



République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique

Université Amar Thelidji- Laghouat FACULTE : SCIENCES

DEPARTEMENT : BIOLOGIE

DOMAINE : Science de la Nature et de la Vie (S.N.V)

FILIERE : Biologie

OPTION : Microbiologie appliquée

Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Thème :

**Evaluation de l'activité biologique des nanoparticules
métalliques biosynthétisées par des microorganismes**

Présenté par :

**Mlle. GHOUMMID Sirine
Mlle. HAMDY Kaouthar
Mlle. ZEGNINI Racha Manar**

Devant le jury :

BOUSSOUSSA Hadjer	MCA	Présidente
BENAMAR Ibrahim	MCB	Examineur
MESSAOUDI Omar	MCA	Encadreur

Promotion : Juillet_2022

Remercîment

*Avant tous nous tenons à remercier Allah tout puissant de nous avoir accordé la force, le courage, et les moyens pour accomplir ce travail. Nous tenons à remercier les de jury Madame **BOUSSOUSSA Hadjer**, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury Monsieur **BENAMAR Ibrahim**, pour avoir bien voulu examiner ce travail. Nous tenons à remercier plus particulièrement notre Encadreur, Monsieur **MESSAOUDI Omar**, pour avoir accepté de nous encadrer, qui depuis le début, n'a cessé de nous faire bénéficier de ses nombreux conseils, de ses critiques, de ses compétences et de son soutien et surtout sa gentillesse. Qu'elle trouve ici nos sincères impressions de gratitude et de respect. Nos remerciements à toute l'équipe de laboratoire universitaire, et à tous ceux qui ont contribué soit de près ou de loin à la réalisation de ce travail. A nos professeurs qui nous ont enrichis de leur connaissances en ne ménageant aucun effort dans la diffusion d'un enseignement de qualité. Et pour toute la famille, **MERCI INFINIMENT** ! pour votre présence, vos encouragements et vos conseils !*

Dédicaces

*À la source de tendresse, de patience et de générosité, À
ma mère BAKHTA*

À mon cher père ABDELKADER

*À mes chères sœurs MANEL et NOUR HOUDA mon
frère MOHAMMED CHAFIK !*

À tous mes amis et collègues!

*À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de
continuer*

SIRINE

Dédicaces

*À la source de tendresse, de patience et de générosité, À
ma mère DJAMILA*

À mon cher père BELKACEM

À mes chers frères AYOUB et RAFIK !

À tous mes amis et collègues!

*À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de
continuer*

KAOUTHAR

Dédicaces

*À la source de tendresse, de patience et de générosité, À
ma mère LINDA*

À l'homme de ma vie mon père REDHA

*À mes chères sœurs RIHAM et RAGHAD mes frères
IBRAHIM, FATHI, SOHEIB!*

À tous mes amis et collègues !

*À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de
continuer*

RACHA MANAR

La synthèse verte des nanoparticules métalliques est une nouvelle approche écologique, sans toxicité pour l'environnement et l'Homme et moins coûteuse. Pour cela, une souche (S26) d'actinomycète marine isolée de la côte d'Ain Turk (Oran), a été utilisée pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent et zinc à partir de la biomasse et le surnageant. Le succès de la synthèse des nanoparticules a été vérifié par le changement de la couleur ainsi que par l'analyse du spectre UV-vis. Ensuite, les nanoparticules synthétisées ont été caractérisées par différentes méthodes spectrales (FTIR) et microscopiques (AFM). Enfin, l'activité antimicrobienne et antibiofilm des nanoparticules synthétisées ont été déterminées contre des souches pathogènes et les résultats indiquent une très bonne activité antimicrobienne des nanoparticules de zinc contre toutes les bactéries testées utilisées, ainsi qu'un très bon pouvoir antibiofilm des nanoparticules d'argent synthétisées à partir de la biomasse de la souche S26 contre le biofilm de 24h formé par la souche *Klebsiella pneumoniae*.

