémentaire est cubique à faces centrées et son paramètre cristallin est de 0,407 72 nm. Sa masse volumique est voisine de $10,5 \cdot 10^3 \text{ kg (m}^{-3})$ à la température ordinaire et de $9,51 \cdot 10^3 \text{ kg (m}^{-3})$ à l'état liquide immédiatement au-dessus de la température de fusion ($961,9^\circ\text{C}$) et la température de vaporisation est de $2\,212^\circ\text{C}$.

De tous les éléments l'argent est le meilleur conducteur de la chaleur (conductivité supérieure de 8 p. 100 à celle du cuivre). Sa conductivité thermique est égale à $420 \text{ W (m}^{-1} \text{K}^{-1})$.

Du point de vue optique, l'argent poli possède un pouvoir réflecteur très élevé dans l'infrarouge et sensiblement plus faible dans l'ultraviolet.

De tous les éléments, l'argent est également le meilleur conducteur de l'électricité. Sa résistivité est d'environ 95 p. 100 de celle du cuivre : $1,59 \mu\Omega\text{cm}$.

L'argent est nettement diamagnétique.

B. Propriétés mécaniques

L'argent est un métal relativement mou. Sa dureté dans l'échelle de Mohs est comprise entre 2,5 et 3, sensiblement égale à celle du cuivre. Elle est notablement augmentée par l'addition de petites quantités de cuivre. Les autres propriétés mécaniques sont également très affectées par des traces d'impuretés [68].

IV.4. Classification périodique**IV.4.1. Cuivre**

Le cuivre appartient à la 4^{ème} ligne et à la 11^{ème} colonne de la classification périodique. C'est la première ligne des éléments de transition et la colonne des métaux « nobles » - peu réactifs -, cuivre, argent et or [69].

IV.4.2. Argent

L'argent est l'élément chimique de numéro atomique 47, de symbole Ag. Entre le cuivre et l'or, l'argent appartient à la colonne de la classification périodique appelée "colonne des métaux à frapper". Ce sont en effet les trois métaux, peu ou pas oxydable à l'air [70].

IV.5. Toxicité sur la santé**IV.5.1. Cuivre**

Le cuivre est une substance très commune qui est naturellement présente dans l'environnement et se diffuse dans l'environnement par des phénomènes naturels. Les hommes utilisent énormément le cuivre, il est utilisé par exemple dans l'industrie et dans l'agriculture (utilisation de la bouillie bordelaise par exemple). La production de cuivre a augmenté lors des dernières décennies et, de ce fait, les quantités de cuivre dans l'environnement ont augmenté.

On peut trouver du cuivre dans beaucoup de type d'aliments, dans l'eau et dans l'air. A cause de cela on absorbe des quantités importantes de cuivre chaque jour en mangeant, buvant et respirant. L'absorption de cuivre est nécessaire, car le cuivre est un élément qui est essentiel pour la santé. Bien que l'homme puisse gérer des concentrations proportionnellement importantes de cuivre, des quantités excessives peuvent causer des problèmes de santé importants [71] [72] (tableau 4).

Tableau 4 : La toxicité aigüe et chronique induite par le cuivre

Toxicité aigüe	Toxicité chronique
<p>Inhalation : les fumées et les poussières contenant du cuivre provoquent : irritation des muqueuses respiratoires et oculaires, congestion des muqueuses nasales, congestion du pharynx, ulcération voire perforation du septum nasal.</p> <p>Ingestion : l'absorption d'une dose unique d'un dérivé du cuivre donne lieu à : goût métallique, douleurs épigastriques, céphalées, nausées, étourdissements, vomissements et diarrhée, tachycardie, difficultés respiratoires, anémie, hématurie, hémorragie gastro-intestinale massive, insuffisance hépatique et rénale aboutissant à la mort.</p> <p>Contact cutané : aucune donnée n'est disponible.</p> <p>Le cuivre métallique a une toxicité plus faible que les sels de cuivre.</p>	<p>Inhalation : le cuivre et ses dérivés induisent une irritation des voies aériennes supérieures et des troubles gastro-intestinaux (anorexie, nausée, diarrhée). Une diminution du taux d'hémoglobine et du nombre d'érythrocytes a été également observée ainsi que des lésions hépatiques (fibrose, cirrhose micronodulaire, angiosarcome, hypertension portale).</p> <p>Ingestion : le cuivre peut induire une insuffisance hépatique aigüe et une hépatosplénomégalie. Le sulfate de cuivre induit une nécrose hépatiques centrolobulaire et une nécrose tubulaire rénale.</p> <p>Contact cutané : le cuivre et ses dérivés peuvent provoquer des réactions allergiques chez certains individus.</p> <p>L'exposition au cuivre peut également provoquer une anémie, une décoloration de la peau et des cheveux.</p>

IV.5.2. Argent

Comme pratiquement tout ce qui existe dans le monde (sel, alcool, eau, Big Mac, etc.), l'argent n'est pas «non toxique». «Dosis sola venenum facit» est la règle connue des pharmaciens qui signifie que la quantité est responsable de la toxicité.

Les sels argentés solubles, particulièrement AgNO_3 , sont mortels avec des concentrations allant jusqu'à 2g (0,070 onces). Les composés d'argent peuvent être lentement absorbés par les tissus de corps, avec comme conséquence une pigmentation bleuâtre ou noirâtre de la peau (argiria).

A. Contact avec l'œil

Peut causer des dommages cornéens graves si le liquide rentre en contact avec les yeux.

B. Contact avec la peau

Peut causer l'irritation de peau. Le contact répété et prolongé avec la peau peut causer la dermatite allergique.

C. Risques d'inhalation

L'exposition aux concentrations élevées des vapeurs peut causer le vertige, la difficulté de respiration, les maux de tête ou l'irritation respiratoire.

Les concentrations extrêmement élevées peuvent causer la somnolence, confusion, la perte de connaissance, le coma ou la mort [73].

IV.6. Toxicité sur l'environnement

IV.6.1. Le cuivre

La production mondiale de cuivre est toujours en augmentation. Ce qui basiquement signifie que de plus en plus de cuivre se retrouve dans l'environnement. Les fleuves déposent sur leur rives des boues contaminées par du cuivre, du fait du rejet d'eaux usées. Le cuivre pénètre dans l'air principalement lors de la combustion de combustibles fossiles. Il reste dans l'air pendant une période assez longue avant de se déposer lorsqu'il pleut. Il se retrouve alors essentiellement dans le sol. Par conséquent, les sols peuvent contenir une grande quantité de cuivre après que le cuivre de l'air se soit déposé.

Le cuivre ne se détruit pas dans l'environnement et, de ce fait, il peut s'accumuler dans les plantes et les animaux quand il est présent dans le sol. Sur les sols riches en cuivre, seul un nombre limité de plantes a des chances de survivre. C'est pourquoi, il n'y a pas beaucoup de diversité de plantes près des industries rejetant du cuivre. Du fait des effets sur les plantes, le cuivre est une sérieuse menace pour la production des terres agricoles. Le cuivre peut sérieusement influencer ce qui se passe sur les terres agricoles, suivant l'acidité du sol et la présence de matière organique. Malgré cela, les engrais contenant du cuivre sont toujours utilisés.

Le cuivre peut interrompre l'activité du sol, car il influence de façon négative l'activité des micro-organismes et des vers de terre [74].

IV.6.2. Argent

Les effets toxiques des AgNPs sont essentiellement reflétés par la diversité métabolique modifiée de la population bactérienne. Les sols et les sédiments aquatiques sont les compartiments terminaux dans lesquels arrivent les AgNPs via les effluents d'eaux usées. Ainsi le temps de résidence des AgNPs y est plus élevé que dans les systèmes aquatiques, et les AgNPs non- ou peu dégradables s'y accumulent progressivement, ce qui renforce l'intérêt de l'étude selon laquelle à la fois les concentrations, mais aussi la forme des AgNPs jouent un rôle dans la composition des flores bactériennes [75].

Toutefois, en eaux douces ou dans le milieu maritime, les ions Ag^+ se complexent avec les ions Cl^- , SO_4^{-2} et S^{-2} , formant des précipités très peu solubles. Les nanoparticules provoquent une réduction de la viabilité cellulaire de bactéries du sol, comme par exemple les bactéries dénitrifiantes, qui jouent un rôle majeur dans la fixation de l'azote, l'élimination des nitrates, la dégradation des composés organiques et l'établissement de symbiose avec les plantes [76].

IV.7. Mécanisme de pénétration des nanoparticules dans les bactéries

Le mécanisme de pénétration des nanoparticules reste à élucider. En effet l'interaction de particules physiques avec la paroi bactérienne n'a été que très peu étudiée et donc leur pénétration dans la paroi bactérienne peu observée. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être formulées :

- La première serait un passage par des porines non spécifiques de la paroi, mais les plus grosses porines ayant un diamètre de 2 nm, cette explication semble peu probable.
- La deuxième hypothèse la plus probable est que les particules sont capables d'exercer une pression mécanique sur la paroi, en raison d'une différence de concentration en osmolytes de part et d'autre de la membrane, et donc de traverser celle-ci en forçant un passage. Cependant, une mesure de l'osmolalité des suspensions de nanoparticules a été réalisée et montre qu'elle est très faible. Ainsi, les nanoparticules n'exercent aucune pression hyper osmotique et ne peuvent donc passer en force la membrane de cette manière.
- La troisième hypothèse serait qu'une particule en contact avec la membrane pourrait produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et ainsi provoquer des dommages membranaires. Des trous dans la membrane seraient formés et permettraient la pénétration des nanoparticules dans le périplasme ou le cytoplasme. La charge de la particule a été suggérée pour qu'elle puisse s'approcher de la paroi et libérer les ERO à son voisinage, les nanoparticules chargées positivement pénètrent dans la paroi bactérienne. Ainsi c'est peut-être la charge des particules, en complément ou en substitution de leur taille, qui conditionne la pénétration des nanoparticules. De plus cela conforte la troisième hypothèse de mécanisme de pénétration (figure 18) [7].

