

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I  
Frères Mentouri Constantine I University  
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de biologie appliquée

قسم البيولوجيا التطبيقية

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master**

**Domaine :** Sciences de la Nature et de la Vie

**Filière :** Science biologique

**Spécialité :** Microbiologie et hygiène hospitalière

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

---

**Utilisation de quelques nanoparticules comme moyen de lutte  
contre les infections microbiennes**

---

Présenté par : BENZEMARI Ouassila

Le 23/06/2022

HAMLAOUI Kenza

**Jury d'évaluation :**

**Encadreur :** Dr. YUCEF ALI. M (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** Dr. BATAICHE. I (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** Dr. ZITOUNI. H (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Année universitaire  
2021 – 2022**

# Remerciement

*Au terme de ce modeste travail, je tiens à remercier en premier lieu **Allah** tous puissant de m'avoir donné le courage et la puissance pour accomplir ce petit projet.*

*En second lieu, nous tenons à exprimer nos vifs remerciements à **Mme Youcef ali .Mounia**,*

*Maître de conférences à l'Université Frères Mentouri de Constantine 1, qui est un encadreur attentive et disponible.*

*beaucoup aidés. Nous la remercions, pour son assistance matérielle et morale, pour son aide et son soutien.*

*Grace à votre esprit pédagogique et rigoureux, et pour vos Conseils précieux, complétés avec succès. Que Dieu Tout Puissant vous bénisse Santé, prospérité et bonheur.*

*Nous tenons à remercier l'ensemble de notre jury*

*En premier **Mme Bataiche. Insaf***

*Maître de conférences à l'Université des Frères Mentouri Constantin 1; à juger pour ce travail et insigne C'est un honneur qu'elle ait accepté d'être présidente du jury pour ce mémoire.*

*Un grand merci à **Mme Zitouni .Hind** ,*

*Maître de Conférences, Université Frères Mentouri Constantin 1; pour accepter de revoir et d'évaluer cet humble travaille.*



## *Dédicaces*

*Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour le respect et la reconnaissance.*

*Aussi, c'est tout simplement que :*

*Je dédie cette Mémoire*

**A ma très chère mère**

*Aucune dédicace très chère maman, ne pourrait exprimer la profondeur des sentiments que j'éprouve pour vous, vos sacrifices innombrables .*

*Vous avez guetté mes pas, et m'avez couvé de tendresse, ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Puisse Dieu, tout puissant vous comblez de santé de bonheur et vous procurer une longue vie.*

**A mon père**

*A la lumière de mes jours, la source de mes efforts, la flamme de mon cœur, ma vie et mon bonheur ; maman que j'adore.*

**A mon frère :Nour Eddine et ma belle-sœur : Amina**

**A ma sœur Nesrine et mon beau-frère : Bilal**

*Pour leur soutien moral et leurs conseils précieux tout au long de mes études.*

*A ma chère nièce et neveu*

*J'espère être un bon exemple pour eux.*

**A Maiassi Skander , Ines , Amina , Inchirah ,**

*je vous dédie ce travail avec mes souhaits de bonheur, de réussite et de bonne santé et tous ceux qui ont apporté leur contribution, petite ou grande, à mon mémoire de fin d'études.*

**A mon chère binôme, Ouassila**

*Pour son soutien moral, sa patience, sa sympathie et sa compréhension tout au long de ce travail.*

**Kenza**





## *Dédicaces*

*Tout d'abord, je tiens à remercier Dieu pour m'avoir guidée pour atteindre ce stade.*

*Je dédie ce travail :*

*A celle qui m'a arrosé de tendresse et d'espoirs, à ma source de force "**Ma mère**".*

*A mon support dans ma vie, qui m'a appris et m'a dirigé vers la gloire "**Mon père**".*

*Un grand merci pour tous vos sacrifices, votre amour, votre encouragement, votre soutien et vos prières tout au long de mes études. Cette aventure n'aurait certainement pas existé sans vous, en témoigne de mon éternelle reconnaissance, que Dieu vous protège et vous prête bonne santé et longue vie.*

*A **mon mari** qui m'a chaleureusement supporté et encouragé.*

*A ma fille "**Rahaf**" qui a partagé avec moi tous les moments d'émotion lors de la réalisation de ce travail et qui m'a donné de l'amour et de la vivacité.*

*A mes frères et sœurs et ma belle-famille "**Bahi**" qui m'aiment en témoigne de mon amour et de ma profonde admiration et à qui je souhaite plus de succès.*

*Sans oublier mon binôme "**Kenza**" pour son soutien moral et sa patience et sa compréhension tout au long de ce projet.*



# TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>I</b>
<b>LISTES DES TABLEAUX</b>	<b>II</b>
<b>LISTE DES ABREVIATION</b>	<b>III</b>
<b>1- INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>2- Revue bibliographique</b>	<b>2</b>
<b>2.1-Les nanoparticules</b>	<b>3</b>
2.1.1- Généralité sur les nanoparticules(Nps)	4
2.1.2- Définition des nanoparticules	4
2.1.3- Origine des nanoparticules	5
2.1.4- Classification des nanoparticules	5
2.1.5- Les propriétés physicochimiques des nanoparticules	6
2.1.6- Méthode de synthèse des nanoparticules	7
2.1.7- Les applications des nanoparticules	8
2.1.8- Toxicité des nanoparticules	9
2.1.9- Mécanisme d'action des nanoparticules	11
<b>2.2- Nanoparticule d'argent</b>	<b>13</b>
2.2.1- L'argent	14
2.2.2 - Propriété d'argent	14
2.2.3 - Activités biologiques d'argent	15
2.2.4- Toxicité de nanoparticule d'argent	15
<b>2.3-Nanoparticule de cuivre</b>	<b>17</b>
2.3.1- Définition du cuivre	18

2.3.2- Propriété du cuivre	18
2.3.3- Activité antimicrobienne de nanoparticule de cuivre	18
2.3.4- Toxicité de nanoparticule de cuivre	19
<b>3- MATERIELS ET METHODES</b>	<b>21</b>
<b>3.1- Origine des souches bactériennes</b>	<b>21</b>
<b>3.2 - Etude bactériologique</b>	<b>21</b>
3.2.1- Etude macroscopique	22
3.2.2-Etude microscopique	22
3.2.3- Etude des caractères biochimiques	22
3.2.3.1-Test biochimique classique	22
3.2.3.1-Galerie Api 20 E	22
3.2.4 - Etude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre	25
3.2.5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice	25
3.2.6- Conservation des souches bactériennes	29
<b>3.3– Etude fongique</b>	<b>29</b>
3.3.1- Etude morphologique	29
3.3.2 - Etude de l'activité antifongique des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre	30
3.3.3- Conservation des souches fongiques	31
<b>4- Résultats et discussion</b>	<b>34</b>
<b>4.1- Etude bactériologique</b>	<b>34</b>
4.1.2- Etude microscopique	3
4.1.3-Etude des caractères biochimiques	37
4.1.3.1 -Test biochimique Classique	37
<b>4.2- Etude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre</b>	<b>44</b>

<b>4.3- Etude fongique</b>	<b>47</b>
4.3.1–Etude morphologique	47
<b>4.4 - Etude de l'activité antifongique du nitrate d'argent et de acétate de cuivre</b>	<b>48</b>
<b>5-Conclusion générale et perspectives</b>	<b>53</b>
<b>6-Références</b>	<b>54</b>
<b>7-Annexes</b>	<b>55</b>
<b>8-Résumé</b>	<b>56</b>
<b>9- Abstract</b>	<b>58</b>
<b>10-ملخص</b>	<b>66</b>

# *Liste de figure*

<b>N° Figure</b>	<b>Titre de figure</b>	<b>Numéro de page</b>
<b>01</b>	Différentes formes des nanoparticules	<b>04</b>
<b>02</b>	Les deux principales voies de préparation des nanoparticules métalliques	<b>07</b>
<b>03</b>	mécanisme d'action des nanoparticule contre les bactéries	<b>11</b>
<b>04</b>	Présentation de la galerie API 20 <sup>E</sup> avant inoculation	<b>25</b>
<b>05</b>	différentes solutions préparées avec les Nitrates d'argent et l'acétate de Cuivre.	<b>26</b>
<b>06</b>	Suspensions bactériennes standardisées préparées	<b>27</b>
<b>07</b>	Réalisation de puits à l'aide d'une pipette Pasteur	<b>27</b>
<b>08</b>	Dépôt des différentes concentrations de nanoparticules sur gélose MH étalée par la suspension bactérienne et perforée avec des puits	<b>28</b>
<b>09</b>	les différentes concentrations de AgNO <sup>3</sup> préparées	<b>29</b>
<b>10</b>	Aspect macroscopique(A) d' <i>Escherichia coli</i> et(B) de <i>Klebsiella sp.</i>	<b>35</b>
<b>11</b>	Aspect macroscopique de (A) <i>Streptococcus pneumoniae</i> et (B) <i>Staphylococcus coagulase négative</i> .	<b>35</b>
<b>12</b>	Coloration de Gram positive (A) <i>Staphylococcus coagulase négative</i> et (B) <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>36</b>
<b>13</b>	Coloration de Gram négative : (A) <i>Escherichia coli</i> et (B) <i>Klebsiella sp.</i>	<b>37</b>
<b>14</b>	Test de catalase positive démontré par production de bulles par les souches bactériennes	<b>38</b>
<b>15</b>	Test d'oxydase négatif : (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Klebsiella sp.</i> , (C) <i>Staphylococcus coagulase négative</i> , (D) <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>39</b>
<b>16</b>	Recherche de nitrate réductase, absence de couleur rouge après l'ajout de réactif de Griess et poudre de zinc par les bactéries (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Klebsiella sp.</i> ,(C) <i>Staphylococcus coagulase négative</i> .	<b>40</b>
<b>17</b>	Résultats de test NR positif après l'ajout de poudre de zinc par la bactérie <i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>40</b>

<b>18</b>	Test d'utilisation du Glucose et Lactose sur milieu K.I.A : aucun virage de couleur n'a été observé par les quatre souches bactériennes.	<b>41</b>
<b>19</b>	détermination de la voie d'attaque de glucides des souches (A) <i>Staphylococcus coagulase négatif</i> , (B) <i>Escherichia coli</i> et (C) <i>Streptococcus pneumoniae</i> possédant un métabolisme inactif.	<b>42</b>
<b>20</b>	détermination de la voie d'attaque de glucides de la souche (D) <i>Klebsiella sp.</i> Possède un métabolisme oxydatif.	<b>43</b>
<b>21</b>	résultat de la Galerie API 20 <sup>E</sup> d' <i>Escherichia coli</i>	<b>43</b>
<b>22</b>	résultat de la Galerie API 20 <sup>E</sup> de <i>Klebsiella sp.</i>	<b>43</b>
<b>23</b>	résultat d'Api web d' <i>Escherichia coli</i>	<b>44</b>
<b>24</b>	résultat d'API web de <i>Klebsiella sp.</i>	<b>44</b>
<b>25</b>	zones d'inhibitions obtenues après test de diffusion sur gélose des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre sur les bactéries pathogènes : (A) <i>Klebsiella sp.</i> ; (B) <i>Escherichia coli</i> ; (C) <i>Staphylococcus coagulase négatif</i> ; (D) <i>Streptococcus pneumoniae</i> .	<b>45</b>
<b>26</b>	CMI développée par les nitrates d'argent face à (A) <i>Staphylococcus coagulase négatif</i> ; (B) <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; (C) <i>Escherichia coli</i> ; (D) <i>Klebsiella sp.</i>	<b>47</b>
<b>27</b>	Aspects macroscopiques de (A) <i>Candida albicans</i> ; (B) <i>Microsporium canis</i> (kdada,2012) ; (C) <i>Trichophyton rubrum</i> (kdada,2012).	<b>48</b>
<b>28</b>	test de diffusion sur gélose anti- <i>Candida albicans</i> .	<b>49</b>
<b>29</b>	Résultat de diffusion sur gélose de <i>Klebsiella sp</i>	<b>46</b>

## *Liste des Tableaux*

<b>N°</b>	<b>Titre de tableau</b>	<b>N° de page</b>
<b>01</b>	les différents domaines d'application des nanoparticules	<b>08</b>
<b>02</b>	Propriété chimique et physique d'argent	<b>14</b>
<b>03</b>	Propriété chimique et physique d'argent	<b>18</b>
<b>04</b>	Souches bactériennes et fongiques utilisées	<b>21</b>
<b>05</b>	Caractères macroscopiques des colonies bactériennes sur gélose	<b>36</b>
<b>06</b>	récapitulatif des résultats de l'activité antibactérienne de l'AgNO <sub>3</sub> , du Cu <sub>2</sub> O et de leur mélange.	<b>46</b>
<b>07</b>	caractères morphologiques des souches fongiques	<b>49</b>
<b>08</b>	résultats du test d'activité antifongique des AgNO <sub>3</sub> et Cu <sub>2</sub> O	<b>50</b>

## *Liste des abréviations*

<b>CHU</b>	Hospital Universitaire Constantine
<b>NRs</b>	les nanoparticule
<b>MH</b>	Muller Hinton
<b>CLSI</b>	Clinical and laboratory standards institute
<b>Ag</b>	argent
<b>Cu</b>	cuivre
<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrate d'argent
<b>nm</b>	nanomètre
<b>NTC</b>	nanotube de carbone
<b>LSPR</b>	Résonance de plasmous de surface localisé
<b>UV</b>	ultra-violet
<b>AgNPs</b>	les nanoparticule d'argent
<b>IN</b>	Infection nosocomiale
<b>NPCuo</b>	nanoparticule de cuivre
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>SCN</b>	<i>Staphylococcus coagulase négative</i>
<b>Sab</b>	Milieu Sabouraud

# **1- Introduction**

## **Introduction**

Au cours des dernières années, les bactéries multirésistantes ont été très réactives et représentent un risque mortel à l'échelle mondiale en raison de l'utilisation prolongée d'agents antimicrobiens. La préoccupation croissante concernant les micro-organismes résistants aux médicaments a incité la recherche de nouveaux agents antimicrobiens plus efficaces (**Levy et al., 2004**) (**Bush et al., 2011**). De nouveaux agents peuvent être obtenus à partir de sources biologiques telles que les bactériocines et les huiles essentielles. Récemment, les nanosciences et les nanotechnologies ont ouvert une nouvelle voie et révolutionné toutes les technologies dans le monde.

La nanotechnologie fait référence à la science de la conception, de la production et de l'exploitation de structures et de dispositifs qui ont un ou plusieurs composants de l'ordre d'un milliardième de millimètre (100 nanomètres) ou moins. Ils sont également utilisés dans les cosmétiques et les crèmes solaires, les textiles, les revêtements, certaines technologies alimentaires et énergétiques, et certains produits médicaux et pharmaceutiques (Angélique, 2008).

De nombreuses nanoparticules (NPS) ont des effets antimicrobiens contre différentes souches bactériennes et fongiques. Cet effet dépend plus ou moins de la nature et des propriétés des nanoparticules. Par conséquent, les nanoparticules métalliques d'Ag et de Cu présentent de fortes activités bactéricides et fongicides à partir de faibles concentrations, et ces effets antimicrobiens dépendent non seulement des propriétés mais également d'autres propriétés des nanoparticules, telles que la forme et la taille ou l'état d'agglomération (Angélique, 2008).

Pour cette raison l'objectif de notre travail c'est de tester et confirmer l'effet antimicrobien de deux nanoparticules d'oxydes métalliques d'argent (Ag) et de cuivre (Cu) sur des souches bactériennes et fongiques connues pour différentes pathologies humaines, en effet le travail porte sur une étude bibliographique approfondie traitant entre autres, l'importance des nanoparticules dans la lutte biologique tout en abordant leurs différents mécanismes d'action, une partie pratique comportant une identification approfondie des microorganismes utilisées, de différents tests d'activité antimicrobienne de l'Ag et du Cu vis-à-vis des souches pathogènes utilisées et enfin, une discussion approfondie des différents résultats obtenus.