Mots clés : Biosynthèse, Nanoparticules, Argent, Zinc, Antimicrobienne, Antibiofilm.

التوليف الأخضر للجسيمات النانوية المعدنية هو نهج بيئي جديد ، بدون سمية للبيئة والبشر وأقل تكلفة. لهذا الغرض ، تم استخدام سلالة (S26) من الفطريات الشعاعية البحرية المعزولة من ساحل عين الترك (وهران) ، للتخليق الحيوي لجسيمات الفضة والزنك النانوية من الكتلة الحيوية و السائل الطافي . تم التحقق من نجاح تركيب الجسيمات النانوية من خلال تغير اللون وكذلك من خلال تحليل طيف الأشعة فوق البنفسجية. بعد ذلك ، تم تمييز الجسيمات النانوية المركبة بطرق طيفية مختلفة (FTIR) وطرق مجهرية (AFM). أخيرًا ، تم تقييم نشاط مضادات الميكروبات والغشاء الحيوي للجسيمات النانوية المُصنَّعة ضد السلالات المسببة للأمراض ، وتشير النتائج إلى نشاط جيد جدًا لمضاد الميكروبات لجزيئات الزنك النانوية ضد جميع البكتيريا المستخدمة في الاختبار ، بالإضافة إلى ان المضادات الحيوية لجزيئات الفضة النانوية بدت جيدة جدًا التي تم تصنيعها من الكتلة الحيوية لسلالة S26 ضد الغشاء الحيوي مدة تشكيله 24 ساعة المكونة من سلالة

Klebsiella pneumoniae

الكلمات المفتاحية: التخليق الحيوي ، الجسيمات النانوية ، الفضة ، الزنك ، مضادات الميكروبات ، مضاد حيوي الغشاء.

The green synthesis of metallic nanoparticles is a new ecological approach, without toxicity for the environment and for humans and less expensive. For this, a strain (S26) of marine actinomycete isolated from the coast of Ain Turk (Oran), was used for the biosynthesis of silver and zinc nanoparticles from the biomass and the supernatant. The success of the synthesis of the nanoparticles was verified by the color change as well as by the analysis of the UV-vis spectrum. Then, the synthesized nanoparticles were characterized by different spectral (FTIR) and microscopic (AFM) methods. Finally, the antimicrobial and antibiofilm activity of the synthesized nanoparticles were determined against pathogenic strains and the results indicate a very good antimicrobial activity of zinc nanoparticles against all the bacteria tested used, as well as a very good antibiofilm activity of silver nanoparticles synthesized from the biomass of the S26 strain against the 24-hour biofilm formed by *Klebsiella pneumoniae* strain.

Keywords: Biosynthesis, Nanoparticles, Silver, Zinc, Antimicrobial, Antibiofilm.

AFM : Microscopie à force atomique

Ag : Argent

AgNPs : Nanoparticules d'argent

AgNO₃ : Nitrate d'argent

AND : Acide dioxynucléique

BHIB : Broth heart infusion brain

CIP : Clean in place

FTIR : Spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier

GYM : Glucose yeast medium

LB : Bouillon lysogène

MH : Muller-Hintone

nm : Nanomètre

PUF : Particule ultrafine

ROS : Espèces réactives de l'oxygène

SPR : Surface plasmon resonance

UV-vis : Spectrophotométrie UV-visible

Zn : Zinc

ZnNPs : Nanoparticules de Zinc

ZnNO₃ : Nitrate de zinc

Liste des tableaux

Numéro de tableau	Titre	page
1	Les zones d'inhibition d'activité antimicrobienne (en mm) des nanoparticules	25