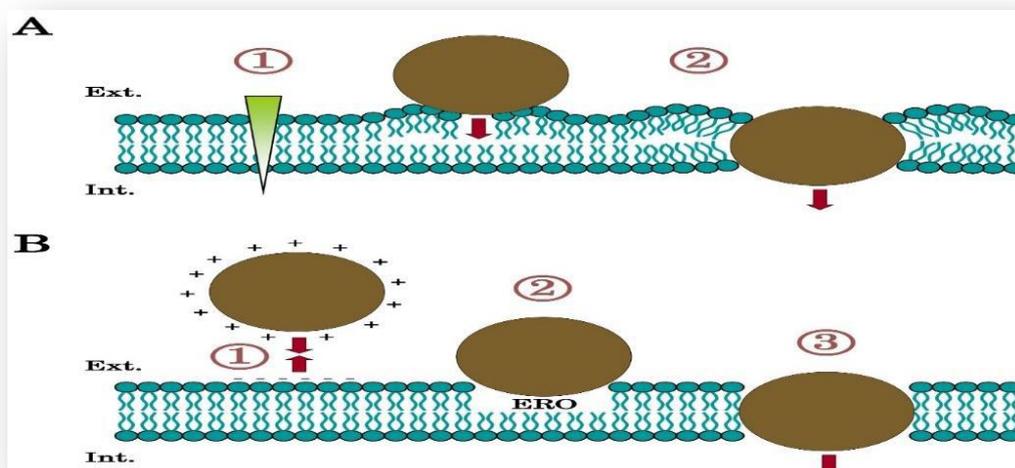


Figure 18 : Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries [7].

➤ Hypothèse du passage mécanique (A) :

En imaginant une différence de concentration en nanoparticules exerçant une pression (1), les nanoparticules forcent le passage pour aller du compartiment le plus concentré au moins concentré.

➤ Hypothèse du passage par détérioration de la membrane externe (B) :

Une particule chargée positivement peut se coller sur la bactérie chargée négativement (1), en imaginant que ces particules sont capables de produire des ERO (2), l'une des conséquences possibles est une détérioration de la membrane externe et une formation de puits permettant le passage des nanoparticules (3).

IV.7.1. Effets antibactérien des nanoparticules

Un grand nombre de nanoparticules a un effet antibactérien sur différentes souches bactériennes. Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction de la nature et des caractéristiques des nanoparticules. Ainsi les nanoparticules métalliques d'Ag et de Cu présentent une forte activité bactéricide dès de faibles concentrations [77].

A. Argent

L'argent (Ag), sous forme colloïdal, a longtemps été utilisé comme substance antimicrobienne en raison de leur surface qui offre un meilleur contact avec le microorganisme et augmente la libération d'ions argentés (Ag^+), ces ions présentent un large spectre d'action contre les champignons, les virus et un grand nombre de bactéries infectieuses (à Gram positif et à Gram négatif), dont *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio choléra*, *Pseudomonas aeruginosa*, *syphilis typhus* et *Staphylococcus aureus* [78] [79].

Les études des **Suwan, Temsiri, et al** sur les AgNPs du riz ont été étudiées pour l'activité antibactérienne contre *S. aureus* et *E. coli*. Les résultats ont montré que les AgNPs de toutes les variétés de riz avaient des effets inhibiteurs sur les deux souches, alors que la solution du riz modifiée pure ne pouvait pas inhiber les souches testées [80].

Mécanisme d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent

Les AgNPs peuvent modifier la perméabilité membranaire de la bactérie permettant l'entrée d'AgNPs dans la cellule [81].

De nombreuses études appuient la proposition selon laquelle la pénétration des AgNPs à travers la paroi bactérienne conduit à leur dissolution en ions argentés (Ag^+). Ces ions Ag^+ ainsi libérés vont interagir avec les groupes thiol (SH), constituants des membranes cellulaires et des enzymes, et forment des liaisons S–Ag stables [82]. Ce qui provoque l'inactivation des protéines membranaires, la dénaturation des enzymes vitales, épuisement des niveaux d'ATP intracellulaire et l'activité bactéricide conséquente [83].

Un des avantages majeurs des nanoparticules d'argent métallique réside dans le fait qu'elles représentent un réservoir d'ions Ag^+ . Ce qui permet une activité antibactérienne pendant une période de temps plus longue [76].

Activité mutagène des nanoparticules d'argent

Les ions Ag^+ inhibent la réplication cellulaire en induisant la condensation de l'ADN et en agissant directement avec les bases des acides nucléiques de diverses bactéries.

En effet, ces ions peuvent intercaler entre la paire de base de purine et de pyrimidine, perturbant ainsi la liaison hydrogène (H) entre les brins antiparallèles.

Ce qui pourra avoir plusieurs conséquences telles que l'induction d'une mutation ou même la dénaturation de l'ADN et l'inactivation subséquente des bactéries (figure 19) [84].

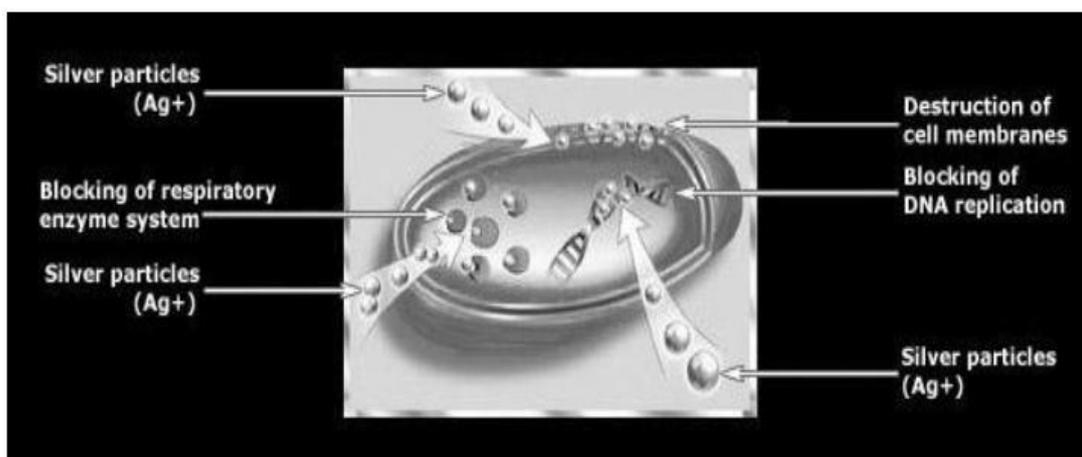


Figure 19: Site d'action des ions Ag^+ sur les cellules bactériennes [76].

B. Cuivre

L'activité antimicrobienne des NP de cuivre a été démontrée contre diverses espèces de bactéries, telles que le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et le *Bacillus subtilis*, les organismes à Gram négatif tels que *Pseudomonas aeruginosa*.

L'activité bactéricide de Cu dépend du niveau d'agglomération. En minimisant l'agglomération, on obtient des NPs de plus petite taille qui offrent une plus grande surface disponible pour la solubilisation des ions de cuivre et pour l'interaction avec les membranes bactériennes, ce qui entraîne une plus grande toxicité. Les formes métalliques et ioniques du cuivre produisent des radicaux hydroxyles qui endommagent les protéines essentielles et l'ADN [81].

L'activité antibactérienne du cuivre a été largement publiée, d'où le potentiel antimicrobien in situ du cuivre contre des bactéries pathogènes comme le staphylocoque doré, des champignons comme le *candida albicans* et des virus comme la grippe. La petite taille et le rapport surface-masse élevé des nanoparticules de cuivre en font des agents antimicrobiens à large spectre efficaces car cela améliore leur capacité à pénétrer dans les bactéries selon les mêmes mécanismes que les ions d'argent et inhibent la respiration bactérienne tout en bloquant la multiplication en agissant sur l'ADN [85].

DEUXIÈME PARTIE :

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 5 : matériels et méthodes

L'OBJECTIF

Dans cette optique, l'objectif de notre travail était alors de tester l'effet antibactérien des sels Ag et Cu. Leur présence ne représente aucun danger pour l'être humain dans d'éventuelles utilisations clinique a des faibles concentrations, Ils sont reconnus par la cellule bactérienne ce qui diminue considérablement le risque d'être rejeté par la cellule via la sélectivité de sa membrane cytoplasmique.

Une comparaison a été par la suite établie avec l'effet de certains antibiotiques. Cette comparaison nous permet de voir si l'on acquit un meilleur effet antibactérien en utilisant Ag et Cu par rapport à ce que les antibiotiques donnent comme résultat.

I. Matériels

I.1. Souches bactériennes

Pour abordé notre sujet, nous avons commencé par choisir 2 souches bactériennes connues pour leur résistance aux familles d'antibiotiques les plus utilisées Il s'agit là de : *E. coli*, *P. aeruginosa*, ainsi que 3 souches cliniques : *S. aureus* ; *E. coli*, *P. aeruginosa*,

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, trois souches bactériennes (cliniques et de références) ont été utilisées pour mener à bien ce travail.

Les souches utilisées ont été récupérées au près du laboratoire bactériologie du Centre Hospitalo-universitaire (CHU) Benbadis de Constantine (tableau05) (tableau 06). Les espèces bactériennes utilisées sont considérées représentatives des germes les plus courants de contamination bactérienne et responsables des infections nosocomiales. Elles possèdent aussi différentes résistances qui donnent une grille d'appréciation finale significative de l'efficacité des sels Ag-Cu.

Tableau 5:Souches cliniques pathogènes étudiées.

Souches bactériennes	Origines
<i>Escherichia coli</i>	Infection urinaire
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Pus

Tableau 6: Souches de références pathogènes étudiées.