## 2- Revue bibliographique



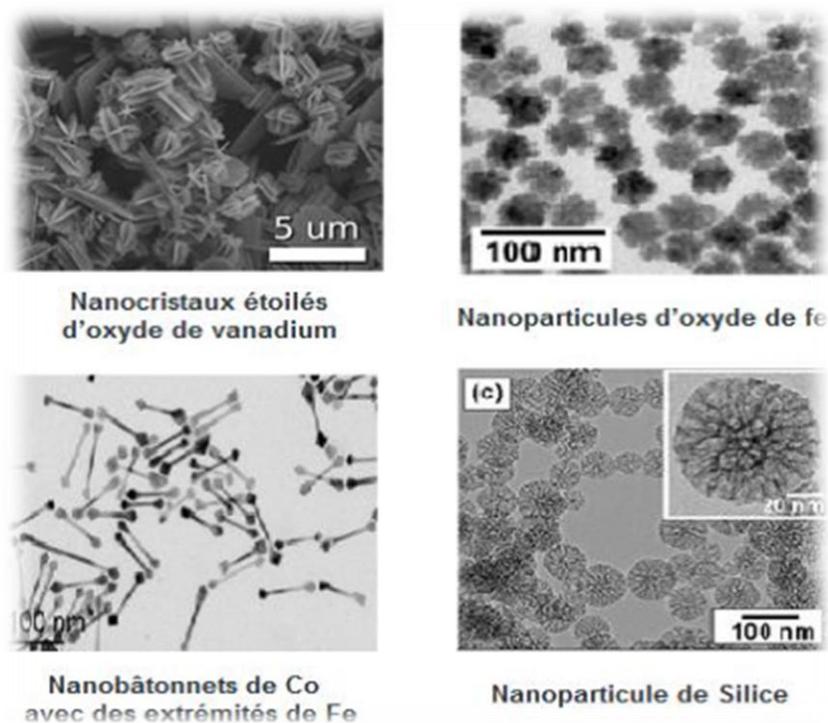


### **2.1.1- les nanoparticules , généralité**

Les nanoparticules existent depuis longtemps, voire depuis toujours, et les humains vivent en contact quotidien avec elles. Ces nanoparticules nous entourent, nous développent, partout ; dans l'air, par exemple dans les aérosols marins, dans les feux de forêts terrestres... mais que sont les nanoparticules ? où les trouve-t-on ? Dans quels domaines sont-ils utilisés ?

### **2.1.2-Définition des nanoparticules**

Le préfixe nanomètre signifie un milliardième de  $10^{-9}m$  donc un nanomètre (nm) est égal à un Milliardième de mètre. Une nanoparticule est définie comme une particule qui a un dimension dans au moins une direction spatiale est inférieure à 100 nm. (Lanone *et al.*, 2010) . Les nanoparticules résident dans le fait que la plupart des atomes qui composent la surface. NPs ont donc une surface d'échange (surface spécifique) très élevée, des centaines de mètres carrés par gramme de particules (Figure 01).



**Figure 01** : Différentes formes des nanoparticules (Badri.,2018).

### **2.1.3- L'origine des nanoparticules**

Les nanoparticules existent dans la nature, mais elles sont également fabriquées et utilisées dans de nombreux domaines (Sedira , 2014). Il existe trois types d'origine :

#### **❖ Nanoparticules d'origine naturelle**

Essentiellement produites par les phénomènes suivants : Nucléation et condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère (incendies, éruptions volcan...)

#### **❖ Nanoparticules d'origine anthropique non intentionnelle**

produites par le procédé températures élevées, comme le soudage ou la combustion du moteur (pollution, émissions

Diesel, diverses combustions, etc.).

#### **❖ Nanoparticules d'origine anthropique**

Nanoparticules fabriqués par l'industrie ou des laboratoires de recherche. (Andujar, 2009).

### **2.1.4- Classification des nanoparticules**

Les NPs sont généralement divisées en différentes catégories selon leur morphologie, leur taille et leurs propriétés chimiques ,caractéristiques physiques et chimiques, certaines des classes bien connues de NP sont données ci-dessous :

#### **• NP à base de carbone**

Les fullerènes et les nanotubes de carbone (NTC) représentent deux grands classes de NP à base de carbone. Les fullerènes contiennent des nanomatériaux qui sont en cage creuse globulaire comme les formes allotropiques de carbone. Ils ont créé un intérêt commercial notable également dans les nanocomposites pour de nombreuses applications commerciales comme les remplisseuses (Saeed et Khan, 2016, 2014). Le gaz efficace adsorbants pour l'assainissement de l'environnement (Ngoy *et al.*,2014). Et comme support pour différents inorganiques et les catalyseurs organiques (Mabena *et al.*, 2011).

#### **• NP métalliques**

Les NP métalliques sont uniquement faits des précurseurs de métaux. En raison de leur caractéristiques bien connues de résonance de plasmons de surface localisés (LSPR), ces NP

possèdent des propriétés optoélectriques uniques. NP de l'alkali et des métaux nobles c.-à-d. Cu, Ag ont un large bande d'absorption dans la zone visible du spectre solaire électromagnétique. La synthèse des NP métalliques contrôlée par la facette, la taille et la forme est importante aujourd'hui matériaux (**Dreaden et al., 2012**). En raison de leur optique avancée propriétés, les NP métalliques trouvent des applications dans de nombreux domaines de recherche..

- **Céramiques NP**

Les NP céramiques sont des solides non métalliques inorganiques, synthétisés via la chaleur et le refroidissement successif. On peut les trouver dans les amorphes ,formes polycristallines, denses, poreuses ou creuses (**Sigmund et al.,2006**). Par conséquent, ces NP reçoivent une grande attention de chercheurs en raison de leur utilisation dans des applications telles que la catalyse, photocatalyse, photo dégradation des colorants et applications d'imagerie. (**Thomas et al., 2015**)

### **2.1.5- les propriétés physicochimique des nanoparticules**

- **propriété électronique et optique**

Les propriétés optiques et électroniques des NP sont davantage interdépendantes. Par exemple, (**I. Khan et al.,2017**) les NP des métaux nobles ont des propriétés optiques dépendantes de la taille et présentent une forte Bande d'extinction UV-visible qui n'est pas présente dans le spectre du métal en vrac

- **propriété magnétique**

Les NP magnétiques sont d'une grande curiosité pour les chercheurs d'un gamme éclectique de disciplines, qui comprennent des disciplines hétérogènes et catalyse homogène, (**I. Khan et al.,2017**) ,biomédecine, fluides magnétiques, stockage de données imagerie par résonance magnétique (IRM) et environnement assainissement comme la décontamination de l'eau..

- **propriété mécanique**

Les propriétés mécaniques distinctes des NP permettent aux chercheurs de rechercher de nouvelles applications dans de nombreux domaines importants tels que tribologie, ingénierie des surfaces, nano fabrication .(**I. Khan et al.,2017**).

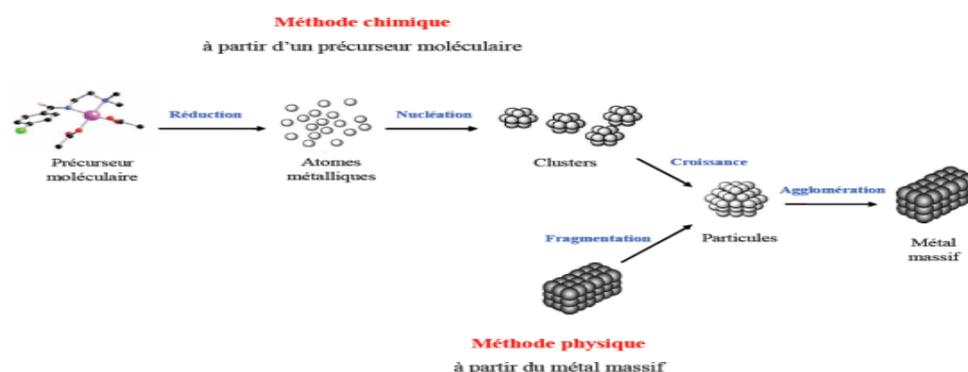
- **propriété thermique**

Il est bien connu que les métaux NPS ont des conductivités thermiques supérieures à celles des fluides sous forme solide..( **I. Khan et al.,2017**) Par exemple, la conductivité thermique du cuivre à température ambiante est d'environ 700 fois supérieure à celle de l'eau et environ 3000 fois

supérieure à celle de l'huile moteur.

### 2.1.6- Méthode de synthèse de nanoparticule

De nombreuses techniques différentes ont été développées pour élaborer des nanoparticules métalliques, il existe deux stratégies générales pour obtenir des matériaux à l'échelle nanométrique (**R. Shenhar et al., 2003**) L'une par voie physique et l'autre par voie chimique La voie physique dite descendante « top-down ». Technique de haut en bas souffre de la nécessité d'enlever de grandes quantités de matières, consiste à fragmenter l'or massif à l'aide des techniques physiques, citant par exemple, l'ablation laser (**J. Belloni ., et al 1998**) Et l'irradiation ionique(**D.T. Nguyen et al., 2011**). Qui permettent d'élaborer une large gamme de nanoparticule. La voie chimique d'association ascendante ou « Bottom-up » ou les atomes produits à partir de la réduction des ions sont assemblés pour produire des nanoparticules, il s'agit de réduire un précurseur d'or des techniques de chimie comme la réduction chimique, sono chimie, ou électrochimie. Parmi ces derniers, la réduction chimique est de loin la méthode la plus utilisée pour la synthèse des nanoparticules. Elle permet un meilleur contrôle de la taille et de la morphologie des nanoparticules (Figure02).



**Figure 02 :** Les deux principales voies de préparation des nanoparticules métalliques.(**a.bouzzar,2017**)

## 2.1.7- Applications des nanoparticules

**Tableau 01** : les différents domaines d'application des nanoparticules (Greena *et al.*, 2011)

Domaine	Exemple d'application
Automobile et aéronautique	matériaux plus légers et plus résistants, peintures anti-rayures, anticorrosion.
Chimie et matériaux	pigments, poudres céramiques, inhibiteurs de corrosion, vitres antisalissures, textiles, revêtements antibactériens.
Pharmacie, biomédical	<ul style="list-style-type: none"> <li>- médicaments et agents actifs</li> <li>- Des pansements dits « argentiques » contiennent des nanoparticules d'argent colloïdales, adsorbées sur leur surface</li> <li>- les crèmes, leurs applications et retraits quotidiens sont moins douloureux pour le patient.</li> <li>- Des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux ont été fabriqués à partir de polymères imprégnés d'argent sous forme métallique ou oxydée.....etc.</li> <li>- Des masques chirurgicaux contenant des nanoparticules d'argent.</li> </ul>
Cosmétiques	-Crèmes solaires, pâtes dentifrice (abrasif) maquillage (meilleure tenue)
Environnement et énergie	-filtration eau de mer, analyseurs chimiques, pesticides et fertilisants plus efficaces - Cellules photovoltaïques, batteries, fenêtres.
Défense	-détecteurs d'agents chimiques, systèmes de surveillance miniaturisés, système de guidage, textiles auto-réparateurs

agro-alimentaire et le traitement de l'eau	<ul style="list-style-type: none"><li>- matériaux de contact ou d'enrobage, additifs, auxiliaires de production ,biodétecteurs</li><li>- Des équipements en argent sont utilisés pour la manipulation d'huiles essentielles, de sirops et de jus de fruits</li><li>- Des boites plastiques pour le stockage de denrées alimentaires - des systèmes de filtration de l'air.</li></ul>
Autres applications : hygiène et désinfection	<ul style="list-style-type: none"><li>- Vêtements et textiles : Fibres et fils, Chaussettes, tenue de sport, baskets, Serviettes de toilette, sac de couchage, matelas .</li><li>- Hygiène des personnes : Produits cosmétiques Spray pour chaussures, Sièges des toilettes publiques .</li><li>- Technologies : Ordinateurs, Combines téléphoniques, calculatrice, clavier d'ordinateurs.</li><li>- Désinfection des Surfaces Peintures murales, revêtements de sol, Revêtement de surfaces d'acier inoxydable pour équipements médicaux.</li></ul>

### 2.1.8- Toxicité des nanoparticules

Le mécanisme exact de la toxicité des NP pour diverses bactéries n'est pas entièrement compris. (I. Khan *et al.*,2017).Le NP est capable de se fixer aux membranes bactériennes et de perturber l'intégrité des membranes bactériennes par des interactions électrostatiques. La nano toxicité est souvent causée par le stress causé par la formation de radicaux libres Libre, c'est-à-dire ROS, après administration de PN Parmi les différents mécanismes considérés pour comprendre la toxicité spécifique des nanoparticules, une publication récente a principalement décrit deux grands types de mécanismes à l'origine des effets toxicologiques des nanomatériaux :

**-Induction d'un stress oxydant**

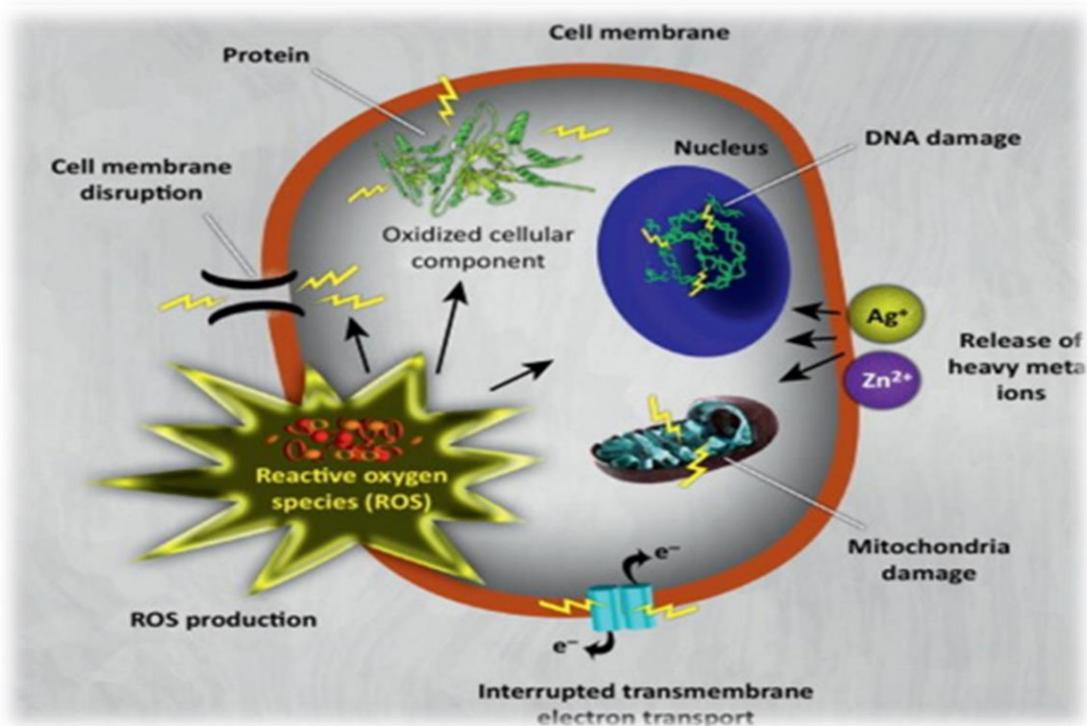
Les nanomatériaux métalliques peuvent générer de grandes quantités de formes réactives de l'oxygène (également appelées radicaux libres) sur leurs surfaces et/ou induire une surproduction cellulaire d'oxygène. Ces molécules sont une grande cellule. Ces molécules sont grosses et peuvent induire des réponses inflammatoires et même une fibrose. Ils peuvent également endommager l'ADN des cellules et participer au processus cancéreux.

**-Adsorption à leur surface de molécules biologiquement actives**

En raison de leurs propriétés de surface particulières, les nanomatériaux peuvent adsorber des molécules ayant des fonctions biologiques, telles que des facteurs nécessaires à la croissance cellulaire, provoquant des douleurs et parfois la mort cellulaire, qu'elles soient ou non internalisées dans les cellules (G, O *et al.*, 2010).