Numéro de Figure	Titre	Page
Figure 1	Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures Chimiques et biologiques	03
Figure 2	Approches utilisées pour la synthèse des NPs métalliques	06
Figure 3	Mécanisme de synthèse extracellulaire et intracellulaire des AgNPs par les Actinomycètes	08
Figure 4	Mécanismes généraux du mode d'action antimicrobien des nanoparticules	09
Figure 5	Les étapes de formation de biofilm	11
Figure 6	Activité antibiofilm de différentes nanoparticules	12
Figure 7	Schéma de préparation de microplaque pour la réalisation du test d'activité antibiofilm	17
Figure 8	Les résultats de la biosynthèse des NPs par la souche S26 : A : AgNPs de la biomasse, B : ZnNPs de la biomasse, C : AgNPs de surnageant	18
Figure 9	Les spectres UV-VIS des nanoparticules d'argent (A) et de zinc (B), biosynthétisés par la biomasse et le surnageant de la souche S26	21
Figure 10	Spectre FTIR de AgNPs de biomasse	22
Figure 11	Spectre FTIR de ZnNPs de biomasse	22
Figure 12	Des images tridimensionnelles Microscopie à force atomique de nanoparticules d'Ag, de Zn	24
Figure 13	Images des zones d'inhibition d'AgNPs de surnageant et biomasse et ZnNPs de biomasse.	26
Figure 14	Mécanismes de l'activité antibactérienne des nanoparticules	27

Figure 15	Résultats d'activité des nanoparticules (Ag, Zn) vis-à-vis le biofilm formé par <i>K.pneumoniae</i> sur la microplaque de 96 puits	28
Figure 16	Histogramme d'activité des nanoparticules (Ag, Zn) vis-à-vis le biofilm de <i>K.pneumoniae</i>	29

Table des matières

Résumé	
المخلص	
Abstract	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste d'abréviations	
I. Introduction	01
II. Revue Bibliographique	
1. La nanotechnologie	03
2. La nanoscience	03
3. Les nanoparticules	03
4. Les différents types de nanoparticules	04
4.1. Les nanoparticules naturelles	04
4.2. Les nanoparticules produites par l'homme de façon intentionnelle	04
4.3. Les nanoparticules produites par l'homme de façon non intentionnelle	04
5. Synthèse des nanoparticules	04
5.1. Synthèse top-down	04
5.2. Synthèse bottom-up	05
5.3. Synthèse verte	05
6. Propriétés des nanoparticules	06
6.1 .Optique	06
6.2. Physico-chimique	06
6.3. Biologique	07
7. Généralités sur les actinomycètes	07
7.1. Mécanisme utilisé par les actinomycètes	07
8. Les facteurs qui influencent la biosynthèse des nanoparticules	09
9. Activité antibiofilm des nanoparticules	09
10. Biofilm	10
10.1. Les étapes de formation de biofilm	10
11. Activité antibiofilm des nanoparticules	11
12. Les applications des nanoparticules	12

12.1. Rôle des nanoparticules dans l'administration des médicaments et le diagnostique	12
12.2. Application des nanoparticules dans l'industrie alimentaire	13
12.3. Application des nanoparticules en agriculture	13
III. Matériel et Méthode	
1. Origine des souches	14
2. Biosynthèse des Nanoparticules	14
2.1. Préparation des cultures	14
2.2. Préparation des nanoparticules à partir de surnagent et de biomasse	14
3. Caractérisation des nanoparticules biosynthétisées	15
3.1. La spectrophotométrie UV-visible	15
3.2. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	15
3.3. Microscopie à force atomique (AFM)	15
4. Evaluation de l'activité antimicrobienne	15
4.1. Préparation des suspensions de bactéries tests	15
4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits	16
5. Evaluation de l'activité antibiofilm	16
IV. Résultat et discussion	
1. La biosynthèse des nanoparticules A partir de biomasse et surnageant de la souche (S26)	18
2. Confirmation de la biosynthèse des nanoparticules	20
2.1. La spectrophotométrie UV-visible	20
2.2. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)	21
2.3. Microscopie à force atomique (AFM)	23
3. Activité antibactérienne	25
4. Activité antibiofilm	28
V. Conclusion	30
VI. Références bibliographique	
VII. Annexes	