Souches bactériennes	Références
<i>Escherichia coli</i>	(ATCC 25922)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(ATCC 25923)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(ATCC 27853)

I.2. Milieux de culture

- ✓ Milieu chapman
- ✓ Milieu hektoen
- ✓ Milieu au sang cuit (chocolat)
- ✓ Muller Hinton
- ✓ Milieu triple SugarIron (TSI)
- ✓ Le milieu citrate de Simmons
- ✓ Mannitol mobilité

I.3. Solvants

Nous avons utilisé :

- ✓ Eau distillé
- ✓ Acétate de cuivre
- ✓ le nitrate d'argent

I.4. Réactifs

- ✓ Violet de Gentiane
- ✓ Lugol
- ✓ Alcool
- ✓ Fuchsine

I.5. Les sels utilisés

Pour tester l'effet antibactérien des sels: Ag et Cu ainsi que leurs mélanges respectifs, [50 ; 150 mg/l] ont été réalisées pour chaque solution et déposés sur les colonies des souches de test.

Dans ce travail, on a utilisés l'acétate de cuivre, nitrate d'argent ainsi que leurs mélanges binaires avec différentes concentrations atomiques.

- ✓ Acétate de cuivre: 50mg/l; 150mg/l
- ✓ Nitrate d'argent:50mg/l ; 150mg/l

La préparation des solutions et la pesée a été effectuée au niveau du laboratoire de toxicologie.

II. Méthodologies

II.1. Identification des souches bactériennes

Nous avons réalisé l'identification morphologiques et biochimiques des souches bactériennes (H) par plusieurs examens macroscopique, microscopique et macrogalerie ainsi que l'antibiogramme.

II.1.1. Caractères morphologiques

II.1.1.1 Examen macroscopique des caractères cultureux

L'observation de l'aspect macroscopique des colonies isolées permet d'effectuer une première caractérisation, avec une orientation possible des résultats au cours de l'identification.

D'après les éléments d'identifications macroscopiques sont :

- ✓ La forme des colonies : punctiforme, irrégulières,... etc.
- ✓ La taille des colonies par la mesure du diamètre : petite ; moyenne ou grande taille...
- ✓ La pigmentation : couleur de la colonie...
- ✓ L'élévation : bossue, convexe, plane...
- ✓ L'opacité : opaque, translucides, transparente...
- ✓ Aspect : lisse, rugueuse, sèche...

II.1.1.2 Examen microscopique

L'observation de l'aspect microscopique des colonies obtenue est effectuée par l'examen à l'état frais et la coloration de Gram.

➤ Examen à l'état frais

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence la forme des bactéries ainsi que le type de leur mobilité et leur regroupement. L'observation est réalisée comme suit :

- ✓ Une petite goutte d'eau distillée stérile est déposée au centre d'une lame stérile.
- ✓ Une partie d'une colonie bactérienne pure est prélevée à l'anse et dissociée dans la goutte.
- ✓ Une lamelle stérile est ensuite appliquée sur la goutte en évitant la formation de bulles d'air.

- ✓ L'observation microscopique est réalisée à l'objectif X10 puis X40.



Figure 20: Examen à l'état frais

➤ Coloration de Gram

La coloration de Gram est une coloration différentielle permettant de différencier les bactéries selon deux critères :

- Leur forme (bacille, cocci,...etc.),
- Leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif.

Elle se déroule en plusieurs étapes :

- ✓ Sur une lame mélanger une goutte d'eau stérile avec quelque colonie isolée suivi par l'étalement et la fixation à la chaleur pendant quelque minute
- ✓ Colorer par le violet de gentiane et laisser agir 1 minute puis rincer à l'eau
- ✓ Mordançage au Lugol et laisser agir pendant 1 minute puis le rinçage
- ✓ Décolorer par l'alcool et laisser agir 30 seconds
- ✓ Recolorer par la fuchsine et laisser agir pendant 1 minute
- ✓ Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif X100

II.1.2. Caractères biochimiques

II.1.2.1 Recherche de la catalase

La catalase a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. C'est l'action directe de l'enzyme qui est mise en évidence dans la masse bactérienne.

On prend une goutte d'eau oxygéné (H_2) à 10 volume qu'on dépose sur une lame avec une colonie bien distincte de culture jeune de 24h, le dégagement immédiat de bulles d'oxygène exprime la présence d'une catalase.

II.1.2.2 Recherche d'oxydase

Est une technique d'identification en bactériologie concernant les bactéries à gram négatif : la détection de l'enzyme oxydase permet d'orienter la recherche vers les genres *Pseudomonas*.

Les bactéries possédant l'enzyme oxydase peuvent oxyder le N-diméthyl-paraphénylene diamine, ce qui donne des produits violacés.

II.1.2.3 Macrogalerie

A. Milieu triple SugarIron (TSI)

Le milieu TSI est un milieu glucosé saccharose, contenant du citrate de fer ammoniacal. C'est un milieu que permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des entérobactériaceae.

La pente du milieu TSI estensemencée par stries et le culot par piqure centrale. Après, une incubation à 37°C pendant 24 heures.

- Le virage du culot au jaune traduit la fermentation du glucose.
- La présence de bulles de gaz signifie la fermentation avec production du gaz.
- Le virage de la pente au jaune traduit l'utilisation du lactose ou saccharose ou les deux à la fois.
- Une coloration noire, signifie la production d'hydrogène sulfuré(H₂S).

B. Le milieu citrate de Simmons

Ce milieu permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. Ce caractère est intéressant pour discriminer les bactéries entre-elles et ainsi de les identifier.

La pente du milieu Citrate de Simmons estensemencée avec une strie sur toute la surface, ensuite l'incuber à 37°C, pendant 24 heures.

Une réaction positive se traduit par une alcalinisation du milieu en le faisant virer au bleu.

C. Milieu urée-indole

Le milieu urée-indole ou urée-tryptophane est un milieu synthétique complexe fournissant un ensemble de résultats utiles à l'identification des entérobactéries et autre bactéries.

Il permet la recherche de 3 activités enzymatique :

- L'uréase
- Le tryptophane désaminase (TDA)

- La production d'indole grâce à un tryptophane

D. Mannitol mobilité

Le test permettant de rechercher simultanément la fermentation du mannitol et l'étude de la mobilité de la souche.

L'ensemencement du milieu s'est fait par piqûre centrale dans le culot jusqu'au fond du tube. Incubation dure 24h à 37°C. La fermentation du mannitol se révèle par une acidification du milieu qui fait virer l'indicateur de pH au jaune.

La mobilité se traduit par la diffusion des bactéries à partir de la ligne d'ensemencement vers la périphérie, en créant une turbidité. Les bactéries immobiles poussent uniquement le long de la piqure centrale.

II.1.3. Antibiogramme

L'antibiogramme est un examen de laboratoire visant à déterminer in vitro la concentration minimale inhibitrice (CMI) et donc la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques précis pour chaque type. Pour le réaliser, nous avons appliqué la méthode de diffusion classique de disques d'antibiotiques sur gélose Muller Hinton (MH) qui est un milieu standardisé pour toutes les bactéries sauf quelques souches exigeantes.

Le principe consiste à déposer des disques, chargés d'une dose connue d'antibiotiques (tableau 07), à la surface de la gélose MH préalablement ensemencé de souches étudiées, suivi d'une incubation des boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h.

Tableau 7: Les différentes concentrations des disques d'antibiotiques utilisées.

<i>Escherichia coli (H)</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa (H)</i>			<i>Staphylococcus aureus (R)</i>		
Antibiotiques	Codes	[C]	Antibiotiques	Codes	[C]	Antibiotiques	Codes	[C]
Ampicilline	AMC	30 μ g	Aztreonam	ATM	30 μ g	Oxacilline	OXA	5 μ g
Céfotaxime	CTX	30 μ g	Ceftazidime	CAZ	30 μ g	Céfoxitine	FOX	30 μ g
Céfazoline	CZN	30 μ g	Céfalotine	FEP	30 μ g			
Céfoxitine	FOX	30 μ g	Ticarcilline	TIC	75 μ g			
Imipénème	IMP	10 μ g	Imipénème	IMP	10 μ g			
Ertapénème	ETP	10 μ g	Pipéracilline +Tazobactam_ Tazocilline	TZP	110 μ g			

II.1.3.1. Isolement des souches bactériennes

L'isolement est une technique qui permet de séparer les bactéries d'un échantillon pour obtenir des colonies différentes espacées les unes des autres.

Isolement permet :

- ✓ D'isoler une ou plusieurs souches contenant dans un mélange.
- ✓ De vérifier la pureté d'une souche étudiée.

La méthode d'isolement utilisée est l'isolement par épuisement sur trois secteurs ou cadrans il s'effectue en trois étapes successives permettant d'isoler les cellules à partir des cultures conservées et des souches de référence.

Chaque souche a été isolée sur un milieu sélectif spécifique à sa poussée (milieu Chapman pour *S.aureus*, milieu chocolat pour *E.coli* et milieu Hektoen pour *P.aeruginosa*)

Dans les conditions stériles, la boîte de pétri est divisée en trois cadrans après avoir enregistré la date et le nom de la souche sur la boîte.

Le premier tiers de la boîte est inoculé par quelque colonie en balayant avec pipette pasteur la surface de la gélose de lignes non chevauchantes ou stries. L'inoculation du second tiers est réalisée par des stries en empiétant légèrement avec la pipette pasteur le premier cadran afin d'obtenir quelques cellules qui seront étalées sur le second la répétition de cette procédure sur le troisième secteur achève la séparation des bactéries.

La boîte est incubée à 37°C pendant 24h.

II.1.3.2. Réparation de la suspension bactérienne

À partir d'une culture fraîche de 24 heures et pour chacune des souches à tester, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile.

Immerger l'anse dans de l'eau physiologique stérile à 0.9%.

Bien homogénéiser la suspension bactérienne jusqu'à l'obtention d'une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland ($\approx 1 \times 10^8$ UFC/ml), équivalente à une densité optique de 0.08 à 0.1.

L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum.

II.1.3.3. Ensemencement

Se fait sur une gélose Muller Hinton par la méthode de Kirby-Baur, par écouvillonnage appelée méthode NCCLS (national committee of clinical laboratory standards). Ce type d'ensemencement est rapide mais est imprécis.