### 2.1.9- Mécanisme d'action des nanoparticules

Dans des études évaluant le mécanisme d'action des nanoparticules, on dirait que ce sera des perturbations membranaires, qui seraient à l'origine de la toxicité. En effet, il a été montré les nanoparticules d'Ag adhèrent à la paroi, ce qui conduira à la formation de pores et perméabilise la membrane, entraînant l'expulsion du cytosol bactérien. (Angélique, 2008) de Selon les auteurs, même le carboxy fullerène et les dérivés cationiques des fullerènes sera intégré dans le mur, ce qui peut entraîner une instabilité de la membrane, donc fonctions cellulaires, telles qu'elles sont présentes dans la chaîne respiratoire illustrée membrane. (Figure03) Cette hypothèse a été récemment décrite dans une composition lipidique des membranes en présence de fullerènes, ce qui démontre instabilité et/ou adaptation bactérienne. (Angélique, 2008)



**Figure 03 :** Mécanisme d'action des nanoparticules contre les bactéries

(Hajipour *et al.*, 2012)

De plus, la génétique des bactéries cibles varie considérablement, de sorte que leur structure de paroi cellulaire, leurs voies métaboliques fondamentales et de nombreux composants, lorsqu'ils sont perturbés, peuvent entraîner la mort microbienne. De plus, l'état physiologique des bactéries, c'est-à-dire la forme planctonique, le biofilm, le taux de croissance, peut grandement contribuer à la sensibilité bactérienne aux NP. (**huh et al., 2011**)

Dans certains cas, la relation entre les bactéries et les NP est critique pour la virulence de ces dernières. De plus, de nombreux facteurs environnementaux entrent en jeu et influencent la létalité des NP contre les bactéries, notamment le pH et la température. Les propriétés physicochimiques des particules, y compris leur taille, leur forme et leur mélange avec d'autres nanoparticules et le solvant utilisé dans différents rapports, affectent grandement leur activité antimicrobienne( **Gatoo et al., 2014**).



### 2.2.1- Définition d'argent

L'argent est un élément de métal de transition naturel (Keerawell et Chamara, 2019). Il est utilisé depuis l'Antiquité comme agent antifongique et antiviral car il est très toxique pour les micro-organismes, mais il est moins toxique pour l'homme (Li *et al.*, 2011), avec une masse atomique de 107,87 g/mol, solide à température ambiante. Densité 10,5, point de fusion 960 Celsius. Il est moins oxydé, ductile et malléable, et est un bon conducteur thermique et électrique (Chauveau, 2018). Parmi diverses nanoparticules métalliques, des nanoparticules d'argent (AgNPs) sont l'un des nanomatériaux les plus importants et les plus fascinant (Nasrollahzadeh *et al.*, 2019). Composé de 80% d'atomes d'argent et de 20% d'ions argent. Face aux nanotubes de carbone et aux nanoparticules de titane, ils sont Les nanoparticules les plus vendues rejetées dans l'environnement (Andrieux, 2012)

### 2.2.2-Propriétés d'argent

**Tableau 02 :** Propriétés chimique et physique d'argent (1)

Argent	
Poudre d'argent 	
Apparence	Poudre blanche Argentré
Propriété chimique	<b>Formule brute :</b> AgNo3 <b>Masse molaire :</b> 107,8682±0,0002g/mol
Propriété physique	<b>Point de Fusion :</b> 961 C° <b>Point d'ébullition :</b> 2162 C° <b>Solubilité :</b> insoluble dans l'eau <b>Masse volumique :</b> (à 20c°) 10.5g/cm <sup>3</sup>

### 2.2.3-Activité biologique de nanoparticule d'argent

- **Activité antibactérienne de nanoparticule d'argent**

Les Ag-NP se sont avérés des fongicides efficaces contre un large spectre de bactéries, y compris les bactéries Gram-négatives et Gram-positives, notamment *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* et *Bacillus subtilis* *Bacillus*. (Zhang *et al.*, 2016). Le rapport surface/volume élevé des AgNPs augmente leur contact avec les micro-organismes et favorise la dissolution des ions argent, renforçant ainsi l'effet bactéricide (Keywan *et al.*, 2019).

L'activité bactéricide des AgNPs dépend de plusieurs propriétés morphologiques et physicochimiques (telles que la taille, la forme et la surface) Les AgNPs de plus petite taille sont plus susceptibles de traverser la membrane cellulaire et d'entrer dans la cellule, empêchant la croissance bactérienne La concentration d'AgNPs varie avec chaque type de bactérie. (Carolna *et al.*, 2014).

- **Activité antifongique de nanoparticule d'argent**

Les AgNPs ont une puissante activité antifongique contre *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida cruzi* et *Trichophyton mentagrophytes* en inhibant la germination des conidies (Li *et al.*, 2011) *Bipolaris sorokiniana* (Zhang *et al.*, 2016).

Par exemple, l'activité antifongique des AgNPs contre *C. albicans* peut être exercée en perturbant la structure de la membrane cellulaire et en inhibant le processus de bourgeonnement normal en raison de la perturbation de l'intégrité de la membrane. (Tran *et al.*, 2013).

### 2.2.4- La toxicité de nanoparticule d'argent

Cette toxicité est déterminée par de nombreux facteurs, notamment la taille des particules, le type de matériau de revêtement et la structure morphologique. De nombreux rapports ont démontré que la cytotoxicité des AgNPs dépend de la taille ( Zhang *et al.*, 2018).

- **Toxicité sur la santé**

L'argent sous forme de nanoparticules peut pénétrer dans le corps humain par différentes voies. Suite à l'ingestion ou au contact cutané en présence de lésions cutanées, des nanoparticules métalliques peuvent se retrouver dans la circulation sanguine et/ou lymphatique et s'accumuler dans les organes, entraînant une perte d'identité cellulaire, une diminution de la capacité proliférative et de la structure des organites et des noyaux (Saulou.,Berion , 2009). Le danger des nanoparticules provient principalement de leur forme et de leur taille, car elles sont

facilement inhalées et interagissent avec les systèmes respiratoire et cardiovasculaire **(Saulou.,Berion, 2009)**. L'un des effets négatifs de l'argent ionique sur l'homme est l'argyrie (ou argyrosis, du grec « argyros », signifiant argent), qui correspond à la couleur bleu-gris de la peau (visage, bras, mains, base des cheveux). follicules, ongles), yeux et muqueuses .

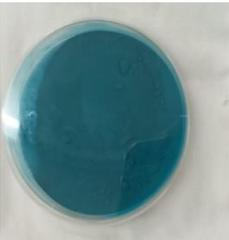


### 2.3.1 Définition du cuivre

Le cuivre est un oligo-élément présent dans l'organisme à faible concentration (apport quotidien de 1,5 à 3 mg/kg/jour) et ne peut survivre sans lui. Le cuivre est nécessaire au bon fonctionnement de certaines enzymes. Il est essentiel de stimuler le système immunitaire pour combattre l'infection et maintenir l'homéostasie (Ren *et al.*, 2009). Cependant, le cuivre n'est pas un élément essentiel pour les bactéries. Il est bon pour les organismes supérieurs (animaux), pas pour les organismes inférieurs (virus et bactéries). Par conséquent, sa présence à l'intérieur de la cellule est considérée comme étrangère. connu pour être toxique pour les micro-organismes (Ruparelia, *et al.* , 2008).

### 2.3.2- Propriétés du cuivre

Tableau 03 : Propriétés physique et chimique de cuivre (2)

Cuivre	
Poudre de cuivre	
	
Apparence	Vert
Propriété chimique	<b>Formule brute : Cu<sub>2</sub>O</b>
Propriétés physique	<b>Masse molaire : 63,546 g/mol</b> <b>Point de fusion : 1084,62 C°</b> <b>Point d'ébullition : 2542 C°</b>

### 2.3.3- l'activité biologique de nanoparticule de cuivre

- **L'activité antibactérienne de cuivre**

L'activité bactéricide du Cu dépend du degré d'agglomération. En minimisant l'agglomération, on obtient des nanoparticules de plus petite taille qui offrent une plus grande surface disponible

pour la dissolution des ions cuivre et l'interaction avec les membranes bactériennes, entraînant une plus grande toxicité. Le cuivre sous forme métallique et ionique génère des radicaux hydroxyles qui endommagent les protéines essentielles et l'ADN (**Fernaldo., et al., 2018**).

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,

- **L'activité antifongique de cuivre**

L'effet fongicide du cuivre a été évalué sur différents types de champignons microscopiques comme la levure *Candida albicans*. elle est le principal champignon d'infections nosocomiales (2,3 % des IN en milieu hospitalier) (**Raisin, 2013**). Et sont en particulier, des infections des muqueuses et parfois des pneumonies sont impliquées. L'étude de (**Mehtar et al. 2008**) ont comparé la surface de cuivre à la survie de différents types de bactéries mais dépend aussi de la survie des bactéries. *Candida albicans* : la charge indiquée est de 10<sup>7</sup> cellules fongiques complètes éliminées en 60 minutes sur les surfaces en cuivre pur lors de l'inoculation "humide" Incuber à température et humidité ambiantes.

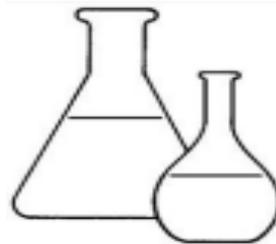
### 2.3.4- Toxicités de nanoparticules de cuivre

La toxicité des NP de cuivre (Cu) a été évaluée dans de nombreux modèles cellulaires et par diverses méthodes (**Karlsson et al., 2009**), (**Midanderet et al., 2009**).

De nombreuses études tentant d'établir une relation dose/réponse ont révélé l'importance de la taille et/ou de la surface des NP. En fait, la nanotaille est clairement un facteur important dans la toxicité des nanoparticules à base de cuivre. Par conséquent, le taux de mortalité cellulaire induit par les nanoparticules est bien supérieur à celui des particules de taille micronique ayant les mêmes propriétés. Les dommages intracellulaires causés par les deux NP étaient également plus prononcés (**Midander et al., 2009**).

De plus, il a été démontré que les NP CuO génèrent de fortes concentrations d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et altèrent les enzymes antioxydantes (catalase, glutathion peroxydase) (**Fahmy et Cormier, 2009**). Les nanoparticules d'oxyde métallique (CuO) pénètrent dans les cellules et sont absorbées par les lysosomes. L'environnement acide des lysosomes conduit à la dégradation des NP CuO en ions cuivre. Les ions cuivre catalysent la formation d'hydroxydes qui attaquent l'ADN très près du noyau (**Fahmy et Cormier, 2009**).

### 3- Matériel et Méthode



## Matériel et méthodes

Le présent travail, porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certaines nanoparticules en l'occurrence : l'argent et le cuivre dans un but de valorisation de leurs effets inhibiteur face à des agents bactériens et fongiques pathogènes pour l'Homme. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie, Université les Frères Mentouri Constantine1.

### 3.1- Origine des souches microbiennes

Les souches bactériennes et fongiques utilisées ont été fournies respectivement, par les laboratoires de Bactériologie et de Mycologie/Parasitologie du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Benbadis de Constantine (**Tableau 4**).

**Tableau 04** Souches bactériennes et fongiques utilisées

Souches bactériennes	Origine	Souches fongiques	Origine
<i>Escherichia coli</i>	<b>Urine</b>	<i>Candida albicans</i>	<b>Pus buccal</b>
<i>Klebsiella sp.</i>	<b>Cracha</b>	<i>Microsporium canis</i>	<b>Cheveux</b>
<i>Streptocoque coagulase négative</i>	<b>Sang</b>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<b>Ongles</b>
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>Cracha</b>		

### 3.2- Etude bactériologique

Cette partie s'intéresse à l'étude des souches bactériennes citées ci-dessus. Elle porte sur la caractérisation macroscopique, microscopique et biochimique des bactéries en question, ainsi que l'évaluation de l'activité biologique des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre face à ces bactéries. Les souches bactériennes choisies ont un caractère pathogène pour l'Homme et sont très répandues dans les infections bactériennes humaines.

#### 3.2.1- Etude macroscopique

L'aspect macroscopique est observé directement sur la gélose après incubation, il permet de connaître la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies. Pour ce faire, un repiquage par la méthode de stries a été effectué sur des boîtes de Pétri contenant de la gélose nutritive.

#### 3.2.2- Etude microscopique

- **Examen à l'état frais**

Cet examen permet d'observer des bactéries vivantes et de déterminer leur morphologie et leur éventuelle mobilité.

La méthode consiste à déposer une goutte d'eau physiologie stérile sur une lame propre en suite, apporter et dissocier dans la goutte un prélèvement bactérien de la colonie à observer puis recouvrir la lame par une lamelle tout en évitant la formation de bulles d'air. L'observation se fait au microscope optique à l'objectif (40X) (**Singleton, 2005**).

- **Coloration de Gram**

La coloration de Gram est un aspect important et essentiel permettant de différencier les bactéries. Un frottis est préparé à partir d'une colonie âgée de 24h, et est fixé à la chaleur ensuite, recouvert par le violet de Gentiane(annexe03) pendant 1min avec rinçage, puis mordantage au Lugol( annexe03) pendant 1 minute suivi d'un rinçage. Une décoloration est ensuite faite par l'alcool pendant 30 secondes suivie par un autre rinçage .Recoloration avec Fushine(annexe03) pendant 1 min et rinçage . La préparation est observée au grossissement X100 en utilisant une goutte d'huile de vaseline .(**Salmi et al .,2019**)

### **3.2.3 – Etude des caractères biochimiques**

#### **3.2.3.1- Tests biochimiques classiques**

- ❖ **Test catalase**

La catalase est une enzyme produite en abondance par les bactéries ayant un métabolisme respiratoire qui détruit le peroxyde d'hydrogène et libère de l'oxygène (**Vezina et lacroix,2000**).La technique consiste à prélever une partie de la colonie et à l'émulsionner dans un tube qui contient une solution d'eau oxygénée. Le dégagement des bulles de gaz signifie qu'il y'a production de la catalase (**Prescott et al , 2003**).

- ❖ **Test d'oxydase**

Le teste d'oxydase est basé sur une éventuelle production bactérienne d'une enzyme oxydase intercellulaire en présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C(**Vezina et lacroix,2000**).Pour déterminer l'activité de l'oxydase, la colonie récoltée est placées sur le réactif de l'oxydase. L'apparition d'une couleur violette signifie que le test est positif et que l'isolat bactérien possède l'enzyme l'oxydase.

### ❖ Recherche de nitrate réductase

La production de nitrite peut être mise en évidence en recherchant la nitrate réductase dans le bouillon nitrifiant par le réactif de Griess (annexe02). La technique consiste à cultiver les souches bactériennes testées dans des tubes contenant du bouillon nitrate et les incubent à 28°C pendant 48h à 72h. La vérification du milieu de culture se fait après incubation pour voir si le nitrate est réduit en nitrite. Pour révéler la présence de nitrite, 0,5 ml de réactif de Griess 1 et 0,5 ml de réactif 2 sont ajoutés aux cultures bactériennes. Ces réactifs se combinent avec tous les nitrites présents pour former des colorants rouges azoïques facilement solubles. L'absence de couleur rouge peut signifier soit : (a) que les nitrates ne sont pas réduits, ou (b) ce nitrite est formé mais ensuite réduit, par exemple en azote et en ammoniac. Pour distinguer entre ces deux possibilités, le milieu est testé pour la présence de nitrate et cela en ajoutant une trace de poudre de zinc qui réduit le nitrate en nitrite. S'il y a du nitrate (c'est-à-dire, s'il n'a pas été réduit par la souche testée), l'addition de zinc fera apparaître une coloration rouge car le nitrite nouvellement formé se combinera avec les réactifs du milieu (Singleton, 2005).

### ❖ Test d'utilisation des sucres (Glucose et lactose) sur milieu K.I.A

Ce test nous indique si les bactéries ont la capacité d'utiliser le glucose et le lactose. La gélose de Kligler Iron Agar ou KIA est un tube de gélose additionné de fer et séché sur une pente. À l'aide d'un anneau de platine, toucher délicatement le centre de la colonie à identifier, ensuite, ensemercer le fond du tube (bas) en perforant la gélose verticalement, puis ensemercer la pente en manipulant les rayures en zigzag. Incuber pendant 24 à 72 heures (Guiraud, 1998).