Introduction

La nanotechnologie et les nanosciences ont été établies récemment en tant que matière interdisciplinaire qui réunit la biologie aux chimies avec la physique, cette nouvelle discipline à attirer l'attention des communautés scientifiques mondiales pour la production de diverses nanoparticules métalliques possèdent différentes application médicale, biologique, agricole, et industriel (Koul et al ., 2021). En raison de leurs petites tailles à l'échelle nanométrique (1-100 nm), les nanoparticules ont montré des différentes activités biologiques, telles que l'activité antimicrobienne, anticancéreuse et antibiofilm, contre un large éventail de micro-organismes et cellules cancéreuses. Pour cela, les nanoparticules sont qualifiées comme une alternative pour beaucoup de médicament utilisé pour le traitement de certaines maladies cancéreuses et infectieuses provoquées par des microorganismes pathogènes et multirésistants qui constituent un problème clinique majeur émergeant rapidement dans le monde et qui nécessitent un nouveau traitement efficace pour les contrôler (Liu et al.,2011) . En plus de l'application médicale, les nanoparticules peuvent être utilisées pour nettoyer les surfaces et éliminent les biofilms qui se développer sur n'importe quel type de surface comme les canalisations industrielles et qui provoquent ainsi des pertes économiques considérables (Somasundaram et al., 2019)

Plusieurs méthodes ont été proposées pour synthétiser des nanoparticules, comme des méthodes physiques, chimiques et biologiques. Les méthodes physiques sont coûteuses et nécessitent une technologie de pointe, cependant, les méthodes chimiques génèrent des produits toxiques à l'environnement, par conséquent, les méthodes biologiques ont été surmonter les inconvénients des deux méthodes précédentes physiques et chimiques, pour cela ils sont considérés comme des méthodes faciles, propres ou écologiques et moins couteuses (Gour. et Jain ., 2019).

Par l'utilisation des méthodes biologiques on peut biosynthétisé des nanoparticules par l'intermédiaire des bactéries, des extraits de plantes, des champignons et des actinomycètes (Salem et Fouda ., 2021). C'est dans cette optique qui s'inscrit notre travail, en effet, nous nous sommes intéressés à la synthèse biologique des nanoparticules métalliques par l'utilisation d'un actinomycète d'origine marine. Nous avons suivi les étapes ci-après afin d'arriver à notre objectif:

- biosynthèse des nanoparticules d'argent et de zinc par l'utilisation de la souche (s26) d'actinomycètes, isolé à partir de la cote d'Ain Turk (Wilaya d'Oran)
- Caractérisation des nanoparticules biosynthétisées par la spectrophotométrie

UV-visible, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), ainsi que la microscopie à force atomique (AFM)

- Évaluation de l'activité biologique des nanoparticules de Zinc et d'Argent obtenues activité antimicrobienne et antibiofilm.

Revue Bibliographique

1. La Nanotechnologie

La nanotechnologie c'est la recherche et le développement au niveau atomique, moléculaire à l'échelle nanométrique, le nanomètre (un milliardième de mètre : $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Elle s'intéresse à la fabrication, l'observation et la manipulation des nano-objets et étudie et comprend leurs propriétés et leurs interactions avec leur environnement, en particulier avec le vivant. Elle suscite des espoirs importants en raison propriétés particulières de la matière à l'échelle nanométrique qui permet d'envisager de nouvelles fonctions appliquées dans divers domaines (Mekonnen G ,2021).

2. La Nanoscience

C'est la science qui vise à étudier et à comprendre les propriétés de la matière à l'échelle nanométrique, Elle offre la possibilité d'appréhender de façon nouvelle un très grand nombre de problématiques qui permet de trouver des solutions prometteuses (José et al., 2021).