Dans des conditions stériles imbiber un écouvillon dans la suspension bactérienne. Ensemencer le milieu de culture de haut en bas avec des stries sérieées, l'opération est répétée trois fois en tournant la boîte de pétri de 60°.

Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

Dans le cas où l'on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

II.1.3.4. Application des disques d'antibiotique

Les disques d'antibiotiques, choisis explicitement en fonction de la nature du germe, ont été déposés sur la gélose MH ensemencé, à l'aide d'une pince stérile.

Il est préférable de ne pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre, les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm.

Ensuite les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures.

La lecture se fait après 24 heures d'incubation, mesurer avec précision les diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique.



Figure 21: Emplacement des disques d'antibiotiques choisis

II.2. La méthode de diffusion sur milieu gélosé

II.2.1 Préparation des solutions de Cu - Ag

Acétate de cuivre

$$\left\{ \begin{array}{l} M(\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}) = 199,65 \text{ g/mol} \\ M(\text{Cu}) = 63,45 \text{ g/mol} \end{array} \right.$$

$$\begin{array}{l} 199,65 \text{ g/mol} \text{ ————— } 63,45 \text{ g} \\ \mathbf{m=472 \text{ mg}} \text{ ————— } 150 \text{ mg} \end{array}$$

Nitrate d'argent

$$\left\{ \begin{array}{l} M(\text{AgNO}_3) = 169,87 \text{ g/mol} \\ M(\text{Ag}) = 107,87 \text{ g/mol} \end{array} \right.$$

$$\begin{array}{l} 169,87 \text{ g/mol} \text{ ————— } 107,87 \text{ g/mol} \\ \mathbf{m=236 \text{ mg}} \text{ ————— } 150 \text{ mg} \end{array}$$

➤ Pour obtenir [150mg/l] on applique la règle de 3 :

150mg fois la masse molaire de l'acétate de cuivre qui est 199.65g/mol sur la masse molaire de cuivre 63.45g/mol. Le même processus a été établi pour le nitrate d'argent.

0.47 g de poudre d'acétate de cuivre et 0.23 g de nitrate d'argent ont été dissous dans 1L d'eau distillée; ces solutions ont été diluées avec le facteur 1/3 pour obtenir [50mg/l].

Par ailleurs, le mélange entre les 2 solutions a été préparé par 1ml de l'acétate de cuivre [150mg/l] avec 1ml de nitrate d'argent [150 mg/l].



Figure 22 : Les différentes concentrations d'acétate de cuivre et de nitrate d'argent avec le mélange entre les deux

La méthode de diffusion sur milieu gélosé est réalisée sur milieu MH (Mueller Hinton).

- A l'aide d'un écouvillon stérile, la surface du milieu de culture estensemencée par une des suspensions de souches bactériennes, ces dernières sont préparées dans l'eau physiologique stérile et qui porte une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland. Les suspensions bactériennes sont préparées à partir de culture fraîche de 24 heures.

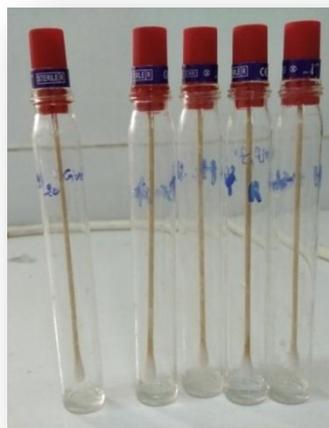


Figure 23: les cinq suspensions bactériennes

- Les disques ont été préparé à partir de papier whatman et stérilisés a l'automate pendant 20 min a 120C° ils ont, par la suite, été imbibés de 0.05 ml (50µl) de différentes concentrations d'AgNO₃ et d'acétate de cuivre.

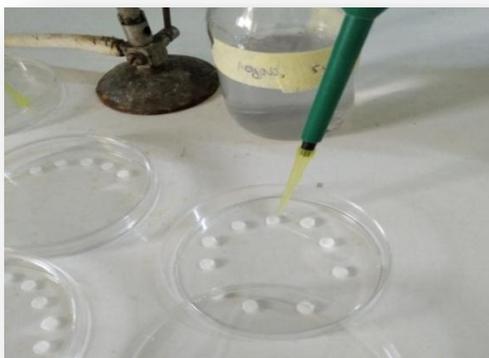


Figure 24: imbibition des disques par les solutions Cu-Ag

- A l'aide d'une pince stérile, des disques de papier Whatman de 6 mm sont déposés sur la surface de la gélose MH préalablementensemencée de suspension bactérienne.

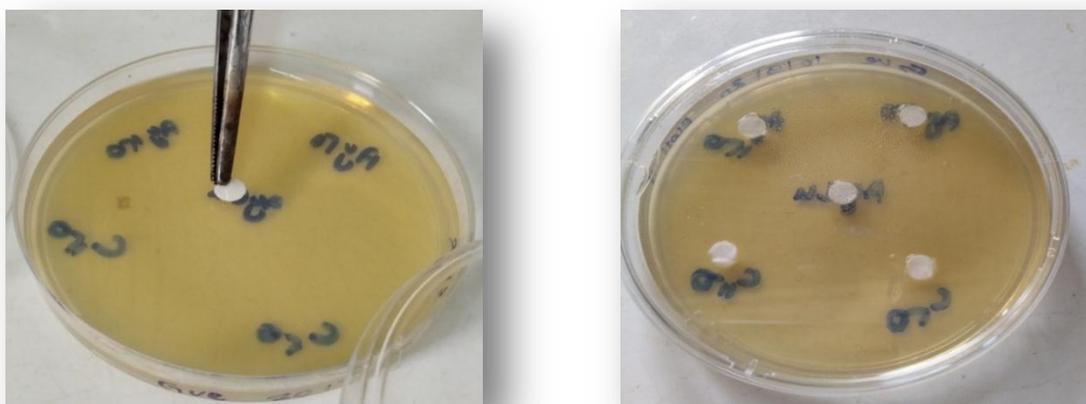


Figure 25: Le dépôt des disques imbibés par les solutions Cu-Ag sur le milieu MHensemencée de la suspension bactérienne.

- Les boîtes sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Après incubation, les zones d'inhibitions formées sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse.
- Cette étape a été réalisée en deux essais pour chacune des souches *S. aureus* ; *E. coli*, *P. aeruginosa*.
- La zone d'inhibition circulaire est mesurée par le diamètre en mm puis il sera possible de calculer la CMI en reportant ce diamètre sur la courbe de concordance (annexe 02) .

TROISIÈME PARTIE: RÉSULTATS ET DISCUSSION

Chapitre 6 : résultats et discussions

I. Identification et isolement des souches bactériennes

I.1. Caractères morphologiques

L'observation macroscopique et microscopique des deux souches bactérienne d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa* après 24h d'incubation à 37°C, donnent les résultats présentées dans le Tableau 08 et les figures 26, 27.



Figure 26 : Aspect macroscopique des colonies d'*Escherichia coli* sur milieu Chocolat

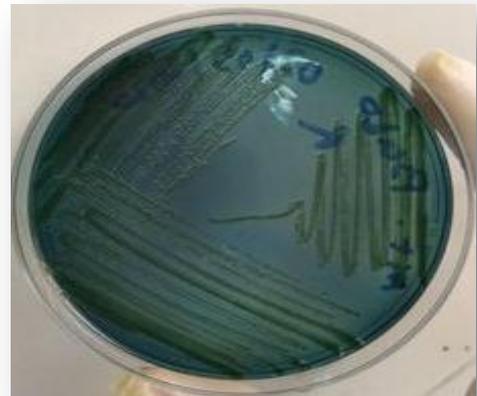


Figure 27: Aspect macroscopique des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* sur milieu Hektoen

Tableau 8: Aspect macroscopique et microscopique des colonies d'*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Forme	Bacille, régulière	Bacille, irrégulière
Taille	Moyenne	Grande taille
Pigmentation	Blanchâtre	Verte
Élévation	Bombe	Plate
Opacité	Opaque	Translucide
Aspect	Lisses	Rugueuse

Coloration de Gram

L'observation microscopique après la coloration de Gram montre la présence des bacilles à Gram négatif pour *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

I.2. Caractères biochimiques

I.2.1. Recherche de la catalase

- Pour *Escherichia coli* on a observé un dégagement immédiat de bulles d'oxygène → Catalase positif.
- Pour *Pseudomonas aeruginosa* on a observé un dégagement immédiat de bulles d'oxygène → Catalase positif.

I.2.2. Recherche d'oxydase

- Pour *Escherichia coli* absence de coloration → Oxydase négatif.

- Pour *Pseudomonas aeruginosa* la réaction sur la bandelette d'oxydase est colorée en bleu-violet, ce qui suggère la présence du cytochrome oxydase → Oxydase positif.

I.2.3. Macrogalerie

Les résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour *Escherichia coli* sont présentés dans le (tableau 09) et la figure 28.

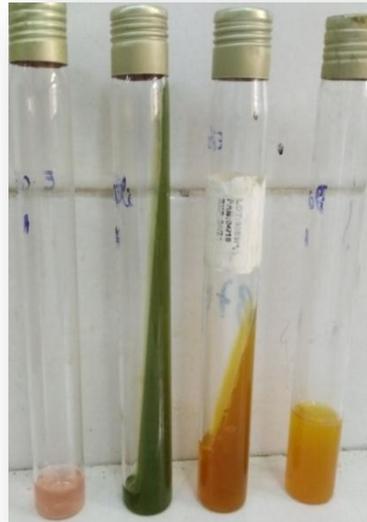


Figure 28: Echantillon de résultats de la galerie biochimique pour *Escherichia coli*.