### ❖ Détermination de la voie d'attaque des glucides

Cette technique est révélée sur milieu MEVAG contenant un indicateur de pH afin d'étudier l'assimilation de divers glucides et de connaître également la voie d'attaque des sucres (voie oxydative ou fermentaire) (Guiraud, 1998).

La méthode consiste à ensemercer deux tubes dont l'un recouvert d'une couche d'huile de paraffine, par une piqure central avec un fil de platine chargé de semence prélevé d'une culture de 18 à 24 heures. Après incubation trois catégories de bactéries sont distinguées : les bactéries fermentatives, qui donnent une acidification rapide et égale dans les deux milieux qui deviennent jaunes en 24h sur toute la hauteur de la piqure d'inoculation. Dans le cas où il y a production de gaz, celui-ci est visible sous la couche d'huile. Les bactéries oxydatives, qui

rèvelent dans le tube fermé peu ou pas de culture, et pas d'acidification (après plusieurs jours, même en l'absence de culture visible, la couleur du milieu peut virer vers des teintes orangées si l'huile utilisée est acide, quant au tube ouvert il y a acidification modérée et assez lente, débutant à la surface, en 24-48 heures ou parfois d'avantage, jamais de gaz. Enfin pour les bactéries inactives il y a peu ou pas de culture dans le tube fermé, quant au tube ouvert, il y a culture sans modification du pH (pas d'acidification) ou avec une alcalinisation plus ou moins forte en surface (virage au rouge violet) (Singleton, 2005).

### **3.2.3.2-Galerie Api 20 E**

#### **✓ Principe**

Le système API est une version miniaturisée et standardisée de la technologie biochimique servant à aboutir à l'identification d'isolats bactériens.

Des densités appropriées sont réparties entre les différentes cellules qui composent les différents 20 tests biochimiques et qui contiennent des substrats déshydratés. L'incubation entraîne un changement de couleur spontanément ou en ajoutant certains réactifs (Figure 05). Cette galerie permet d'identifier une centaine de bacilles à Gram négatif, dont la famille des *Enterobacteriaceae*. Dans le présent travail, les bactéries qui ont été identifiées par la galerie AP 20<sup>E</sup> sont *E. coli* et *Klebsiella sp.* quant à *Streptocoque coagulase négative* et *Streptococcus pneumoniae* n'ont pas subi une identification par galerie biochimique en raison de la non disponibilité de ces dernières.

#### **✓ Préparation de la galerie**

La méthode consiste à réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée stérile dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide. Ensuite, inscrire la référence de la souche sur la languette latérale de la boîte. Puis sortir la galerie de son emballage et déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation (Bio Mérieux SA) (Debabza, 2014).

#### **✓ Inoculation de la galerie par la suspension bactérienne**

L'inoculation de chaque tube de la galerie (Figure 4) est faite par des suspensions bactériennes standardisées afin d'assurer une interprétation correcte du résultat obtenu. Pour ce faire, la préparation des suspensions bactériennes ont été faites de la manière suivante :

À partir d'une culture jeune de 24 heures, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine stérile et introduites dans un tube contenant de l'eau physiologique stérile à

0.9%. La suspension bactérienne ainsi obtenue, est bien homo générisée et est ajustée, à l'aide d'un spectrophotomètre, 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 des galeries doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum bactérien. L'incubation est réalisée à 36°C pendant 24 heures. Les résultats sont reportés sur les fiches des résultats appropriées, et interprétés par l'application d'Api Web.

- ✓ Pour les caractères soulignés ADH, LDC, ODC, H2S, URE, ensemencer le tubule par la suspension et la cupule par l'huile de vaseline stérile.
- ✓ Pour les caractères encadrés VP, CIT, Gel, ensemencer le tubule et la cupule par la suspension.
- ✓ Pour les caractères non encadrés, non soulignés ensemencer uniquement le tubule par la suspension.



**Figure 04** : Présentation de la galerie API 20<sup>E</sup> avant inoculation

### 3.2.4 - Etude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre

Le test de l'activité antibactérienne des souches vis-à-vis du nitrate d'argent et d'acétate de cuivre consiste à rechercher la sensibilité des nanoparticules sur les souches bactériennes en question. Ce test est réalisé par la méthode de diffusion sur gélose. Pour ce faire, différentes étapes ont été suivies à savoir : la préparation des solutions des nanoparticules, la préparation de l'inoculum bactérien, et enfin le test d'activité biologique vis-à-vis des bactéries pathogènes.

- **Préparation des solution Ag- Cu**

Pour préparer ces solutions on a besoin de connaître la masse molaire de l'acétate de cuivre qui est égale à 199,65g/mole et la masse molaire du cuivre qui est égale à 63,45g/ mol. Le test de l'activité antibactérienne se fait avec une concentration de 150mg/l pour chaque solution, pour ce faire, on applique la règle de trois qui consiste à multiplier 150 mg par la masse molaire de

l'acétate de cuivre (199,65 g/mol) et la diviser sur la masse molaire de cuivre 63,45g/mol. La même méthode est appliquée pour les nitrates d'argents.

Ensuite, dissoudre 0,47 g de la poudre d'acétate de cuivre et 0,23 g des nitrates d'argent dans 1litre d'eau distillée. Les solutions obtenues sont diluées avec le facteur 1/3 afin d'obtenir une concentration égale à 50 mg/l. (Debabza, 2014)

Par ailleurs, le mélange entre les 2 solutions a été aussi utilisé pour l'activité antibactérienne et ce, en ajoutant 1ml de l'acétate de cuivre [150mg/l] à 1ml de nitrate d'argent [150 mg/l](Figure 05).



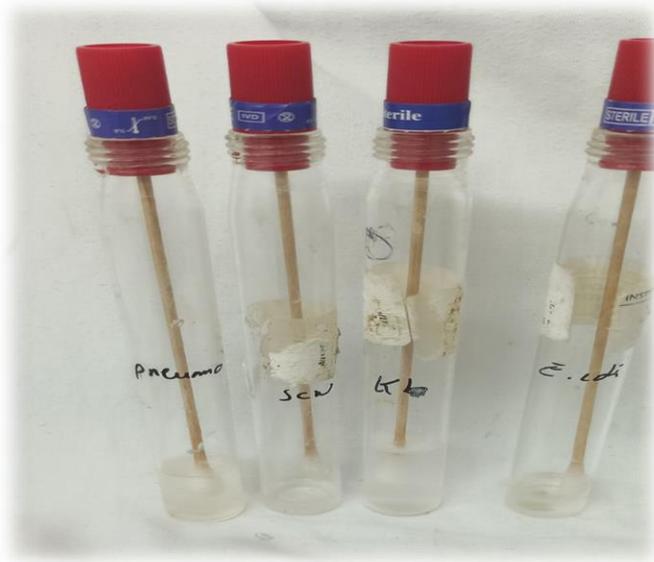
**Figure 05** : différentes solutions préparées avec les Nitrates d'argent et l'acétate de Cuivre.

- **Préparation de l'inoculum bactérien**

La préparation des solutions bactériennes servant aux tests antibactériens, sont faites de la même manière que celle décrite pour l'inoculation des galeries API 20<sup>E</sup>.

- **Test de diffusion sur gélose :**

Des écouvillons stériles trempés dans les suspensions bactériennes standardisées (Figure 06) ont servis à ensemercer uniformément toute la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu MH avec des stries bien serrées afin d'obtenir un tapis bactérien.

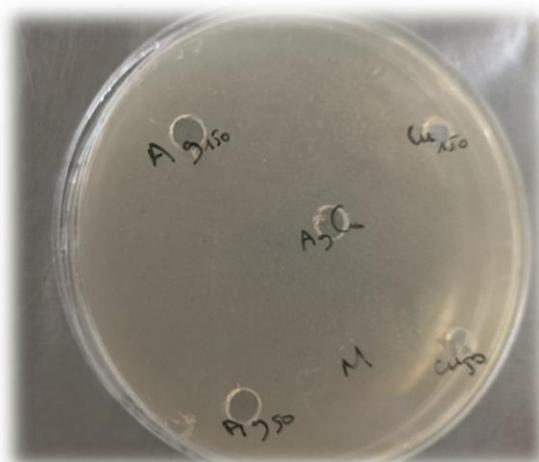


**Figure 06 :** Suspensions bactériennes standardisées préparées

Après 15 min de séchage, des puits ont été réalisés à l'aide d'une pipette Pasteur stérile (Figure 07). Ces puits perforés dans la gélose vont servir à accueillir les différentes solutions à tester, en l'occurrence : acétate de cuivre, nitrates d'argent et le mélange (Figure 08). Les préparations ainsi obtenues sont incubées à 37°C pendant 24 Heures (Singer *et al.*, 2012).



**Figure 07 :** Réalisation de puits à l'aide d'une pipette Pasteur (Ammari, 2011).



**Figure 08 :** Dépôt des différentes concentrations de nanoparticules sur gélose MH étalée par la suspension bactérienne et perforée avec des puits

### 3.2.5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est la plus petite concentration de la molécule à tester qui est capable d'inhiber une culture bactérienne visible après 18-24 heures d'incubation. Cette valeur caractérise l'effet bactériostatique de la molécule testée. Dans le présent travail, la détermination de la CMI a concerné uniquement le produit présentant un effet antibactérien remarquable. La méthode suivie est celle de dilution préconisée par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (**Singh et al., 2012**).

#### ❖ Technique :

La méthode consiste à la préparation de plusieurs solutions de différentes concentrations de nitrate d'argent qui commence avec 1mg/ml . Pour ce faire avec une concentration de 1mg/ml on applique la règle de trois :

$$\begin{array}{rcl}
 169,87\text{g/mol} & \text{—————} & 107,87\text{g/mol} \\
 X & \text{—————} & 1\text{mg/ml} \\
 & & \frac{169,87\text{g/mol} \times 1\text{mg}}{107,87} = 1,57\text{mg/ml}
 \end{array}$$

Ensuite, dissoudre 1,57mg de nitrate d'argent dans un 50ml de l'eau distillée la même méthode est appliquée pour les solutions restantes. (Figure 09)



**Figure 9** : les différentes concentrations de AgNO<sub>3</sub> préparées

Des boîtes de Pétri contenant la gélose MH sont ensemencées, à l'aide d'écouvillons stériles, par les différentes solutions bactériennes standardisées équivalentes à 0,5 Mc Farland.

Des disques de papier Whatman N°1 stériles sont imbibés par 50µl des différentes dilutions d'AgNO<sub>3</sub> préparées ci-dessus. Ces disques sont déposés soigneusement, à l'aide d'une pince stérile, sur la surface de la gélose ensemencée. Les préparations obtenues sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures (Singh *et al.*, 2012).

### 3.2.6 - Conservation des souches bactériennes

Les jeunes colonies bactériennes, sont aseptiquement transférées et ensemencées dans des tubes contenant de la Gélose Nutritive inclinée et cela en appliquant des stries tout au long de la gélose. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les tubes sont bien fermés et conservés au réfrigérateur à 4°C.

## 3.3- Etude fongique

Dans ce volet, l'activité biologique des Ag et Cu a été testée vis-à-vis de quelques souches fongiques en l'occurrence: deux dermatophytes (*Microsporium canis* et *Trichophyton rubrum*) et une levure (*Candida albicans*). Ces souches sont largement répandues dans les infections fongiques touchant l'Homme en particulier, les immunodéprimés.

### 3.3.1- Etude morphologique

L'identification est basée sur deux observations: l'observation macroscopique, qui permet de déterminer la couleur et la forme de la colonie, sur gélose Sabouraud, pendant le développement et à mesurer son diamètre, et l'observation microscopique qui détecte la présence du thalle, la présence ou l'absence du septum, la nature de la reproduction, la nature de la fructification et l'aspect des conidies (Botton *et al.*, 1990).

✓ **Coloration avec le bleu de méthylène**

Cette technique a été appliquée pour les souches filamenteuses. Pour ce faire, une goutte de bleu de méthylène (annexe 03) est déposée sur une lame propre, ensuite, un bout de mycélium est prélevé, délicatement, à partir d'une colonie âgée de 7 jours et est déposé sur la goutte de bleu de méthylène, la préparation est chauffée légèrement en passant la lame sur une flamme faible du bec Bunsen, sans laisser échapper totalement la solution. La préparation est recouverte avec une lamelle en évitant la formation de bulles d'air. L'observation est faite successivement aux différents grossissements du microscope (**Botton *et al.*, 1990**).

**3.3.2–Etude de l'activité antifongique des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre**

Ce test consiste à mettre en évidence l'action fongicide des Ag et Cu sur les souches fongiques pathogènes. La technique abordée est celle de diffusion sur gélose avec quelques différences notées entre le test anti *C. albicans* et anti-dermatophytes.

- **Test anti *C. albicans***

La méthode de diffusion sur milieu gélosé est réalisée sur milieu Sabouraud(annexe01), cette dernière est versée aseptiquement dans des boîtes de Pétri avec une épaisseur de 4 mm dans chaque boîte. Après solidification et à l'aide d'un écouvillon stérile, la surface du milieu de culture estensemencée par la suspension levurienne, préparée dans l'eau physiologique stérile, et qui porte une charge de l'ordre de 0,5 Mc Farland. Cette suspension levurienne est préparée à partir d'une culture fraîche de *C. albicans* âgée de 48 heures. Des disques de papier Whatman N°1 stériles sont imbibés par 50µl de nitrate d'argent et d'acétate de cuivre ainsi que leurs mélange (voir section préparation des solutions Ag et Cu ci-dessus). Ces disques sont déposés soigneusement, à l'aide d'une pince stérile, sur la surface de la géloseensemencée. Les préparations obtenues sont incubées à 37°C pendant 48 heures. Les zones d'inhibitions formées sont mesurées au millimètre près.

- **Test anti- dermatophytes**

Le test antifongique réalisé vis-à-vis de *Microsporum canis* et *Trichophyton rubrum* consiste à préparer d'abord une suspension sporale de ces moisissures. Pour ce faire, une culture de 6 jours de *Microsporum canis* et *Trichophyton rubrum* est effectuée dans des erlens contenant la gélose SAB est inondée par de l'eau physiologique stérile. Après une légère agitation, assurée par un barreau magnétique stérile, un volume de 0.1 ml de chaque solution sporale, ainsi obtenue, est étalé sur la surface de la gélose SAB(annexe1) pour effectuer le test de diffusion sur

gélose et ce de la même manière appliquée avec *C.albicans*. Le développement de l'activité antifongique se traduit par la formation d'une zone de lyse autour des champignons test. La lecture est effectuée après incubation des boîtes à 37°C jusqu'au développement apparent des éventuelles zones de lyses(Prescott *et al.*, 2010).

### **3.3.3- Conservation des souches fongiques**

Pour les champignons une fois purifiés, ils sont conservés dans des tubes à essais stériles inclinés contenant la gélose Sabouraud additionnée au chloramphénicol (Dévêt et Rouxel, 1997). Les tubes sont ensemencés par les colonies purifiées et sont laissés se développer pendant 48h pour *C. albicans* et 7 jours pour les dermatophytes puis, stockés au réfrigérateur à 4°C (Botton *et al.* , 1990).