3. Nanoparticules :

Les nanoparticules sont des matériaux de dimension nanoscopique (1-100 nm) possèdent des propriétés physicochimiques uniques et énergies élevées ,les nanoparticules possèdent diverses natures chimiques et peuvent être métallique (argent, cuivre, zinc, ...) ou composées d'oxyde métallique de silicates ,de polymère ou des matières organiques ,et peuvent être produites dans différentes morphologies telles que des sphères , Des cylindres, des feuilles ou tube ,cette diversité morphologique et chimique des nanoparticules forme en fonction de leur synthèse et les molécules bioactives dans le milieu (Pal et al , 2019).

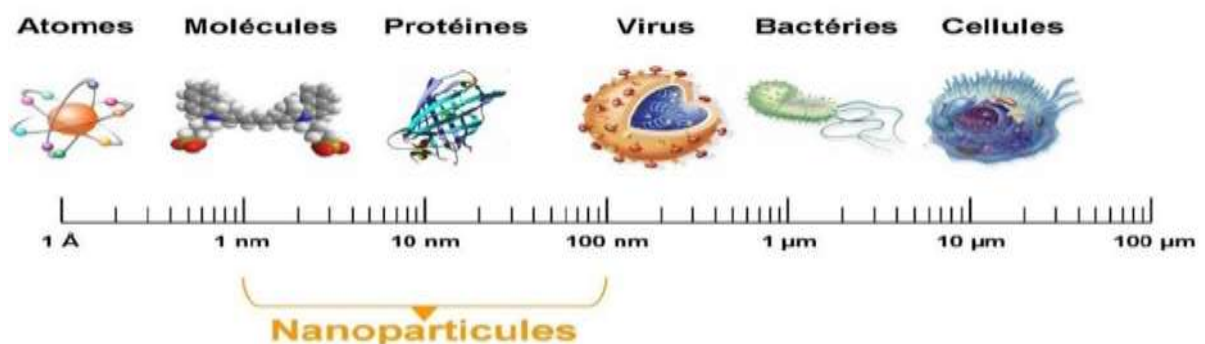


Figure1 : Gamme de tailles des nanoparticules comparée à celle des principales structures Chimiques et biologiques

4. Les différents types de nanoparticules :

4.1. Les nanoparticules naturelles :

Ces nanoparticules viennent des phénomènes naturels tels que l'activité volcanique et marine où combustion, ont noté les imogolites (présent sous forme de tube) et les allophanes (une forme décrite comme sphérique mais dans la structure reste imprécise) ces deux formes résultant de cendre volcanique (S. Lanone, J. Boczkowski ., 2010)

La capacité des microorganismes a détoxifié les polluants agissant sur les ions métalliques et en forme des complexes insolubles sous forme de nanoparticules.

4.2. Les nanoparticules produites par l'Homme de façon intentionnelle (ou nanoparticules manufacturées) :

Elles sont produites par l'homme à l'échelle industrielle par utiliser différents matériaux tels que les oxydes métalliques, les métaux, le carbone, les polymères et les lipides à l'aide des méthodes physique, chimique et biologique (S. Lanone, J. Boczkowski ., 2010)

4.3. Les nanoparticules produites par l'Homme de façon non intentionnelle :

Cette catégorie regroupe les particules atmosphériques « ultrafines » PUF en milieu urbain ou l'homme est exposé à des PUF provenant de la combustion des carburants fossiles, les véhicules à essence et des chauffages urbains, on retrouve aussi les particules présentes dans la fumée de soudage (S. Lanone , J. Boczkowski ., 2010)

5. Synthèse des nanoparticules :

Il y a plusieurs méthodes pour la synthèse des nanoparticules qui sont divisées en deux classes, approche bottom-up et top-down (figure 2). Ces approches se divisent en plusieurs sous-classes bases sur le mode opératoire, des conditions de réaction et les protocoles adoptés (Khan et al ,2019)

5.1. Synthèse top- down

Dans cette méthode, une approche destructive est employée. À partir d'une molécule plus grosse, qui se décompose en unités plus petites, puis ces unités sont converties en NP appropriées. Des exemples de cette méthode sont le broyage, lithographie, le dépôt physique en phase vapeur (PVD) et d'autres techniques de décomposition (Khan et al, 2019)