Tableau 9: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour *Escherichia coli*

Milieu TSI	Milieu citrate de simmons	Milieu Urée – Indole		Mannitol – Mobilité	
		Uréase	Indole	Mannitol	Mobilité
+	-	-	+	+	+

+ : indique qu'il y'a un changement de couleur dans le milieu
 - : indique qu'il n'y'a aucun changement de couleur

- Les résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour *Pseudomonas aeruginosa* sont présentés dans le (tableau 10) et figure 29.



Figure 29 : Echantillon de résultats de la galerie biochimique pour *Pseudomonas aeruginosa*

Tableau 10: Résultats de la galerie biochimique classique obtenus pour *Pseudomonas aeruginosa*

Milieu TSI	Milieu citrate de simmons	Milieu Urée – Indole		Mannitol – Mobilité	
		Uréase	Indole	Mannitol	Mobilité
-	+	-	-	-	+

+ : indique qu'il y'a un changement de couleur dans le milieu
 - : indique qu'il n'y'a aucun changement de couleur

I.3. Antibiogramme

- Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches d'*Escherichia coli* hospitalière (H) et de référence (R) sont présentés dans le (tableau 11) les figures 30,31.



Figure 30 : Résultats de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* (R)



Figure 31: Résultats de l'antibiogramme d'*Escherichia coli* (H)

Tableau 11: Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches d'*Escherichia coli* hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations

	CTX 30µg	CZN 30µg	ETP 10µg	FOX 30µg	AMC 3 0µg	IMP 10µg
<i>Escherichia Coli (H)</i>	10	0	24	21	12	26
	R	R	S	S	R	S
<i>Escherichia coli (R)</i>	35	24	36	27	18	30
	S	S	S	S	S	S

S : souche sensible
R : souche résistante

- Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches de *Pseudomonas aeruginosa* hospitalière (H) et de référence (R) sont présentés dans le (tableau 12) et les figures 32,33.



Figure 33 : Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* (R)



Figure 32: Résultats de l'antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* (H)

Tableau 12: Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour chacune des souches de *Pseudomonas aeruginosa* hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations

	CAZ 30µg	ATM 30µg	FEP 30µg	TIC 75µg	TZP 110 µg	IMP 10µg
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (H)	30	23	14	12	12	25
	S	S	S	R	R	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R)	25	26	26	21	25	22
	S	S	S	S	S	S

S : souche sensible
R : souche résistante

- Les résultats de l'antibiogramme obtenu pour *Staphylococcus aureus* de référence (R) sont présentés dans le (tableau 13) et la figure 34.

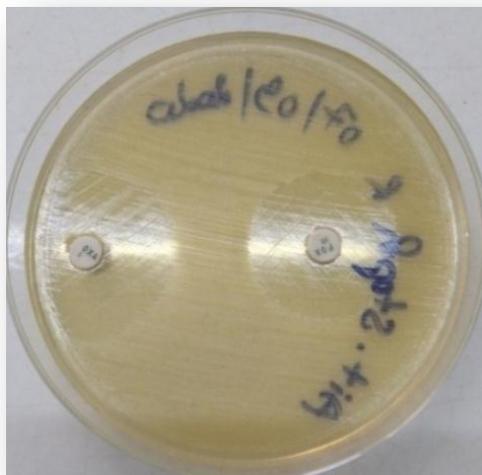


Figure 34: Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* (R)

Tableau 13: Résultats de l'antibiogramme de *Staphylococcus aureus* (R) et leurs interprétations

	FOX 30µg	OXA30µg
<i>Staphylococcus aureus</i> (R)	30	35
	S	S

S : souche sensible

II. Résultats de la méthode de diffusion sur milieu gélés

- Les résultats de la diffusion sur gélose obtenu pour chacune des souches *d'Escherichia coli* hospitalière (H) et de référence (R) sont présentés dans le (tableau 14) les figures35 ; 36.



Figure 36 : Résultats de la diffusion sur gélose *d'Escherichia coli* (H)



Figure 35: Résultats de la diffusion sur gélose *d'Escherichia coli* (R)

Tableau 14: Les résultats de l'effet antibactérien de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre et leur mélange équimolaire avec différents concentrations sur chacune des souches *d'Escherichia coli* hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations.

	Nitrate d'argent		Acétate de cuivre		Mélange équimolaire
	50mg/l	150mg/l	50mg/l	150mg/l	150mg/l
<i>Escherichia coli</i> (H)	8	13	0	0	7
	Effet faible (S)	Effet moyen (S)	Pas d'effet (R)	Pas d'effet (R)	Effet faible (S)
<i>Escherichia coli</i> (R)	7	16	0	0	7
	Effet faible (S)	Effet fort (S)	Pas d'effet (R)	Pas d'effet (R)	Effet faible (S)

S: souche sensible

R : souche résistante

- Les résultats de la diffusion sur gélose obtenu de *Pseudomonas aeruginosa* pour chacune des souches hospitalière (H) et de référence (R) sont présentés dans le (tableau 15) les figures 37,38.

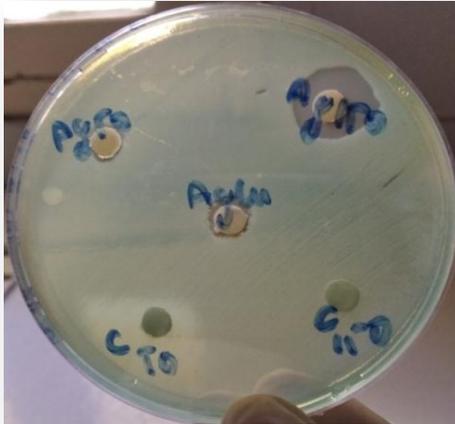


Figure 37: Résultats de la diffusion sur gélose de *Pseudomonas aeruginosa* (R)

Figure 38: Résultats de la diffusion sur gélose de *Pseudomonas aeruginosa* (H)

Tableau 15: Les résultats de l'effet antibactérien de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre et leur mélange avec différentes concentrations sur chacune des souches *Pseudomonas aeruginosa* hospitalière (H) et de référence (R) et leurs interprétations

	Nitrate d'argent		Acétate de cuivre		Mélange équimolaire
	50mg/l	150mg/l	50mg/l	150mg/l	150mg/l
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (H)	10	10	0	0	8
	Effet faible (S)	Effet faible (S)	Pas d'effet (R)	Pas d'effet (R)	Effet faible (S)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (R)	7	18	0	0	10
	Effet faible (S)	Effet fort (S)	Pas d'effet (R)	Pas d'effet (R)	Effet faible (S)

S : souche sensible
R : souche résistante

- Les résultats de la diffusion sur gélose obtenu de *Staphylococcus aureus*(R) présentés dans le (tableau 16) les figures 39.



Figure 39: Résultats de la diffusion sur gélose de *Staphylococcus aureus* (R)

Tableau 16: Les résultats de l’effet antibactérien de nitrate d’argent, acétate de cuivre et mélange équimolaire avec différentes concentrations sur et leurs interprétations de *Staphylococcus aureus* (R)

	Nitrate d’argent		Acétate de cuivre		Mélange équimolaire
	50mg/l	150mg/l	50mg/l	150mg/l	150mg/l
<i>Staphylococcus aureus</i> (R)	0	18	0	0	0
	Pas d’effet (R)	Effet moyen (S)	Pas d’effet (R)	Pas d’effet (R)	Pas d’effet (R)

S : souche sensible
 R : souche résistante

Discussion

- Milieu TSI

La souche d’*Escherichia coli* a fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elles produisent du gaz mais pas du sulfure d’hydrogène H₂S.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* n’a pas fermenté le lactose ainsi que le saccharose, elle n’a pas produit ni le gaz ni le sulfure d’hydrogène H₂S.

➤ **Utilisation du citrate**

La souche d'*Escherichia coli* n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone, elle est citrate négative. Absence de virage du milieu du vert au bleu.

La souche de *Pseudomonas aeruginosa* utilise le citrate comme seule source de carbone, elle est citrate positif. Présence de virage du milieu du vert au bleu.

➤ **Mannitol-Mobilité**

La souche d'*Escherichia coli* a fermenté le mannitol qui se manifeste par un virage du milieu au jaune.

L'observation d'une culture dans tout le tube signifie que les bactéries ont diffusé dans la totalité du milieu donc *Escherichia coli* est une souche mobile.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas fermenté le mannitol, absence de virage du milieu au jaune. L'observation d'une culture dans tout le tube signifie que *Pseudomonas aeruginosa* est une souche mobile.

➤ **urée-indole**

Le milieu reste inchangé : couleur orange, test négatif. La souche *Escherichia coli* elle est uréase négative.

Observation d'anneau rouge dans le milieu, test positif. La souche *Escherichia coli* elle est Indole positive.

Le milieu reste inchangé : couleur orange, test négatif. La souche *Escherichia coli* elle est uréase négative.

Observation d'anneau rouge dans le milieu, test positif. La souche *Escherichia coli* elle est Indole positive.

Au cours de notre étude, nous avons évalué, *in vitro*, l'efficacité antimicrobienne des sels de Cu Ag vis-à-vis de 5 souches bactériennes pathogènes représentatives des principaux genres bactériens isolés de l'environnement hospitalier dont une bactérie Gram positif (*Staphylococcus aureus*) et à Gram négatif (*Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*), en comparaison à des souches de référence correspondantes comme la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la *P. aeruginosa* ATCC 27853 et la *E. coli* ATCC 25922.

De prime abord, nous avons réalisé un antibiogramme de chaque souche bactérienne afin de déterminer les ATB auxquels elles montrent une sensibilité ou une résistance.

Après incubation à 37°C pendant 24h nous avons observées pour les cinq souches testées des zones d'inhibitions autour des disques d'antibiotiques utilisés.

La souche *Escherichia coli* hospitalière est résistante à la fois à la céfotaxime (CTX), la céfazoline (CZN) et l'ampicilline (AMP), elle montre également une sensibilité vis-à-vis ertapénème (ETP), céfoxitine (FOX) et imipénème (IMP). Par ailleurs, la souche *Escherichia coli* de référence est sensible à tous les ATB testés.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* hospitalière montre une sensibilité à l'effet d'aztreonam (ATM), Céfalotine (FEP) et Imipénème (IMP). Par contre, la souche elle est résistante à ceftazidime (CAZ), ticarcilline (TIC) et Pipéracilline + Tazobactam / Tazocilline (TZP). *Pseudomonas aeruginosa* de référence est sensible à tous les ATB testés.