## 4- Résultats et discussions

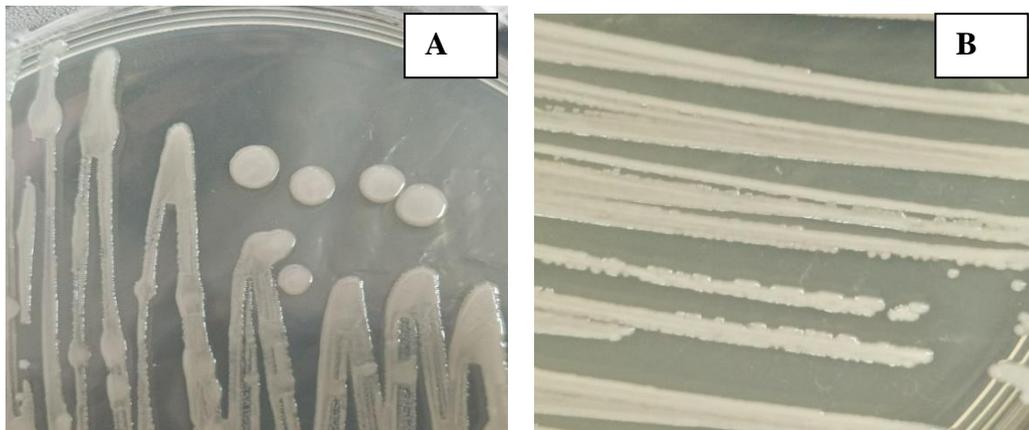


## 4- Résultats et discussion

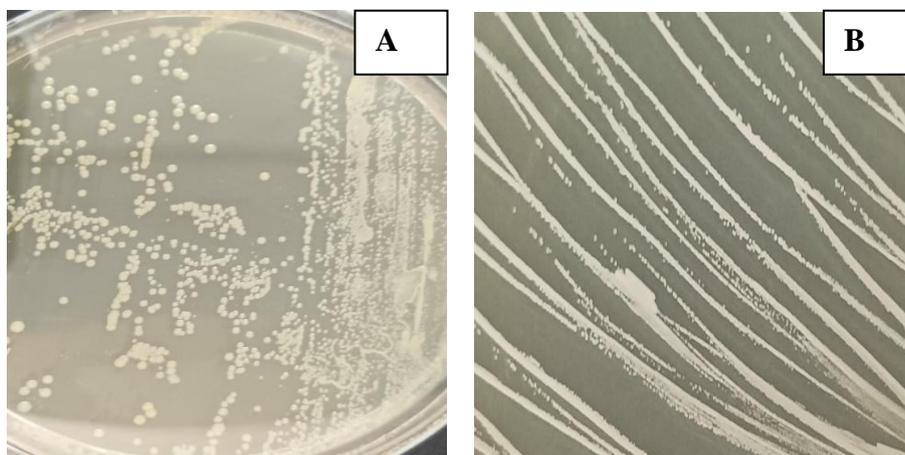
Le présent travail, porte sur l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certaines nanoparticules : l'argent et le cuivre dans un but de tester leurs effets inhibiteur face à des agents bactériens et fongiques pathogènes pour l'Homme. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Microbiologie, Université des Frères Mentouri Constantine1

### 4.1-Etude bactériologique

L'aspect macroscopique des souches bactériennes utilisées dans cette étude est représenté dans les figures ci-dessous. Le tableau 5 résume les différents caractères macroscopiques observés directement sur gélose.



**Figure 10** :Aspect macroscopique(A) d'*Escherichia coli* et(B) de *Klebsiella sp.*



**Figure 11:** Aspect macroscopique de (A) *Streptococcus pneumoniae* et (B) *Staphylococcus coagulase négative*

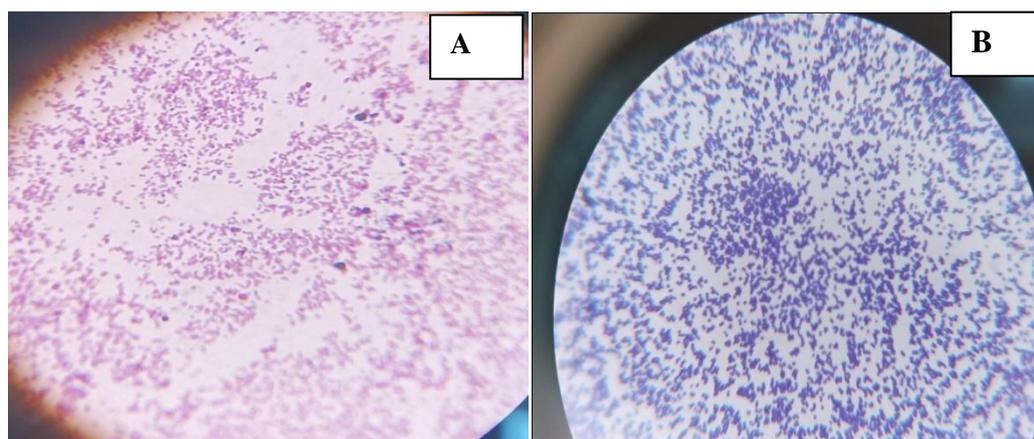
**Tableau 05 :** Caractères macroscopiques des colonies bactériennes sur gélose

Milieu de culture	Souche bactérienne	Temps d'incubation	Observation
G.N	<i>Escherichia coli</i>	24 h	colonies de taille moyenne crémeuse arrondies, lisses et à bords réguliers
	<i>Klebsiella sp.</i>	24 h	colonies de taille moyenne rondes bombées d'aspect muqueux
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	24 h	petites colonies jaune rondes bombées et crémeuse
	<i>Staphylococcus coagulase négatif</i>	24 h	colonies de taille moyenne lisse, rondes et bombées

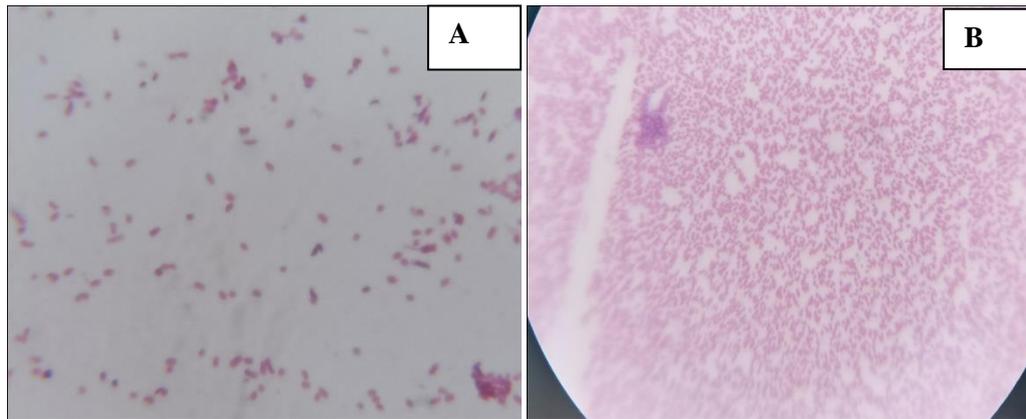
#### 4.1.2- Etude microscopique

- Coloration de Gram :

Après avoir effectué la coloration on a distingué 2 souches à Gram positif (figure 12) et 2 souches à Gram négatif (figure 13).



**Figure 12 :** Coloration de Gram positive (A) *Staphylococcus coagulase négative* et (B) *Streptococcus pneumoniae*



**Figure 13** : Coloration de Gram négative : (A) *Escherichia coli* et (B) *Klebsiella sp.*

Ces constatations à savoir macroscopiques et microscopiques correspondent à celle décrites par (Soufi ,F, et al.,2019) ,les bactéries à Gram négatif sont des bacilles immobiles, tandis que les bactérie à Gram positif sont des Cocci immobiles.

#### 4.1.3- Etude des caractères biochimiques

##### 4.1.3.1- Tests biochimiques classiques

- Test de catalase

Le test catalase a montré que les quatre souches bactériennes sont capables de produire cette enzyme « catalase positive » puisque il y'a eu un dégagement de bulles d'oxygène dans les tubes (Figure 14).

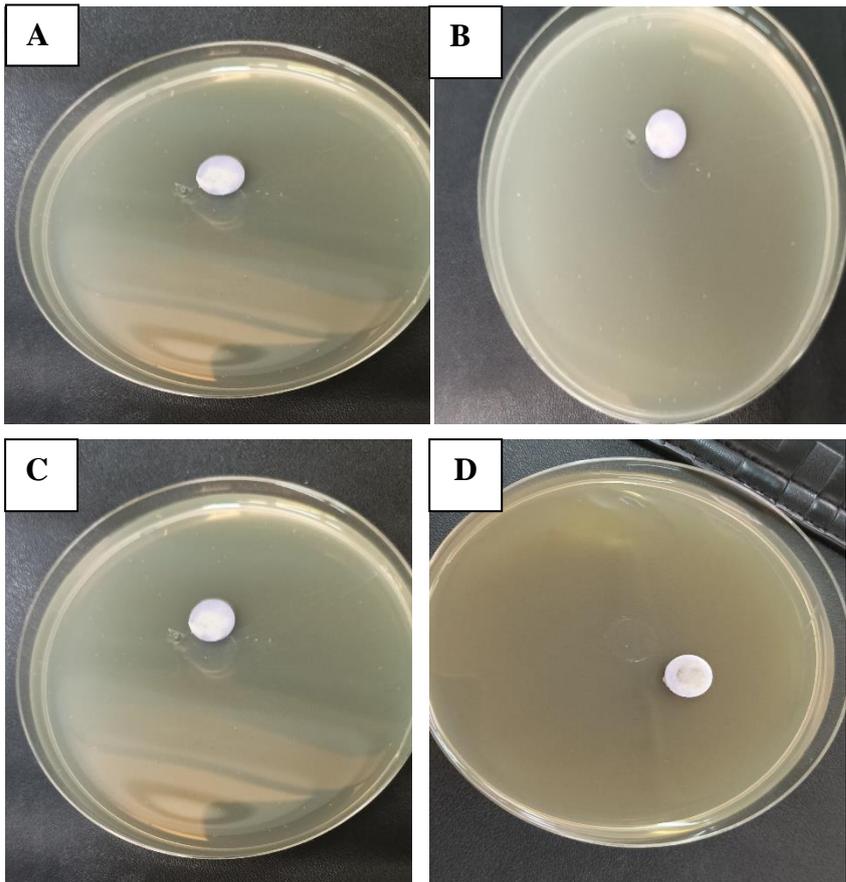


**Figure 14**: Test de catalase positive démontré par production de bulles par les souches bactériennes

Ces résultats corroborent ceux de (Fakoorziba et al. , 2010 ); (Brown et al., 2014) ;( Islam et al., 2016) et(Abdolmaleki et al., 2019)

- Test d'oxydase

Les résultats ont montré que les quatre souches bactériennes en question, ne possèdent pas l'enzyme oxydase car elles restent incolores une fois mises en contact avec le réactif d'oxydase (Brown *et al.*, 2014 ; Abdolmaleki *et al.*, 2019)(Figure 15).

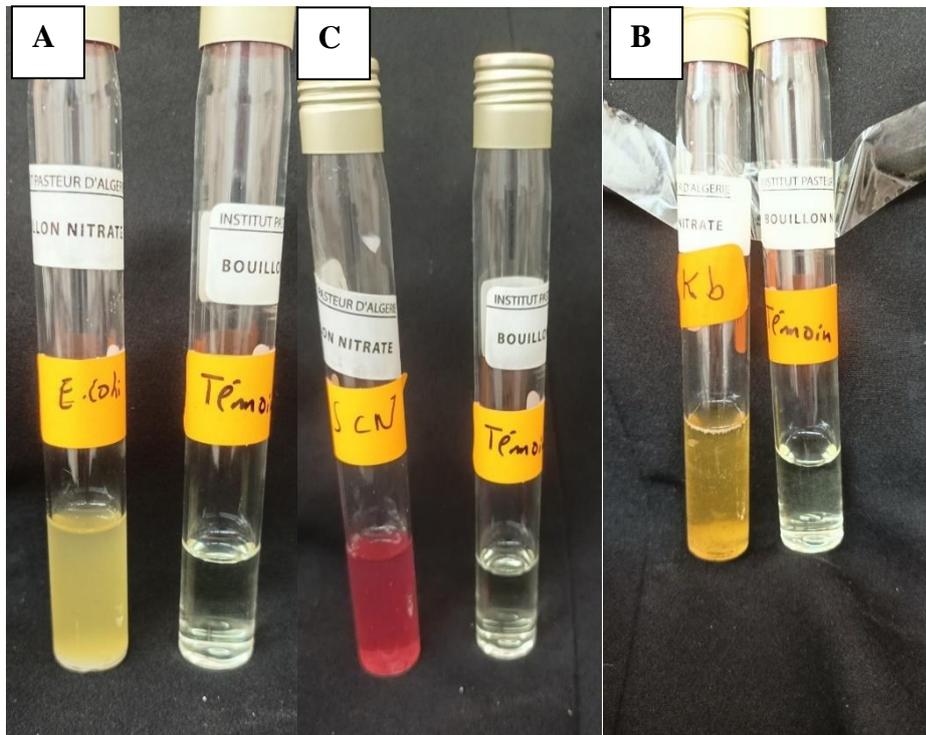


**Figure 15 :** Test d'oxydase négatif : (A) *Escherichia coli* ,  
(B) *Klebsiella sp.*, (C) *Staphylococcus coagulase négative*, (D) *Streptococcus pneumoniae* .

- Recherche de la nitrate réductase

Le test de la nitrate réductase révèle que toutes les souches bactériennes qu'on a étudié ne possèdent pas une nitrate réductase car après le dépôt des réactifs 1 et 2 de Griess , une couleur rouge n'est pas apparu, ce qui signifie l'absence d'ions nitrites combinés aux réactifs . Après avoir ajouté la poudre de zinc aux tubes contenant les souches qui n'ont pas développé une couleur rouge ,seule la bactérie *Streptococcus pneumoniae* développé la couleur

rouge(Figure17) ,par contre les bactéries *Escherichia coli* et *Klebsiella sp.* Gardé ont couleur jaune mais *Staphylococcus coagulase négative* il de couleur rose.(Figure 16)



**Figure16 :** Recherche de nitrate réductase, absence de couleur rouge après l’ajout de réactif de Griess et poudre de zinc par les bactéries (A) *Escherichia coli* , (B) *Klebsiella sp.* ,(C) *Staphylococcus coagulase négative*.



**Figure 17 :** Résultats de test NR positif après l’ajout de poudre de zinc par la bactérie *Streptococcus pneumoniae* .

Permet de déterminer la présence d'une enzyme réduisant les nitrates en nitrites.

Après culture sur un bouillon nitrate, la nitrate réductase est mise en évidence par la présence de nitrates dans le milieu et ce en rajoutant quelques gouttes du réactif A et du réactif B. (Acide parasulfanilique + naphtylamine = réactif de Griess). La réaction est une diazotation des nitrates en présence des réactifs. - La coloration rouge ou rose du milieu : réduction des nitrates en nitrites, - L'absence de cette couleur indique que le nitrate n'a pas été réduit ou que le nitrate a été entièrement réduit en d'autres composés comme l'azote et l'ammoniac. Pour résoudre cette alternative, la présence de nitrates dans le milieu est contrôlée par l'addition d'une trace de poudre de zinc. Comme le zinc réduit le nitrate en nitrite, la persistance de nitrate déterminera l'apparition d'une coloration rouge due à la combinaison du nitrate avec les réactifs du milieu (SINGLETON., 1984).

Plusieurs travaux se sont orientés vers le test recherche de la nitrate réductase d'*E coli* et *Klebsiella sp.* et *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus coagulase négative* dans le but de identifier ces isolat (ousaad *et al.*, 2017) ,

- **Test d'utilisation des sucres (Glucose et Lactose) sur milieu K.I.A**

Après incubation des cultures bactériennes sur gélose K.I.A, la lecture ne montre pas un virage de couleur de ce milieu ce qui signifie que le résultat est négatif, donc les bactéries en question n'utilise pas le Glucose et le Lactose (Figure 18).