5.2. Synthèse bottom-up :

Cette approche est l'inverse de top-down car les nanoparticules sont formées à partir des substances plus simples il est aussi appelé approche de construction, implique plusieurs en donnent l'exemple de sédimentation et réduction, sol-gel, Green synthèse, le filage et synthèse biochimique (**Khan et al, 2019**)

5.3. Synthèse verte :

L'utilisation des voies biologique pour la synthèse des NP comme les bactéries, champignons ou les plantes à l'aide de technique biotechnologique. les NP qui résultant de ces techniques n'associe pas avec des produits chimiques toxiques et représente aucune menace à l'environnement (**Pal et al., 2019**).

Pour la production des nanoparticules à grande échelle l'approche physique produit des petites quantités, demande des besoins énergétiques élevés et très couteuse (**Koul et al ., 2021**).

L'approche chimique consomme moins d'énergie lors de réductions des métaux pour produire des NP mais ces méthodes sont épuisées, prennent beaucoup de temps, housard et basé sur l'utilisation des substances toxique (cytotoxique, génotoxique, cancérigène). les applications biomédicales des NP issues de méthode chimique ont été limité en raison de leur instabilité et leur nature toxique (**Koul et al ., 2021**).

Green synthèse des nanoparticules est rapide, faciles à réaliser et les caractéristiques de toxicité et la taille des NP peuvent être contrôlée (**Koul et al ., 2021**). Les NP formés de voie biologique ont été utilisée avec succès dans diverses applications (**Pal et al , 2019**).

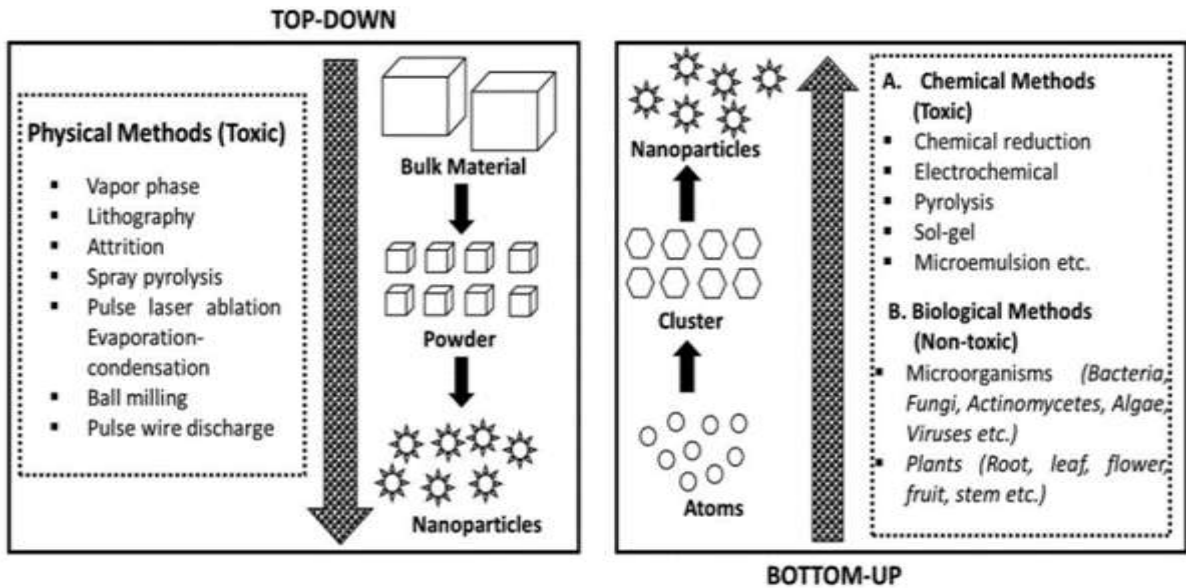


Figure 2 : Approches utilisées pour la synthèse des métaux NPs (Kumari et al ,2019)

6. Propriétés des nanoparticules :

6.1. Optique

Les nanoparticules sont extrêmement efficaces pour absorber et disperser la lumière, et la couleur des particules varie en fonction de leur taille et de leur forme. L'oscillation collective des électrons de conduction sur la surface métallique provoque l'intense interaction des nanoparticules avec la lumière. Lorsqu'il est stimulé par la lumière à des longueurs d'onde particulières, en raison de la résonance plasmonique de surface (SPR), cette oscillation caractéristique de diffusion et d'absorption forte.