La souche *Staphylococcus aureus* de référence montre une sensibilité contre les ATB testés Oxacilline (OXA) et Céfoxitine (FOX).

Afin d'étudier l'effet antibactérien des sels d'argent et cuivre, nous avons procédé par l'application d'une méthode qui consistait à déterminer l'effet inhibiteur de concentrations des solutions Ag- Cu par diffusion sur milieu gélosé préalablement ensemencé.

Après incubation à 37°C pendant 24h nous avons observées pour les souches testées l'absence et la présence des zones d'inhibitions autour des disques des solutions utilisés.

Nos résultats ont mis en évidence l'absence de la zone d'inhibition autour des disques d'acétate de cuivre pour toutes les souches testées, ce qui indique que les souches étudiées (hospitalière et de références) montrent une résistance à l'acétate de cuivre aux [150, 50 mg/l] et donc l'absence du CMI.

Selon les études de **Fernando, SSN et al 2018** [81] qui montrent que le cuivre a un effet antibactérien comparant à notre étude qui montre une absence de cet effet ce qui explique que la concentration de cuivre dans l'acétate de cuivre est insuffisante pour observer l'effet sur les bactéries étudiées ou bien à la mauvaise diffusion d'acétate de cuivre à cause de leur taille.

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la zone d'inhibitions avec l'augmentation de la concentration des sels de nitrate d'argent avec la diffusion par papier Whatman, le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la souche bactérienne. Ces résultats sont en accord avec les travaux de **Zeyons, Ophélie 2008** [1] qui a mis en évidence une augmentation des zones d'inhibition en augmentant les concentrations.

Pour le nitrate d'argent à [150mg/l] toutes les souches sont sensibles, le plus grand diamètre est 18 pour la souche *Staphylococcus aureus* (R) et donc selon la courbe de concordance la CMI = 6mg/l.

La souche *Escherichia coli*(H) montre une sensibilité moyenne vis-à-vis le nitrate d'argent à [150 mg/l], contrairement à *Escherichia coli* (R) qui montre une forte sensibilité vis-à-vis le nitrate d'argent à [150 mg/l].

Par ailleurs, la souche *Escherichia coli* (H) et (R) montre toutes les deux une faible sensibilité vis-à-vis le nitrate d'argent à [50 mg/l].

La souche *pseudomonas aeruginosa*(H) montre une faible sensibilité vis-à-vis le nitrate d'argent à [150 mg/l], contrairement à *Pseudomonas aeruginosa*(R) qui montre une sensibilité moyenne vis-à-vis le nitrate d'argent à concentration [150 mg/l]. Par ailleurs, la souche *pseudomonas aeruginosa*(H) et (R) montre toutes les deux une faible sensibilité vis-à-vis le nitrate d'argent à [50 mg/l].

La souche *Staphylococcus aureus* (R) montre une sensibilité moyenne vis-à-vis le nitrate d'argent à [150 mg/l], et une résistance au nitrate d'argent à [50 mg/l].

L'effet observé de nitrate d'argent [150mg/l] est supérieur à celui des antibiotiques (TIC, TZP et FEP) pour *pseudomonas aeruginosa* et (AMC CZN CTX) pour *escherichia coli*. Ceci semble être une piste très importante à tester sur d'autres souches des mêmes espèces qui pourraient être plus résistantes.

L'effet antibactérien de l'argent sur les souches étudiées est expliqué par la libération des ions Ag⁺, ces ions Ag⁺ interagissent fortement avec les groupements thiols des enzymes vitales en les désactivant (Morones et al. 2005). L'ADN des bactéries perdait l'information de reproduction quand les bactéries (*E. coli*. et *S. aureus*) étaient exposées aux ions argent, d'autres travaux ont montré que les ions argent interagissaient avec les protéines (groupe de sulphydryl) également avec les composantes internes des bactéries comme l'acide nucléique. La respiration de la bactérie *Escherichia coli* est désactivée en présence des ions Ag⁺ entraînant la mort de la cellule bactérienne. Tous ces travaux confirment que les mécanismes d'action des ions argent sont particulièrement complexes et multiples (Mungkalasiri, 2009).

L'activité antibactérienne d'un mélange équimolaire des sels de Cu-Ag ne nous a pas donné une potentialisation d'effets qui a un effet équivalent suite à l'utilisation de la solution mère à [150mg/l] ceci pourrait s'expliquer par la diminution du taux d'argent par des phénomènes d'interaction Ag-Cu et de leur sels (formation probable d'acétate d'argent)

Conclusion

Conclusion

La résistance croissante des souches bactériennes pathogènes aux traitements antibactériens traditionnels a favorisé le développement de nouvelles stratégies de lutte contre les infections (Naqvi et al., 2013). Avec les progrès de la nanotechnologie, l'intérêt des AgNps pour les applications médicales a augmenté en raison de leur capacité à inhiber un grand nombre de bactéries pathogènes importantes telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Staphylococcus aureus* (Suwan et al., 2018).

L'activité antibactérienne des NPs (Ag et Cu) dans la solution de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre a été comparée à celle de certains antibiotiques. Les solutions de NPs ont été utilisées à différentes concentrations (50mg/l, 150mg/l).

L'activité antibactérienne a été testée sur cinq souches bactériennes dont 2 souches cliniques (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) et 3 souches de référence (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), par la méthode de diffusion sur gélose qui consiste à l'application directe des NPs ou des antibiotiques sur les colonies de ces souches. Cette méthode nous a permis d'observer l'effet de chacune des molécules testées par la présence ou l'absence de la zone d'inhibition.

Les NPs d'Ag se sont avérés efficaces sur toutes souches bactériennes étudiées et surtout à concentration (150mg/l). Contrairement à ce qui était attendu, certains antibiotiques se sont montrés moins efficaces sur les mêmes souches. Ce résultat est d'une importance majeure. En effet, il ouvre une nouvelle brèche dans la possibilité d'utiliser ces NPs pour remplacer certains antibiotiques.

Ce travail pourrait alors être un nouveau pas dans la découverte de nouvelles alternatives dans la lutte contre la résistance bactérienne et contribuer ainsi à résoudre cette véritable menace universelle alors que d'autres tests sur de nouvelles espèces et avec de nouvelles concentrations seraient d'un grand apport scientifique pour ce domaine important de la recherche et de la vie humaine.

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

1. **Zeyons, Ophélie**, 20 octobre 2008, *Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement.* s.l. : Université Pierre et Marie Curie - Paris, p. 23.
2. **Chudobova, Dagmar, et al.** 28 juin 2013, *Complexes of Silver(I) Ions and Silver Phosphate Nanoparticles with Hyaluronic Acid and/or Chitosan as Promising Antimicrobial Agents for Vascular Grafts.* s.l. : licensee MDPI, International Journal of molecular Sciences, p. 13596.
3. **SAJID, M, et al.** 2015, *Impact of nanoparticles on human and environment : review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects.* *Environ sci pollut res Int.* 22, 4122- 43.
4. **M.N., Khebbeb.** 2015, *Evaluation d'une toxicité induite par des nanoparticules (ZnO) sur deux modèles biologiques unicellulaires (Saccharomyces cerevisiae et Paramecium sp.* Thèse de doctorat: toxicologie. Annaba : Université badji mokhtar, p 18.
5. **Midander, Klara, et al.** , 2009, *Surface Characteristics, Copper Release, and Toxicity of Nano- and Micrometer-Sized Copper and Copper(II) Oxide Particles: A Cross-Disciplinary Study.* s.l. : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, small journal, p. 391.
6. **Jeevanandam, Jaison, et al.** 3 avril 2018, *Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations.* s.l. : licensee Beilstein-Institut, Beilstein Journal of Nanotechnology, pp. 1053-1054.
7. **Deckers, Angélique.** 19 mars 2009, *Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique.* **Simon-** s.l. : Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), , p. 8.
8. **Lanone, S et Boczkowski, J.** 11 mars 2010, *Les sources de nanoparticules.* s.l. : Elsevier Masson, Revue française d'allergologie, p. 212.
9. **Guitou, Marie-Anne.** 23 juin 2014, *Nanoparticules et santé : des applications aux risques potentiels. L'exemple du TiO2.* s.l. : UNIVERSIT DE BORDEAUX, pp. 34-35.
10. **Avis de l'AFSSET et rapport du groupe d'experts.** juillet 2006, *Les nanomatériaux effets sur la santé de l'homme et sur l'environnement.* s.l. : Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail, Afsset, pp. 11-14.
11. **Andrieux - Ledier, Amandine.** 29 mai 2013, *Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques.* s.l. : Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, HAL, p. 21.