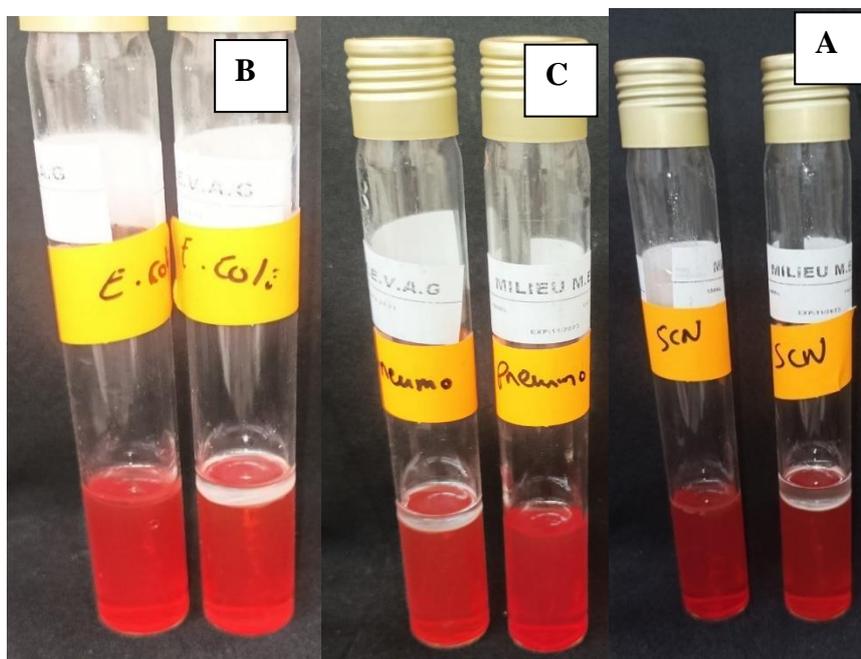


**Figure 18 :** Test d'utilisation du Glucose et Lactose sur milieu K.I.A : aucun virage de couleur n'a été observé par les quatre souches bactériennes.

Les mêmes constatations ont été faites par (Minor et Richard, 1993), ( Chabbi ., et al 2020).

- Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le test du métabolisme des glucides révèle que la souche *Klebsiella sp.* possède un métabolisme oxydatif (Figure18) se traduisant par une acidification à la surface du milieu ouvert provoquant son jaunissement( Figure 20). Par contre les souches *Staphylococcus coagulase négatif*, *Escherichia coli* et *Streptococcus pneumoniae* ont un métabolisme inactif(Figure19)car il y'a eu peu de culture dans le tube fermé, quant au tube ouvert, il y'a eu une culture sans modification du pH (pas d'acidification).(Joffin et leyrat, 1998)



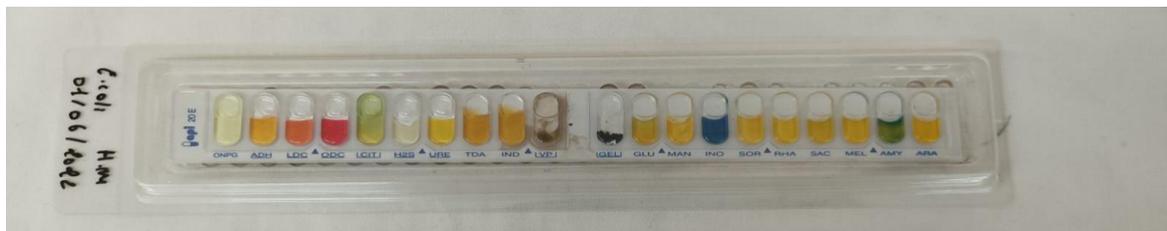
**Figure 19** : détermination de la voie d'attaque de glucides des souches (A) *Staphylococcus coagulase négatif*,(B) *Escherichia coli* et(C) *Streptococcus pneumoniae* possédant un métabolisme inactif.



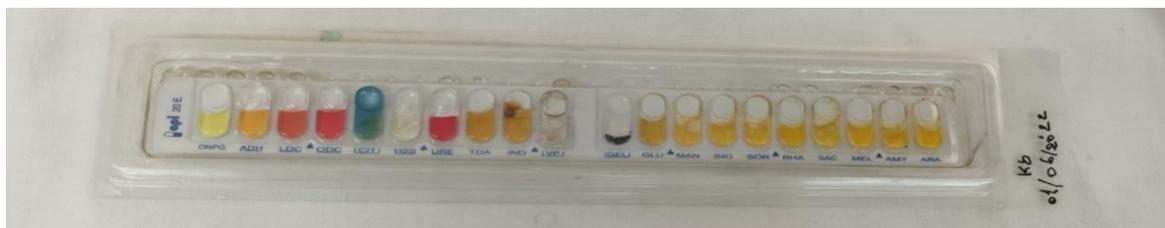
**Figure 20:** détermination de la voie d'attaque de glucides de la souche (D)*Klebsiella sp.* Possède un métabolisme oxydatif.

#### 4.1.3.2- galerie API 20E

Les résultats de galerie Api 20<sup>E</sup> obtenus après incubation, sont présentés sur les figures ci-dessous. Chaque résultat, a été interprété en faisant appel au site APIWEB afin de confirmer l'identité de chaque souche (Figure 23, 24).



**Figure 21:** résultat de la Galerie API 20<sup>E</sup> d'*Escherichia coli*



**Figure 22:** résultat de la Galerie API 20<sup>E</sup> de *Klebsiella sp.*

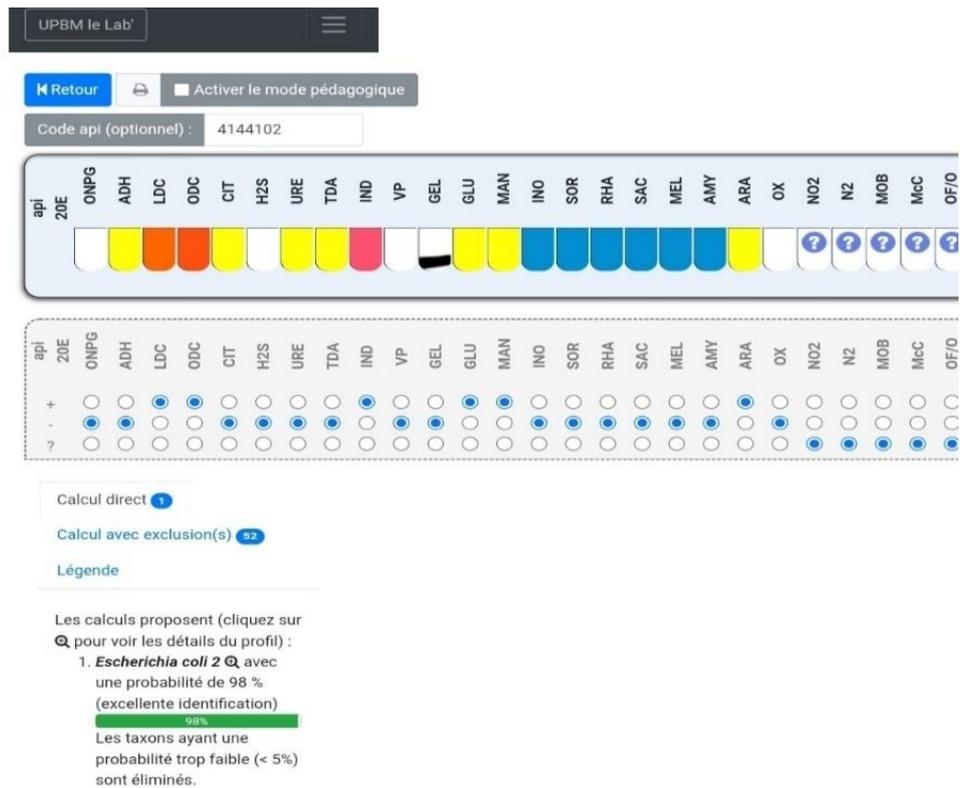


Figure 23 : résultat d'Api web d' *Escherichia coli*

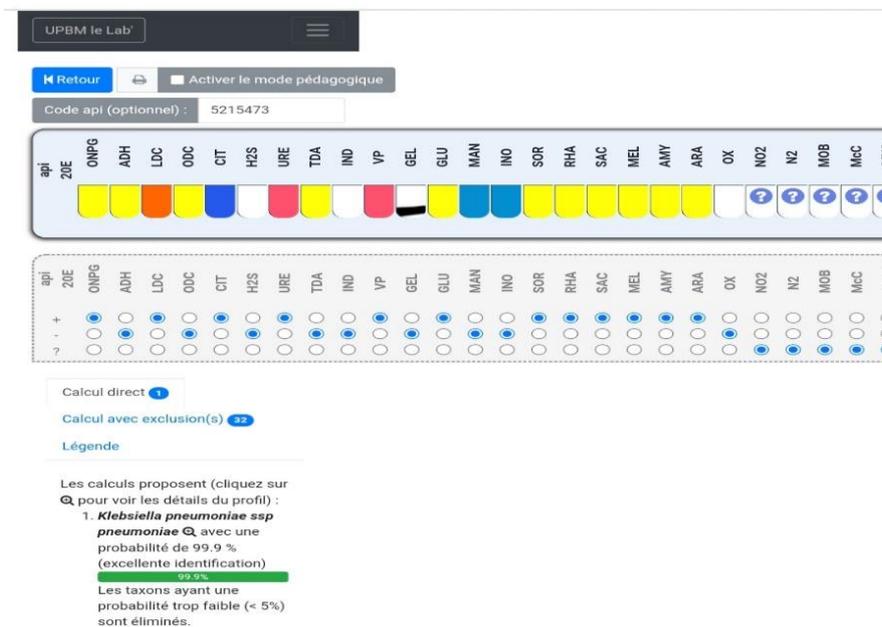
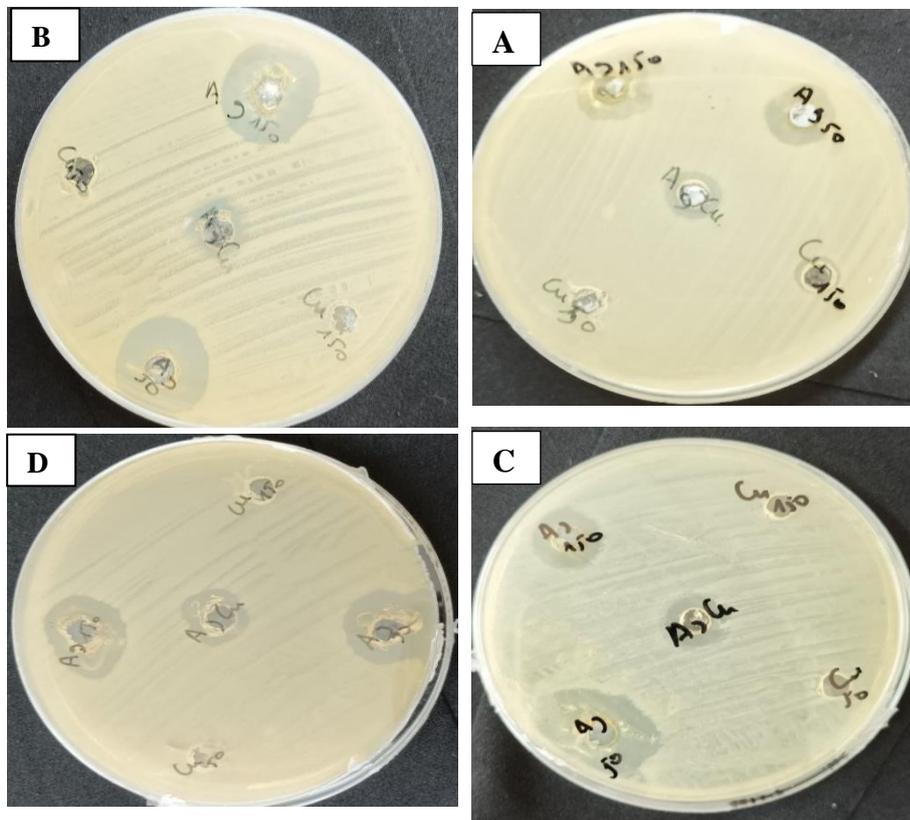


Figure 24 : résultat d'API web de *Klebsiella sp.*

#### 4.1.4-Etude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et d'acétate de cuivre

L'activité antibactérienne de ces deux nanoparticules ainsi que leurs mélange a montré une inhibition remarquable du développement des bactéries pathogènes surtout par les nitrates d'argent (Figure 25). Les diamètres des zones d'inhibitions obtenues ont été mesurés au millimètre près (Tableau 6).



**Figure 25 :** zones d'inhibitions obtenues après test de diffusion sur gélose des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre sur les bactéries pathogènes : (A) *Klebsiella sp.* ; (B) *Escherichia coli* ; (C) *Staphylococcus coagulase négatif* ; (D) *Streptococcus pneumoniae*.

**Tableau 06 :** récapitulatif des résultats de l'activité antibactérienne de l'AgNO<sub>3</sub>, du Cu<sub>2</sub>O et de leur mélange.

Nanoparticules	Acétate de cuivre		Nitrate d'argent		Le mélange
Souches	150mg/L	50mg/L	150mg/L	50mg/L	2ml
<i>Klebsiella sp.</i>	<b>0 mm</b>	<b>0mm</b>	<b>20mm</b>	<b>19 mm</b>	<b>17mm</b>
Diamètre					
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>0mm</b>	<b>0mm</b>	<b>14 mm</b>	<b>13 mm</b>	<b>10 mm</b>
Diamètre					
<i>Staphylococcus coagulase négatif</i>	<b>0mm</b>	<b>0mm</b>	<b>22 mm</b>	<b>17 mm</b>	<b>10mm</b>
Diamètre					
<i>Escherichia coli</i>	<b>0mm</b>	<b>0mm</b>	<b>20 mm</b>	<b>18 mm</b>	<b>13 mm</b>
Diamètre					

Ces résultats mettent en évidence qu'il n'y a pas eu de zone d'inhibition autour du puits contenant l'acétate de cuivre et ce, pour toutes les souches testées. Ceci indique que les souches étudiées sont résistantes à l'acétate de cuivre avec ses différentes concentrations à savoir 150 et 50 mg/l. Au contraire, **Fernando et ses collaborateurs, (2018)** ont montré que le cuivre a un effet antibactérien vis-à-vis de *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, entérocoque résistant, staphylocoque doré résistant à la Vancomycine et à la méticilline

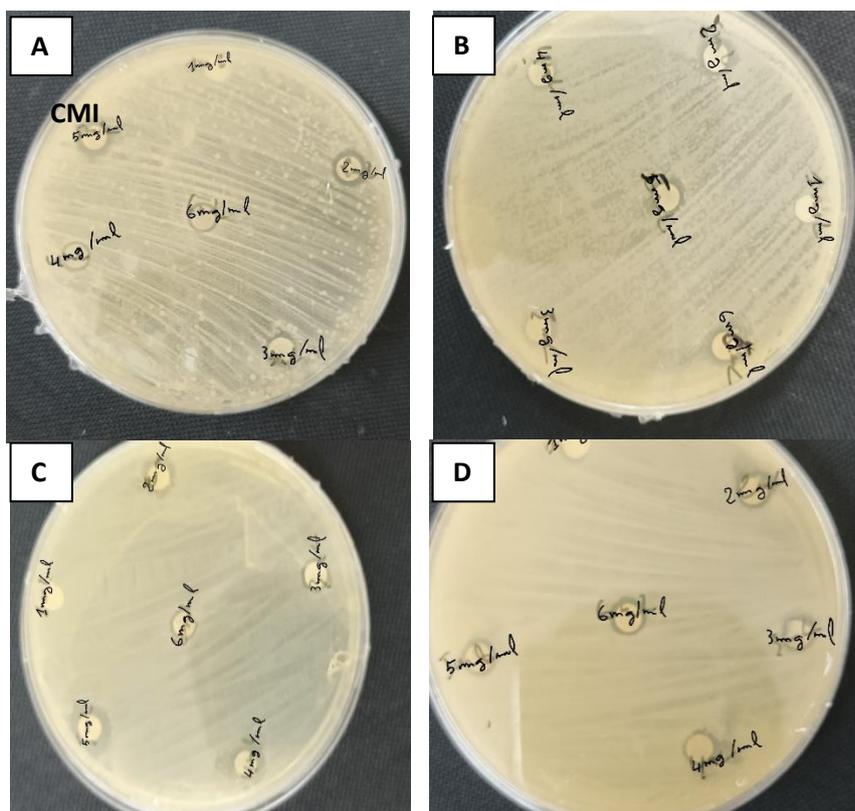
L'absence de l'effet antibactérien dans le présent travail peut être expliquée par l'insuffisance de la concentration de cuivre dans l'acétate de cuivre ou bien, par la mauvaise diffusion d'acétate de cuivre. Cependant, l'effet antibactérien des nitrates d'argent était remarquable sur les quatre souches notant une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la concentration en nitrate d'argent. Ces résultats sont en cohérence avec ceux de **(Zeyons, Ophélie, 2008)** qui ont mis l'accent sur la relation entre les diamètres des zones d'inhibitions et les différentes concentrations des nitrates d'argent testées sur quelques bactéries pathogènes.