BIBLIOGRAPHIE

12. **Khan, Ibrahim, Saeed, Khalid et Khan, Idrees.** 18 mai 2017, *Nanoparticles: Properties, applications and toxicities*. s.l. : Elsevier B.V. on behalf of King Saud University, Arabian Journal of Chemistry, p. 909.
13. **Jordanovska, Svetlana.** 15 decembre 2015, *Les nanoparticules dans l'industrie pharmaceutique: comparaison des méthodes de fabrication*. s.l. : Sciences pharmaceutiques, HAL, p. 23.
14. **Chuto, G, Chaumet-Riffaud, P et (SFMN).** 12 février 2010, *Les nanoparticules*. s.l. : Elsevier Masson SAS, Médecine Nucléaire, pp. 371-373.
15. **Ostiguy, Claude, et al.** mai 2010, *Les nanoparticules de synthèse Connaissances actuelles sur les risques et les mesures de prévention en SST*. s.l. : l'Institut de recherche Robert-Sauvé en santé et en sécurité du travail (IRSST), p. 10.
16. **Bsaibess, Talia.** 23 octobre 2015, *Nanoparticules organiques ultra-brillantes pour l'imagerie biologique*. s.l. : Chimieorganique Université de Bordeaux, HAL, p. 19.
17. **Kurtz-Chalot, Andréa.** 28 novembre 2014, *Internalisation cellulaire et effets biologiques de nanoparticules fluorescentes de silice. Influence de la taille et de la charge de surface*. s.l. : Génie des procédés. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, HAL, p. 20.
18. **McNamara, Karrina et A. M. Tofail, Syed.** 23 novembre 2016, *Nanoparticles in biomedical applications*. s.l. : Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, Advances in Physics: X, pp. 61- 67.
19. **Fodil, Kamel.** 13 janvier 2015, *De la détection à l'imagerie de nanoparticules magnétiques*. s.l. : Electromagnétisme. Université de Caen, HAL, p. 13.
20. **Triboulet, Sarah.** 6 mars 2015, *Etude des effets de deux types de nanoparticules métalliques sur des macrophages murins par une approche protéomique*. s.l. : Université de Grenoble, HAL, p. 62.
21. **Sedira, S.** 2014, *étude et synthèse des nanostructures pour application en biomédicale et environnementale: cas de nanoparticules de ZnO, Ag et couches minces de type C-TiN*. s.l. : Université de Constantine1, p. 112.
22. **Mtimet, Issam.** 19 janvier 2012, *Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent*. p. 18.
23. **Boczkowski, J et Lanone, S.** 4 mars 2010, *Nanoparticules : une prévention est-elle possible ?* s.l. : Elsevier Masson SAS, Revue française d'allergologie, p. 215.
24. **O, W, MYRIAM RICAUD.** 2012, *les nanomatériaux. définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention*. s.l. : INRS.
25. **Ameh, Thelma et M. Sayes, Christie.** 5 juillet 2019, *The potential exposure and hazards of copper nanoparticles*. s.l. : Elsevier B.V., Environmental Toxicology and Pharmacology, p. 2.

BIBLIOGRAPHIE

26. **MAURICE, Guillaume et LEFEBVRE, Edouard.**2008, *Nanoparticules : santé et environnement*. s.l. : ÉCOLE DES MINES DE DOUAI, pp. 32-37.
27. **MYRIAM, RICAUD et O.W.**2012,*Les nanomateriaux. Définitions, risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention*. INRS..
28. **OBERDORSTER, G, OBERDORSTER, E et & OBERDORSTER, J.** 2005,*Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine particles*. *Environ Health Prespect.* 113,823-39.
29. **Institute of Occupational Medicine for the Health and Safety Executive,** 2014,*Nanoparticles: An occupational hygiene review*. the Health and Safety Executive.
30. **BERGIN, et al.** 2013, *NANOPARTICULE TOXICITY BY THE GASTROINTESTINAL ROUTE: evidence and knowledge gaps*.*int J Biomed Nanosci Nanotechnol*, 3.
31. Lingling Zhang et all (2010) Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli p1632
32. **SS, Tinkle, et al.** 2003, *Skin as a route of exposure and sensitization in chronic beryllium disease*. *Environ Healt Perspect.* 111: 1202-1208.
33. **L, Ohl, et al.** 2004,*CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions*. *Immunity* . 21: 279- 288 .
34. **B.A, Arvidson.** 1994,*A review of axonal transport of metals*, *Toxicology.* 88: 1-14.
35. **MA, Akerman, et al.** 2002, *Nanocrystal targeting in vivo*. *Proc Natl Acad Sci . USA* : s.n., 99, 12617-12621.
36. **M, Bartneck, et al.**2010,*Phagocytosis independent extra-cellular nanoparticle clearance by human immune cells*. *Nano Lett.* 10: 59-63.
37. **RICAUD, M et & WITSCHGER,O.**2012,*Les nanomateriaux: définitions; risques toxicologiques, caractérisation de l'exposition professionnelle et mesures de prévention*, INRS.
38. **L'AFSSET, A et A.D.**2006,*Les nanomateriaux.effets sur la santé de l'homme et sur l'environement, agence francaise de securité sanitaire de l'environement rt du travail paris*,p248.
39. **UNFRIED, K, et al.** 2007,*Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms*.*Nanotoxicology* . 1, 52-71.
40. **WANG, BING, et al.** 2012,*Metabolism of Nanomaterials in Vivo: Blood Circulation and Organ Clearance*. s.l. : American Chemical Society, ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH, pp. 765-767.
41. **UNFRIED, K, et al.** 2007, *Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms*. *Nanotoxicology.*. 1, 52-71.

BIBLIOGRAPHIE

42. **Chio, SH, et al.** 2007, *Renal clearance of quantum dots.* *Nat Biotechnol.* 25: 1165-1170.
43. **UNFRIED, K, et al.** 2007, *Cellular responses to nanoparticles: Target structures and mechanisms.* *Nanotoxicology.* 1, 52-71.
44. **Cohignac, Vanessa.** 13 septembre 2016, *Réponse macrophagique à des nanoparticules manufacturées: effets de leurs caractéristiques physico-chimiques sur l'autophagie.* s.l. : L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement, , HAL, pp. 27-36.
45. **MARANO, F, et al.** 2011, *Nanoparticles: molecular targets and cell signalling.* *Arch Toxicol.*, 85, 733-41.
46. **J Kelly, Frank.** 2003, *OXIDATIVE STRESS: ITS ROLE IN AIR POLLUTION AND ADVERSE HEALTH EFFECTS.* s.l. : guest, *Occup Environ Med*, p. 612.
47. **T.C, LONG, et al.** 2007, *nanosize titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro.* 1631-7, s.l. : *environ health perspect*, p. 115.
48. **MAGREZ, A, et al.** *Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials.* *Nano Lett.* 6, 1121-5.
49. **Song, Wenhua, et al.** 2010, *Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles.* s.l. : Elsevier Ireland Ltd, *Toxicology Letters*, p. 395.
50. **GROSSE, Y, et al.** 2014. *Carcinogenicity of fluoro-edenite , silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes.* *Lancet Oncol.* 15, 1427-8.
51. **Muñoz, Alexandra et Costa, Max.** 2012, *Elucidating the mechanisms of nickel compound uptake: A review of particulate and nano-nickel endocytosis and toxicity.* s.l. : Elsevier Inc, *Toxicology and Applied Pharmacology*, p. 3.
52. **XIA, T, LI,N et & NEL,A.E.** 2009. *Potential health impact of nanoparticles.* *Annu Rev Public Health.* 30, 137-50.
53. **Ltd, Toxikos Pty.** novembre 2009, *Engineered nanomaterials: A review of the toxicology and health hazards.* s.l. : Commonwealth of Australia, p. 31.
54. **MILLER,M,R, et al.** 2017. *Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease.* *ACS Nano.* 11, 4542-4552.
55. **BAKAND, S, HAYES,A et & DECHSAKULTHORN,F,**2012. *Nanoparticles: a review of particle toxicology following inhalation exposure.* *Inhal Toxicol.* 24, 125- 35.
56. **WIN-SHWE, T,T et & FUJIMAKI,H.** 2011, *Nanoparticles and neurotoxicity.* *Int J Mol Sci.* 12, 6267-80.
57. **ASHARANI, P,V, et al.** 2009, *Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells.* *ACS Nano.*, 3, 279-290.

BIBLIOGRAPHIE

58. **TAYLOR, A,A, et al.** 2015,*Metal oxide nanoparticles induce phenotypic changes in a model colon gut microbiot.* *Environemental Engineering Science.* 32, 602-612.
59. **GRECO, F, et al.** 2015,*Reprotoxicité des nanoparticules.* *Gynécologie obstétrique & fertilité.* 43, 49-55.
60. **Gaffet, Eric** 7 juin 2011,*Nanomaterials : a review of the definitions, applications,health effects. How to implement secure development.* s.l. : Nanomaterials Research Group – UMR CNRS 5060, HAL, p. 6.
61. **Rapport du Comité de la Prévention,** 3 février 2020,*Nanotechnologie – Nanoparticules: Quels dangers, quels risques ?.* p. 24.
62. **Ruparelia, et al.** 2008,*Strain Specificity in Antimicrobial Activity of Silver and Copper Nanoparticles.*
63. <https://www.futura-sciences.com/sciences/dossiers/chimie-argent-metal-precieux-731/page/2/>.
64. **Centre d'Information du Cuivre, Laitons et Alliages.** 2010,*Antimicrobial Copper.* [En ligne]. www.antimicrobialcopper.com.
65. I N E R I S - Données technico-économiques sur les substances chimiques en France. [En ligne] Mars 2015. [file:///C:/Users/MiNoUcHa/Downloads/Cuivre%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/MiNoUcHa/Downloads/Cuivre%20(1).pdf).
66. SUPERPROF.FR. [En ligne] <https://www.superprof.fr/ressources/scolaire/physique-chimie/tout-niveau/tableau-periodique/metal-precieux.html>.
67. <https://copperalliance.fr/le-cuivre/les-proprietes-du-cuivre/les-proprietes-physiques-du-cuivre/>.
68. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/argent-metal/3-proprietes/>.
69. <https://national.udppc.asso.fr/>
70. <https://www.futura-sciences.com/sciences/dossiers/chimie-argent-metal-precieux-731/>.
71. <https://www.lenntech.fr/>
72. Toxicité des métaux et de leurs différentes formes. [En ligne] 10 10 2002. https://solidarites-sante.gouv.fr/IMG/pdf/Tableau_Toxicite_des_métaux_et_des_metalloides_sous_leurs_différentes_formes_chimiques_.pdf.
73. LENNTECH . [En ligne] <https://www.lenntech.fr/periodique/elements/ag.htm>.
74. [<https://www.lenntech.fr/periodique/elements/cu.htm#Impact%20sur%20l'environnement>] s.l. : Lenntech BV .
75. **Vernis, Laurence.** 27 octobre 2017,*Effets des nanoparticules d'argent sur les communautés bactériennes.* s.l. : Bul-letin de veille scientifique en sécurité sanitaire de l'environnement et du travail, , HAL, p. 12.

BIBLIOGRAPHIE

76. **Mtimet, Issam.**2011,*Thèse de doctorat sur Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent*. Rouen : Université d'INSA, HAL.
77. **G, Dorra, Amira Z et & Boumaaza sara.** juin 2013,*Activité antibactériennes des nanoparticules métalliques vis-à-vis de quelque bactérie pathogène* . Guelma : Université 08 mai 1945.
78. **Rajeshkumar, S et Malarkodi, C.** 17 septembre 2014,*In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles against Foodborne Pathogens*. s.l. : the Creative Commons Attribution License, Hindawi Publishing Corporation Bioinorganic Chemistry and Applications.
79. **Soleimani, Mohammad et Habibi-Pirkoohi, Maziar.**2017,*Biosynthesis of silver nanoparticles using Chlorella vulgaris and evaluation of the antibacterial efficacy against Staphylococcus aureus*. s.l. : University of Medical Sciences,Tehran, Iran, , Avicenna J Med Biotech.
80. **Suwan, Tamsiri, et al.** 27 octobre 2018, *Effect of rice variety and reaction parameters on synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles*. s.l. : Faculty of Pharmacy, Chiang Mai University, Chiang Mai, Drug Discoveries & Therapeutics.
81. **Fernando, SSN, Gunasekara, TDCP et Holton, J.** 23 avril 2018,*Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action*. s.l. : Creative Commons Attribution License, , Sri Lankan Journal of Infectious Diseases, pp. 4-5.
82. **Rai, Mahendra et Kon, Kateryna.**2016,*Antibiotic Resistance: Can Nanoparticles Tackle the Problem?* s.l. : Elsevier Inc, Academic Press, p. 126.
83. **Danguy Cavassin, Emerson, et al.** 2015,*Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria*. s.l. : the Creative Commons Attribution 4.0 International License, Journal Nanobiotechnology.
84. **Li, Runze, et al.** 29 novembre 2016,*Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria*. s.l. : University of California, PNAS.
85. **Ameh, Thelma et M. Sayes, Christie.**5 juillet 2019, *The potential exposure and hazards of copper nanoparticles*. s.l. : Elsevier B.V., Environmental Toxicology and Pharmacology, p. 103220.

RÉSUMÉ

RESUME

Résumé

Face à l'augmentation de la résistance aux antibiotiques l'utilisation des métaux tel que le cuivre et l'argent pour prévenir leur prolifération est devenu la meilleure alternative.

Ce travail a eu pour objectif d'étudier l'activité antibactérienne des sels de cuivre et d'argent dans l'acétate de cuivre et le nitrate d'argent ainsi que leur mélange équimolaire. Ces sels, ont été testés sur une série de cinq bactéries différentes dont 3 souches de références *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *staphylococcus aureus* ainsi que 2 souche hospitalière : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Cette évaluation de l'activité a été effectuée par le suivi de la croissance bactérienne avec la méthode de diffusion sur milieu gélosé pour les deux solutions (acétate de cuivre et nitrate d'argent) [150 et 50mg/l], Les résultats ont révélé d'une part, l'effet inhibiteur durable de sels d'argent et de cuivre.

A l'issue de ce travail il ressort que l'activité antibactérienne est meilleure pour le nitrate d'argent à [150 mg/l] et moyenne à une concentration de [50 mg/l], Contrairement à l'acétate de cuivre qui ne montre aucune efficacité sur les mêmes souches étudiées et avec les mêmes concentrations

Mots clés : Acétate de cuivre, nitrate d'argent, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*.

RESUME

Abstarct

In the face of increasing antibiotic resistance, the use of metals such as copper and silver to prevent their proliferation has become the best alternative.

The objective of this work was to study the antibacterial activity of copper and silver salts in copper acetate and silver nitrate and their equimolar mixture. These salts, were tested on a series of five different bacteria including 3 reference strains *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus* as well as 2 hospital strain: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

This activity assessment was carried out by monitoring bacterial growth with the agar diffusion method for both solutions (copper acetate and silver nitrate) [150 and 50mg/l], The results revealed on the one hand, the long-lasting inhibitory effect of silver and copper salts.

At the end of this work it appears that antibacterial activity is better for silver nitrate at [150 mg/l] and average at a concentration of [50 mg/l], Unlike copper acetate which shows no efficacy on the same strains studied and at the same concentrations

Keywords: Copper acetate, silver nitrate, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*.

وفي مواجهة المقاومة المتزايدة للمضادات الحيوية، أصبح استخدام المعادن مثل النحاس والفضة لمنع انتشارها أفضل بديل.

يهدف هذا العمل إلى دراسة النشاط المضاد للبكتيريا الذي تقوم به أملاح النحاس والفضة في أسيتات النحاس والنترات الفضية ومزيج بينهما. تم اختبار هذه الأملاح على سلسلة من خمسة بكتيريا مختلفة بما في ذلك 3 سلالات مرجعية من *Escherichia coli* ، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* بالإضافة إلى إجهاد المستشفى:

Pseudomonas aeruginosa ، *Escherichia coli*

وقد تم إجراء هذا التقييم عن طريق رصد النمو البكتيري مع طريقة نشر الأغار للحلين (الأسيتات النحاسية والنترات الفضية) [150 و 50 ملغ/ل]، وقد كشفت النتائج من ناحية، التأثير المثبط طويل الأمد للأملاح الفضية والنحاسية. وفي نهاية هذا العمل، يبدو أن النشاط المضاد للبكتيريا أفضل بالنسبة للنترات الفضية عند [150 ملغ/لتر] ومتوسط التركيز [50 ملغ/لتر]، على عكس الأسيتات النحاسية التي لا تظهر فعالية على نفس السلالات التي تمت دراستها وعلى نفس التركيزات

الكلمات المفتاحية: نترات الفضة , اسيتات النحاس , *Escherichia coli* , *Pseudomonas aeruginosa* و

Staphylococcus aureus

ANNEXE

Annexe 01 : Milieux de culture

1. Milieu de Chapman

La formule théorique de ce milieu de culture en g/L d'eau purifiée est :

Extrait de viande (bovin ou porcin).....	1g
Peptone de caséine et de viande (bovin et porcin).....	10g
Chlorure de sodium.....	75g
Mannitol.....	10g
Agar.....	15g
Rouge de phénol.....	0,025g

pH=7,6

2. Milieu Hektoen

Protease peptone.....	12,0g
Extrait de levure.....	3,0g
Lactose.....	12,0g
Saccharose.....	12,0g
Salicine.....	2,0g
Citrate de fer III et d'ammonium.....	1,5g
Sels biliaire.....	9,0g
Fuschine acide.....	0,1g
Bleu de bromothymole.....	0,065g
Chlorure de sodium.....	5,0g
Thiosulfate de sodium.....	5,0g
Agar.....	13,0g

pH = 7.5

3. Gélose Mueller-Hinton

Infusion de viande de boeuf.....	300ml
Peptone de caséine.....	17.5g
Amidon de maïs.....	1.5g
Agar.....	10.0g

pH= 7.4

4. Citrate de Simmons

Sulfate de Mg.....	0,2g
Phosphate monoammoniaqué.....	1g
Phosphate bipotassique.....	1g
Citrate de sodium.....	2g
NaCl.....	5g
BBT.....	0,08g
Agar.....	15g

pH=6,8

5. TSI

Peptone.....	15,0 g
Extrait de viande.....	3,0 g
Extrait de levure.....	3,0 g
Peptonepepsique de viande.....	5,0 g
Glucose.....	1,0 g
Lactose.....	10,0 g
Saccharos.....	10,0 g
Rouge de phénol.....	0,024 g
Chlorure de sodium.....	5,0 g

Sulfate de fer II (Pasteur).....0,2 g

Thiosulfate de sodium.....0,3 g

Agar.....11,0 g

pH = 7,5

6. Mannitol mobilité

Peptone tryptique de viande.....20g

Mannitol.....2g

RP 1%.....4mL

Nitrate K.....1g

Agar.....4g

pH = 7,6-7,8

Annexe 02 :

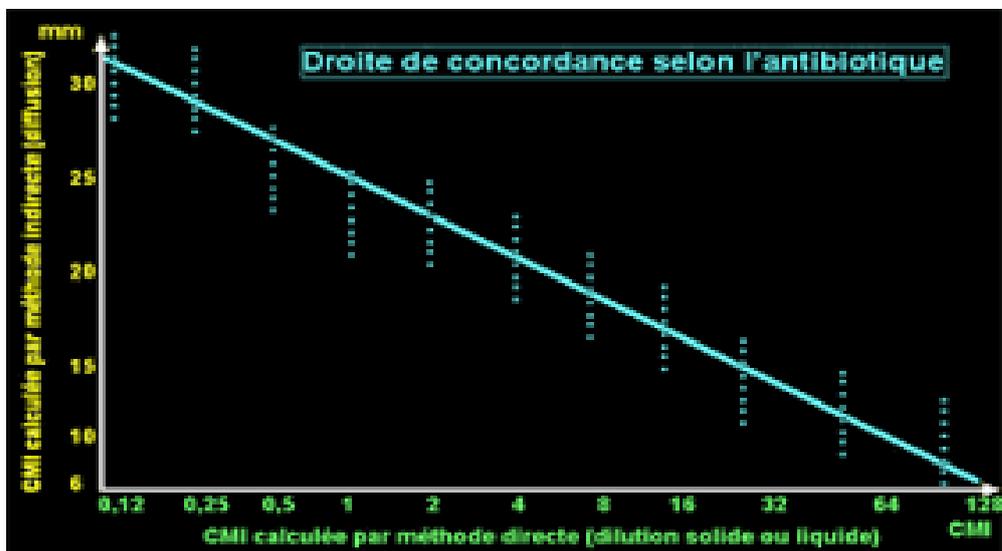


Figure : la courbe de concordance