Plusieurs travaux ont confirmé que l'effet antibactérien de l'argent peut être due à la libération des ions Ag<sup>+</sup>, qui interagissent fortement avec les groupes thiol d'enzymes importantes en les

désactivant (Morones et al., 2005). En effet, le mécanisme d'action des ions  $Ag^+$  face aux bactéries a été mis en évidence par certains auteurs, à titre d'exemple : Mungkalasiri, 2009 qui a montré que l'ADN bactérien 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 tel que l'acide nucléique. La respiration de la bactérie *Escherichia coli* est désactivée en présence des ions  $Ag^+$  entraînant la mort de la cellule bactérienne. Ces constatations confirment que les mécanismes d'action des ions argent sont particulièrement complexes et multiples.

### 4.1.5- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La figure suivante montre la concentration minimale inhibitrice des nitrates d'argent face aux bactéries test qui est équivalente à 2mg/l.



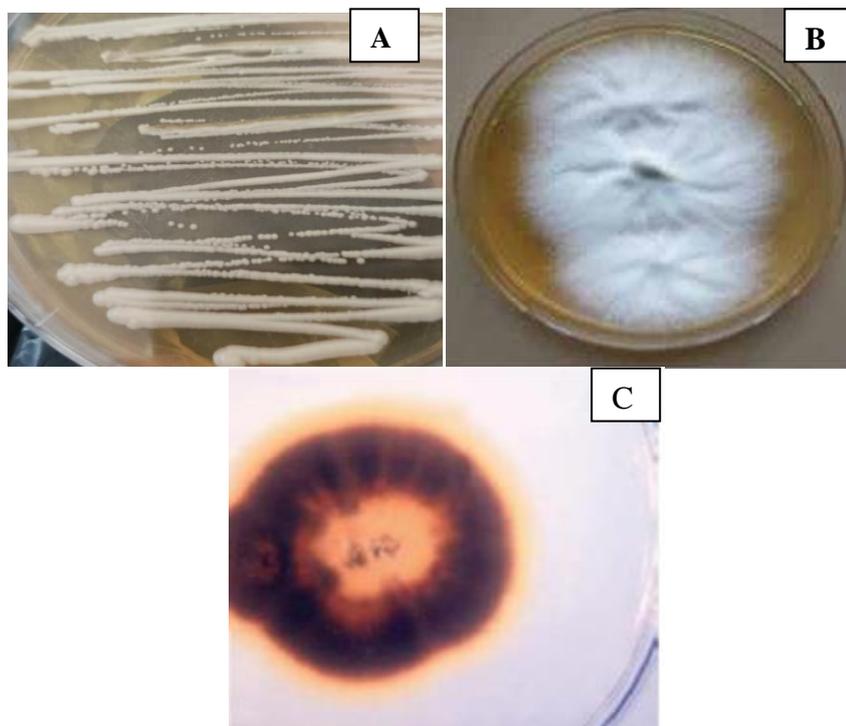
**Figure 26 :** CMI développée par les nitrates d'argent face à (A) *Staphylococcus coagulase négatif* ; (B) *Streptococcus pneumoniae* ; (C) *Escherichia coli* ; (D) *Klebsiella sp.*

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un agent antibactérien (Mungkalasiri , 2009). Nos résultats ont mis en évidence que la CMI d'Ag2Oest de 2mg/ml pour les 3 souches *Staphylococcus coagulase négatif* ; *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* et de 6mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae* (Mtimet, 2011).

## 4.2- Etude fongique

### 4.2.1- Etude morphologique

Les caractères morphologiques des souches fongiques utilisées en l'occurrence : *Candida albicans*, *Microsporium canis* et *Trichophyton rubrum* sont résumés dans le tableau 7. La figure 31 représente l'aspect macroscopique des souches fongiques en question.



**Figure 27:**Aspects macroscopiques de (A) *Candida albicans* ; (B)*Microsporium canis* (Kdada,2012) ; (C)*Trichophyton rubrum* (Kdada,2012).

**Tableau 07** : caractères morphologiques des souches fongiques

Milieu de culture	Souches fongiques	Temps d'incubation	Description
Sabouraud	<i>Candida albicans</i>	<b>2 jour</b>	Des colonies blanches de taille moyenne crémeuse lisses
	<i>Microsporium canis</i>	<b>7 jusqu'à 10 jours</b>	Des colonies grandes étoilées, à longs rayons périphériques fins et brillants et cotonneux.
	<i>Trichophyton rubrum</i>	<b>6 à 7 jours</b>	Des colonies grandes crémeuses devenant blanches, duveteuses ou même cotonneuses.

#### 4.2.2- Etude de l'activité antifongique des nitrates d'argent et d'acétate de cuivre

L'activité antifongique révélée, par les tests de diffusion sur gélose, a montré une inhibition du développement de *C. albicans* par les nitrates d'argent et ce, par l'apparition de zones d'inhibitions avec différents diamètres. Par contre, l'acétate de cuivre n'a montré aucun effet sur la croissance de la levure ce qui indique que *C. albicans* est résistante à ce produit (Figure28, Tableau 8).



**Figure 28:** test de diffusion sur gélose anti-*Candida albicans*.

**Tableau 08** : résultats du test d'activité antifongique des AgNO<sub>3</sub> et Cu<sub>2</sub>O

Les nanoparticule	Acétate de cuivre		Nitrate d'argent		Le mélange
	150mg/L	50mg/L	150mg/L	50mg/L	2 ml
<i>Candida albicans</i>	0	0	10 mm	5 mm	0
Diamètre					
<i>Microsporium canis</i>	résultat non significatif				
<i>Trichophyton rubrum</i>	résultat non significatif				

Ces résultats sont similaires à ceux de (NOUICER *et al.*, 2020) qui ont montré que le cuivre a un effet antifongique par rapport à notre étude, qui montre l'absence totale de cet effet, et au contraire il y a une augmentation de la zone d'inhibition du nitrate d'argent.

Plusieurs travaux confirment que l'effet antifongique de l'argent contre la souche étudiée peut être exercée en perturbant la structure de la membrane cellulaire et en inhibant le processus de bourgeonnement normal en raison de la perturbation de l'intégrité de la membrane (Tranet *al.*, 2013).

Enfin, et pour le test anti-dermatophytes, les résultats n'étaient pas significatifs à cause de la présence de contaminants persistants au cours des différentes répétitions.

## 5- Conclusion et Perspectives

Perspectives

5- Conclusion et

## **5-Conclusion générale et perspectives**

L'objectif de ce travail consiste à l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certaines nanoparticules en l'occurrence : l'argent et le cuivre dans un but de valorisation de leurs effets inhibiteur face à des agents bactériens et fongiques pathogènes pour l'Homme.

Le test de l'étude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre, a révélé le pouvoir des nitrates d'argent à développer un effet inhibiteur sur *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* ; *Streptocoque coagulase négative* et *Streptococcus pneumoniae* par la présence d'une zone d'inhibition qui augmente en fonction de l'augmentation de la concentration en nitrate d'argent. Contrairement à l'acétate de cuivre qui n'a présenté aucun effet inhibiteur face aux bactéries test. La CMI d'Ag<sub>2</sub>O étudiée dans le présent travail est égale à 2mg/ml pour *Staphylococcus coagulase négatif* ; *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* Et égale à 6mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae* .

Par ailleurs, Le test d'activité antifongique de l'acétate de cuivre et des nitrates d'argent a dévoilé le pouvoir inhibiteur de ces derniers sur le développement de *Candida albicans* et ce, par la présence d'une zone de lyse de 10 mm de diamètre. Cependant, l'acétate de cuivre n'a montré aucun effet antifongique.

La confirmation de l'identification des souches en question, basée sur un ensemble de tests macroscopiques, microscopiques (état frais, coloration de Gram) et biochimiques (catalase, oxydase, nitrate réductase, voie d'attaque des glucides, test d'utilisation du glucose, lactose sur milieu K.I.A, détermination de la voie d'attaque des glucides et galerie api 20 E a montré l'appartenance de ces pathogènes aux genres cités ci-dessous.

Au terme de cette étude nous pouvons nous fixer les points suivants comme perspectives :

- Confirmation de l'éventuel pouvoir inhibiteur de l'acétate de cuivre en testant d'autres concentrations;
- Réalisation d'autres tests sur de nouvelles espèces bactériennes et fongiques avec de nouvelles concentrations;
- Production naturelle de ces nanoparticule, à partir de plantes par exemple, en vue de leur application dans le traitement des pathologies humaines.





7-

**Références**  
RÉFÉRENCES

Références  
RÉFÉRENCES

1. Angélique, S. D. Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique. Thèse de Doctorat. France : Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), 2008, pp194.
2. Abdolmaleki, Z., Mashak, Z. et Dehkordi, F. (2019). Phenotypic and genotypic characterization of antibiotic resistance in the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from hospital cockroaches. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 81 :1-14.
3. Andujar P., Lanone S., Brochard P., Boczkowski J. (Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. Thèse de Doctorat. France : INSERM, Unité 955, Créteil, F-94000, 2009, 39p.
4. Ammari, H., Benslimani, H., Rahal, K., Tali, H., Kechih, S. (2011). Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale. 6ème Edition. OMS. pp 25-29
5. BOUZAR Abdelbasset. SYNTHÈSE DE NANOPARTICULE D'OR ET LEUR CARACTÉRISATION PAR GRANULOMÉTRIE LASER. Mémoire de Master en chimie. Tlemcen : UNIVERSITE DE TLEMCEM, 2017, 43 p.
6. Badri Y. (2018). L'industrie des nanoparticules dans le domaine de la santé. Université de Lille 2. Faculté ingénierie et management de la santé (ILIS). Ingénierie de la santé health care business and recherche clinique.
7. Breathnach A. S. (2013). Nosocomial infections and infection control. *Med*. 41(11) : 649- 653.
8. Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Raymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y. and Veau P. (1990). *Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle*, (edn) Masson, Paris.

9. Brown, C., Alhassan, A. N. (2014). Multiple-antibiotic-resistant bacteria from cockroaches trapped from a public hospital and a nearby students' hostel in Accra, Ghana. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 8 : 18-59.
10. Carolina D.S., Marcelo S., Avinach P., *et al.*, (2014). Silver Nanoparticles: Therapeutical Uses, Toxicity, and Safety Issues. *Journal*.
11. Chabbi.k., Cherif.f. L'étude de la flore résistante aux antibiotiques isolée à partir des cafards dans différents environnements. Mémoire de Master en biologie appliqué. Biskra : Université Mohamed Khider de Biskra, 2020, 34 P.
12. Dreaden, E.C., Alkilany, A.M., Huang, X., Murphy, C.J., El-Sayed, M.A., (2012). The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* 41: 2740–2779.
13. Delarras C. (2007). *Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire*. Edition TEC et DOC, Lavoisier, Paris.
14. 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.
15. Fahmy B. et Cormier. (2009). Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells. *Toxicology in Vitro* 23(7): 1365-13
16. Greena, J .Sarah, Ndegwaa., (2011). Les nanotechnologies. NCCFEH. pp 2-4.
17. Guiraud J.P.(1998) . *Microbiologie alimentaire* , ( edn) Dunod. Paris.

18. Huh A. J., Kwon Y. J.,(2011). Nanoantibiotics': a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*.8 :128–145.
19. Islam, A., Nath, A. D., Islam, K., Islam, S., Chakma, S., Hossain, M. B.and Hassan, M. M. (2016). Isolation, identification and antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* in Cockroaches (*Periplaneta americana*). *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*, 3 :221-228.
20. J. Belloni, M. Mostafavi, H. Remita, J.L. Marignier, M.O. Delcourt, *New J. Chem.* 22 (1998) 1239-1255.
21. Kdada, H . ÉTUDE COMPARATIVE DES PERFORMANCES DE SEPT MILIEUX DE CULTURE PROPOSÉS POUR L'IDENTIFICATION DE DERMATOPHYTES. Thèse de Doctorat en pharmacie. Maroc : UNIVERSITE MOHAMMED V,2012,102p.
22. 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.
23. Keywan M., Najaf M., Samadian H., *et al.*, (2019). Redox interactions and genotoxicity of metal-based nanoparticles: A comprehensive review. *Journal of Chemico-Biological Interactions*. 45 :312-318.
24. Karlsson H. L., Gustafsson J., Cronholm P., and Moller L. (2009). *Toxicology Letters* **188**: p112.
25. Levy S.B, Marshall B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat .Med.***10 (12)**:122–9.

26. Lanone S, Boczkowski J. (2010). Les sources de nanoparticules. Rev .Fr. Allergol. **50** (3) : 211–213.
27. Li W., Xiao-Bao X., Qing-Shan S., (2011). Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. J Biometals. **24** :135–141
28. Mehtar, S., Wiid, I., Todorov, S. D.,( 2008). The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. J. Hosp. Infect. **68** (1) : 45-51.
29. Mabena, L.F., Sinha Ray, S., Mhlanga, S.D., Coville, N.J., (2011). Nitrogen-doped carbon nanotubes as a metal catalyst support. Appl. Nanosci. **1**: 67–77.
30. Meyer A., Deiana J .and Leclerc H. (1994).*Cours de microbiologie générale* . Nouveau programme, ( edn) Doin.France.
31. Moges, F., Eshetie, S., Endris, M., Huruy, K., Muluye, D., Feleke, T. and Nagappan, R. (2016). Cockroaches as a source of high bacterial pathogens with multidrug resistant strains in Gondar town, Ethiopia. BioMed research international.
32. Mengheri, E. Marianna R.Alberto, F. Ivana ,G. Maria S.B. .Zinc Oxide Protects Cultured Enterocytes from the Damage Induced by *Escherichia coli*.Thèse de Doctorat, Roma :Institut nationale de recherche, 2009,pp72.
33. Minor C. and Richard C. (1993). Méthodes de laboratoire pour identification des entérobactéries. Institut Pasteur, France. 217p.
34. Morones , J.R. Elechiguerra ,J.L. Camacho ,A. Kouri, J.B. Holt K. Yacaman ,M.J. Ramirez ,J.T. ,(2005).The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. Nanotechnology . **16(10)**:2346-2353.

- 35.** Nouicer, A., Dridi, A. Le cuivre : Ses propriétés biocides et son utilisation dans les établissements de santé contre les infections nosocomiales..Thèse de mémoire. Algérie : Université des Frères Mentouri Constantine, 2020, 76p
- 36.** Oussad, H., Rabet, N. Caractérisation phénotypique de l'antibiorésistance et de quelques facteurs de virulence de souches d'E.coli pathogènes aviaires (APEC). mémoire de master en biologie. Tizi ouzou : université mouloud memmeri Tizi ouzou, 2017, 72.
- 37.** Prescott, L.M., Harley, J.P., et Klein, A. (2003). Microbiology. Ed : De Boeck. Paris (France). **128(2)**:28:29.
- 38.** Pai, H. H. (2013). Multidrug resistant bacteria isolated from cockroaches in long-term care facilities and nursing homes. Acta tropica. **125(1)** : 18-22.
- 39.** R. Shenhar and V. M. Rotello, Acc. Chem. Res., (2003). **36** : 549–561.
- 40.** Ren, G., Hu, D., Cheng, E. W., Vargas-Reus, M. A., Reip, P. and Allaker, R. P. (2009). Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. International Journal of Antimicrobial Agents. **33(6)** : 587-590.
- 41.** Saulou C. Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma. Thèse de Doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. Toulouse : L'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, Toulouse, 2009, 313p.
- 42.** Sigmund, W., Yuh, J., Park, H., Maneeratana, V., Pyrgiotakis, G., Daga, A., Taylor, J., Nino, J.C., (2006). Processing and structure relationships in electrospinning of ceramic fiber systems. J. Am. Ceram. Soc. **89** : 395–407.
- 43.** Saeed, K., Khan, I., (2014). Preparation and properties of single-walled carbon nanotubes/poly(butylene terephthalate) nanocomposites.

44. Saeed, K., Khan, I., (2016). Preparation and characterization of singlewalled carbon nanotube/nylon 6,6 nanocomposites. *Instrum Sci. Technol.* **44** :435–444.
45. Sedira S. Etude et synthèse des nanostructures pour application en biomédicale et environnementale: cas de nanoparticules de ZnO, Ag et couches minces de type C-TiN. Thèse de Doctorat en physique. Algérie : Université de Constantine1,2014 , 112p.  
NOUICER, A., DRIDI, A. Le cuivre : Ses propriétés biocides et son utilisation dans les établissements de santé contre les infections nosocomiales..Thèse de mémoire .Algérie : Université des Frères Mentouri Constantine,2020,76p
46. Singleton P .( 2005).*Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies*,(6th edn) DUNOD.Paris.
47. Singh,G. Joyce,M. Beddow,J .Mason,J.,2012. Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles, Coated Sonochemically onto textile fabrics. *JMBFS.P* .**109** :106-120.
48. Thomas, S., Harshita, B.S.P., Mishra, P., Talegaonkar, S., (2015). Ceramic nanoparticles: fabrication methods and applications in drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **21** : 6165–6188.
49. Thati.V .Aashis, S.Roy,1.M.V,N.Ambika Prasad1.,C. T. ShivannavaretS.M.Gaddad., (2009) . Nanostructured zinc oxideenhances the activity of antibiotics against Staphylococcus Aureus .Thèse Doctorat, Université de Gulbarga-Karnataka. Inde.pp55-63
50. Tran Q., Nguyen V., et al., (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives.

- 51.** Vesina, L. et Lacroix, M., (2000). Classical biochemical tests for identification of *Pectobacterium* (*Erwinia pectinolytica*) et des *Pseudomonas fluorescens*. Laboratoire de diagnostics en phytoprotection – MAPAQ.9P.
- 52.** Wannigama, D. L., Dwivedi, R., & Zahraei-Ramazani, A. (2014). Prevalence and antibiotic resistance of gram-negative pathogenic bacteria species isolated from *Periplaneta americana* and *Blattella germanica* in Varanasi, India. *Journal of arthropod-borne diseases*, 8 :10-18.
- 53.** Xue, F. U., Lefu, Y. E., & Feng, G. E. (2009). Habitat influences on diversity of bacteria found on German cockroach in Beijing. *Journal of Environmental Sciences*, 21 : 249-254.
- 54.** Zhang X., Liu Z., Shen W., et al., (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol.*

Site web :

1. <https://www.lenntech.fr/periodique/elements/cu.htm>
2. <https://www.elementschimiques.fr/?fr/elements/z/47>

6-

- Résumé
- Abstract
- ملخص

### 3- Résumé

Dans cette étude, les souches bactériennes : *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* ; *Streptocoque coagulase négative* ; *Streptococcus pneumoniae* et les souches fongiques en l'occurrence : *Candida albicans* ; *Microsporium canis*; *Trichophyton rubrum* ont fait l'objet de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certaines nanoparticules à savoir : l'argent et le cuivre dans un but de valorisation de leurs effets face à ces pathogènes humain.

La caractérisation des bactéries en question, basée sur une étude macroscopique, microscopique et biochimique, a montré qu'il s'agit effectivement de *de Klebsiella sp.* *de E. coli*, *de Staphylococcus coagulase négative* et *de Streptococcus pneumoniae*,.

En effet, cette dernière est Gram+, catalase +, oxydase -, nitrate réductase positive pour *Streptococcus pneumoniae*, possède un métabolisme inactif. Tandis que les souches est Gram- , catalase+, oxydase- , nitrate réductase - , et pour *Klebsiella sp.* Possède un métabolisme oxydatif. De même pour les souches fongiques, l'étude morphologique effectuée a confirmé leurs appartenances aux genres cités ci-dessous.

Par ailleurs, le test de l'étude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre effectué, *in vitro*, sur les souches bactérienne à révéler qu'il n'y a pas eu de zone d'inhibition autour des puits contenant l'acétate de cuivre par contre, l'effet antibactérien des nitrates d'argent était remarquable avec une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la concentration en nitrate d'argent. Nos résultats ont mis en évidence que la CMI d'Ag<sub>2</sub>O est de 2mg/ml pour : *Staphylococcus coagulase négatif*; *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* et de 6mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae* .

Cependant, le test de l'activité antifongique des nitrates d'argent et d'acétate de cuivre réalisé, *in vitro*, sur *C. albicans* a dévoilé la formation d'une zone d'inhibition de 10mm de diamètre sur la gélose Sabouraud, préalablement étalé par la levure.

**Mots clés :** nanoparticules, activité antimicrobiennes, bactéries, mycètes, CMI.

## Abstract

In this study, the bacterial strains: *Escherichia coli*; *Klebsiella sp.*; *Streptococcus coagulase negative*; *Streptococcus pneumoniae* and fungal strains in this case: *Candida albicans*; *Microsporum canis*; *Trichophyton rubrum* were the subject of the evaluation of the antimicrobial activity of some nanoparticles namely: silver and copper with the aim of valuing their effects against these human pathogens.

The characterization of the bacteria in question, based on a macroscopic, microscopic and biochemical study, showed that it is indeed *Klebsiella sp.* of *E. coli*, *Staphylococcus coagulase negative* and *Streptococcus pneumoniae*.

Indeed, the latter is Gram+, catalase +, oxidase -, nitrate reductase positive for *Streptococcus pneumoniae*, has an inactive metabolism. While the strains is Gram-, catalase+, oxidase-, nitrate reductase -, and for *Klebsiella sp.* Has an oxidative metabolism. Similarly for the fungal strains, the morphological study carried out confirmed their belonging to the genera listed below.

Moreover, the test of the antibacterial activity of silver nitrate and copper acetate carried out, in vitro, on the bacterial strains revealed that there was no zone of inhibition around the wells containing copper acetate. On the other hand, the antibacterial effect of silver nitrate was remarkable with an increase in the diameter of the zone of inhibition according to the silver nitrate concentration. Our results showed that the MIC of Ag<sub>2</sub>O is 2mg/ml for : *Staphylococcus coagulase negative* ;*Escherichia coli*; *Klebsiella sp.* and 6mg/ml for *Streptococcus pneumoniae* .

However, the test of the antifungal activity of silver nitrates and copper acetate carried out, in vitro, on *C. albicans* revealed the formation of a zone of inhibition of 10mm of diameter on the Seaboard agar, previously spread by the yeast.

**Key words:** nanoparticles, antimicrobial activity, bacteria, fungi, MIC.

## ملخص

في هذه الدراسة ، السلالات البكتيرية

*Klebsiella sp. Et Staphylococcus coagulase négative , Escherichia coli , Streptococcus pneumoniae*

والسلالات الفطرية في هذه الحالة:

*Candida albicans ; Microsporium canis; Trichophyton rubrum*

كان موضوع تقييم النشاط المضاد للميكروبات لبعض الجسيمات النانوية ، وهي: الفضة والنحاس ، بهدف تعزيز تأثيرها ضد مسببات الأمراض البشرية.

أظهر توصيف البكتيريا المعنية ، بناءً على دراسة ميكروسكوبية وميكروسكوبية وكيميائية حيوية ، أنها بالفعل

*Klebsiella sp. de E. coli, de Staphylococcus coagulase négative et de Streptococcus pneumoniae,*

و في الواقع هو في الاخير Gram+, catalase +, oxydase -, nitrate réductase+

الى عن على *Streptococcus pneumoniae*

يمتلك التمثيل الغذائي غير النشط. بينما السلالات

*Klebsiella sp* و هي Gram- , catalase+, oxydase- , nitrate réductase -

لديه عملية التمثيل الغذائي المؤكسدة. وبالمثل بالنسبة للسلالات الفطرية ، أكدت الدراسة المورفولوجية انتمائها إلى الأجناس المذكورة أدناه

بالإضافة إلى ذلك ، أظهر اختبار دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لنترات الفضة و خلاص النحاس التي أجريت في المختبر

على السلالات البكتيرية أنه لا توجد منطقة تثبيط حول الأبار المحتوية على أسيتات النحاس من ناحية أخرى ، التأثير المضاد للبكتيريا من نترات الفضة كان ملحوظاً مع زيادة قطر منطقة التثبيط وفقاً لتركيز نترات الفضة. أظهرت نتائجنا أن

من أجل 2 mg / ml هو MIC - Ag2O

*Staphylococcus coagulase négatif; Escherichia coli ; Klebsiella sp. et de 6mg/ml pour Streptococcus pneumoniae .*

C. albicans ومع ذلك ، فإن اختبار النشاط المضاد للفطريات لنترات الفضة و خلاص النحاس الذي تم إجراؤه في المختبر على ، سبق انتشاره عن طريق الخميرة Sabouraud كشف عن تكوين منطقة تثبيط قطرها 10 مم في أجار

. الكلمات المفتاحية: MIC الجسيمات النانوية ، النشاط المضاد للميكروبات ، البكتيريا ، الفطريات ،



8-

## Annexes

8-

## Annexe 1

### **Milieu Muller Hinton (MH)**

La gélose Mueller-Hinton est un milieu standardisé recommandé pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries peu exigeantes. Pour les bactéries exigeantes, comme, par exemple, les *Streptococcus*, les *Haemophilus*, *Neisseria meningitidis*, on utilise une gélose MH-F.

La gélose MH-F est une gélose MH enrichie avec du sang défibriné de cheval et du  $\beta$ -NAD (facteur V des *Haemophilus*).

Hydrolysate acide de caséine (peptone) 17g

Extrait de viande 2,0 g

Amidon 1,5 g

Calcium 20 à 25 mg

Agar 15,0 g

pH = 7,5 +/- 0,2

eau distillée 1L

### **Gélose Sabouraud**

La gélose Sabouraud est un milieu recommandé pour la culture des champignons. La composition chimique théorique de ce milieu en g/L d'eau purifiée est :

Peptone de viande (bovin ou porcin) 3 Peptone de caséine (bovin) 3

Peptone de soja 3

Extrait de levure 2

Extrait de malt 1

Glucose 19

Phosphate monopotassique 0.5

Phosphate disodique 0.5

Agar 13

Le pH est de 6.4. La présence de trois peptones et du glucose, ainsi que le pH acide du milieu favorisent la croissance des levures et des moisissures (Delarras, 2007).

### **Gélose Nutritive**

Gélose nutritive ou gélose nutritive ordinaire (GNO) ou encore gélose ordinaire, est un milieu d'isolement non-sélectif dont la composition chimique théorique en g/L d'eau purifiée est : Peptone 10

Extrait de viande 5

Chlorure de sodium 5

Gélose 15

pH 7.2, autoclaver 20 minutes à 120°C (Guiraud, 1998).

La préparation du bouillon nutritif est la même, sauf qu'il n'y a pas l'ajout de l'agar.

## Annexe 2

### ***Escherichia coli***

Les souches d'*Escherichia coli* uropathogènes (ECUP) sont responsables de 80% des infections des voies urinaires soit environ 150 millions de personnes par an dans le monde. Elle est la bactérie la plus fréquemment retrouvée dans les infections urinaires de l'adulte. ces taux de résistance varient en fonction du lieu d'isolement, du caractère nosocomial ou communautaire de l'infection et de l'antibiotique testé (Izyajen, 2007).

### ***Klebsiella pneumoniae***

Ce sont des bactéries ubiquitaires présentes dans le tube digestif et dans l'appareil des animaux et de l'Homme en tant que bactéries commensales. Elles sont fréquentes dans les selles et peuvent être un indicateur d'une contamination fécale (Izyajen, 2007).

## Annexe 3

### Colorants

#### Bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est une molécule organique de formule brute  $C_{16}H_{18}ClN_3S$ . Il est aussi appelé méthyl thioninium ou chlorure de tétraméthylthionine. Cette molécule existe sous deux formes :

- Une forme oxydée bleu
- Une forme réduite incolore

Ses propriétés sont utilisées pour des expériences de biochimie. Par exemple, en présence de glucose, le bleu de méthylène perd sa coloration bleue car il est réduit par le glucose. Mais si on secoue la solution, le bleu peut réapparaître par oxydation

#### Violet de Gentiane

Colorant utilisé pour la coloration de Gram, sa composition chimique par 100ml d'eau distillée est la suivante :

- Violet de Gentiane 1g
- Ethanol à 90% 10ml
- Phénol 2g (Guiraud, 1998)

#### Lugol

- Iode 1g
- Iodure de potassium 2g
- Eau distillée 300ml (Guiraud, 1998)

#### Fuchsine

- Fuchsine basique 1g
- Alcool éthylique à 90° 10ml
- Phénol 5g
- Eau distillée 100ml (Guiraud, 1998)

Année universitaire : 2021-2022

Présenté par : BENZEMARI Ouassila  
HAMLAOUI Kenza

## Thèse : Utilisation de quelque nanoparticule comme moyen de lutte contre les infection microbienne

### Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en biologie appliqué

Dans cette étude, les souches bactériennes : *Escherichia coli* ; *Klebsiella sp.* ; *Streptocoque coagulase négative* ; *Streptococcus pneumoniae* et les souches fongiques en l'occurrence : *Candida albicans* ; *Microsporium canis*; *Trichophyton rubrum* ont fait l'objet de l'évaluation de l'activité antimicrobienne de certaines nanoparticules à savoir : l'argent et le cuivre dans un but de valorisation de leurs effets face à ces pathogènes humain.

La caractérisation des bactéries en question, basée sur une étude macroscopique, microscopique et biochimique, a montré qu'il s'agit effectivement de *de Klebsiella sp.* *de E. coli*, *de Staphylococcus coagulase négative* et *de Streptococcus pneumoniae*.

En effet, cette dernière est Gram+, catalase +, oxydase -, nitrate réductase positive pour *Streptococcus pneumoniae*, possède un métabolisme inactif .Tandis que les souches est Gram- , catalase+, oxydase- , nitrate réductase - , et pour *Klebsiella sp.* Possède un métabolisme oxydatif. De même pour les souches fongiques, l'étude morphologique effectuée a confirmé leurs appartenances aux genres cités ci-dessous.

Par ailleurs, le test de l'étude de l'activité antibactérienne des nitrates d'argent et de l'acétate de cuivre effectué, *in vitro*, sur les souches bactérienne à révéler qu'il n'y a pas eu de zone d'inhibition autour des puits contenant l'acétate de cuivre par contre, l'effet antibactérien des nitrates d'argent était remarquable avec une augmentation du diamètre de la zone d'inhibition en fonction de la concentration en nitrate d'argent. Nos résultats ont mis en évidence que la CMI d'Ag2O est de 2mg/ml pour : *Staphylococcus coagulase négatif*; *Escherichia coli*; *Klebsiella sp.* et de 6mg/ml pour *Streptococcus pneumoniae*.

Cependant, le test de l'activité antifongique des nitrates d'argent et d'acétate de cuivre réalisé, *in vitro*, sur *C. albicans* a dévoilé la formation d'une zone d'inhibition de 10mm de diamètre sur la gélose Sabouraud, préalablement étalé par la levure.

**Mots-clés :** : nanoparticules, activité antimicrobiennes, bactéries, mycètes, CMI

#### Laboratoires de recherche :

Laboratoire de Microbiologie. (Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Encadreur :** Dr. YUCEF ALI.M (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 1 :** BATAICHE.I (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur 2 :** ZITOUNI.H (MCB - Université Frères Mentouri, Constantine 1).