6.2. Physique-chimique :

Les caractéristiques physico-chimiques des nanoparticules, telles que la taille (surface), la forme, la charge de surface, le revêtement, sont essentiels pour comprendre comment elles affectent et interagissent avec les êtres vivants. Les particules plus petites ont un plus grand potentiel de toxicité car elles ont une plus grande surface. Il est bien connu que les propriétés physiques et chimiques des nanoparticules peuvent être significativement affectées par leur forme.

6.3. Biologique:

Les nanoparticules ont démontré leur efficacité contre les bactéries aérobies et anaérobies, en précipitant les protéines bactériennes et en perturbent le système de chaîne respiratoire microbienne (Abbasi et al ., 2016)

7. Généralités sur les actinomycètes :

Les actinomycètes ou nommé aussi les actinobactéries sont un groupe des bactéries Gram-positives à forte teneur en guanine et cytosine dans leur ADN , dont la plupart sont mycélium à formation aérobie mycélium aérien , connu sous le nom de substrat ou aérien , ils sont largement distribués dans les écosystèmes terrestres et aquatiques, principalement dans le sol jouant un rôle important dans la décomposition des matières organiques et la formation d'humus . qui partagent les caractéristiques des bactéries et des champignons .Elles ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de leur morphologie (Lanone et al .,2011) ressemble fortement à celle des microorganismes eucaryotes comme les champignons filamenteux (Osada , 1998) ses colonies présentent un aspect poudreux constituée d'hyphes et adhèrent fermement à la surface de la gélose , Plusieurs groupes d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges qui peuvent contenir des spores mobiles à l'aide de flagelles ou des spores immobiles. Les actinobactéries produisent une variété de métabolites secondaires à haut pouvoir pharmacologique et intérêt commercial , certain nombre d'antibiotiques ont été découverte à partir d'actinobactéries surtout du genre Streptomyces.

Dans le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Toutes les actinobactéries sont inclusent dans l'ordre des actinomycétales. L'ordre des Actinomycetales est divisé en quatre familles : Streptomycetaceae, Actinomycetaceae, Actinoplanaceae, et Mycobacteriaceae (Anandan, R et al .,2016)

7.1. Le mécanisme des actinomycètes :

Les actinomycètes sont connus pour leurs résistances aux plusieurs métaux par des mécanismes fonction sur les principes de la chimie détoxification ainsi que cation chimiosmotique ou ATPase ou efflux d'ions dépendent de l'énergie basée sur des anti-transporteurs des protons de la cellule en utilisent ce principe , les actinobactéries peuvent

facilement détoxifier les ions métalliques en NP métallique non toxique insolubles par précipitation extracellulaire, biominéralisation, réduction ou bioaccumulation intracellulaire.

il implique différents types de réduction comme les protéines intracellulaire, les cofacteurs et des enzymes principalement nitrate réductase et des enzymes extracellulaire et des composent de la paroi cellulaire pour effectuer la synthèse des NP, la paroi chargée négativement se lie aux ions métalliques chargés positivement, les ions d'argent chargé positif de la solution de sel métallique de nitrate d'argent se lient à la paroi et subissent une réduction en Ag^0 afin de former des AgNP. En utilisant un principe similaire, la réduction d'autre solution de sels métalliques se produit en NP par les actinomycètes comme il est montré dans la **figure 3**. (Kumari et al ,2019).

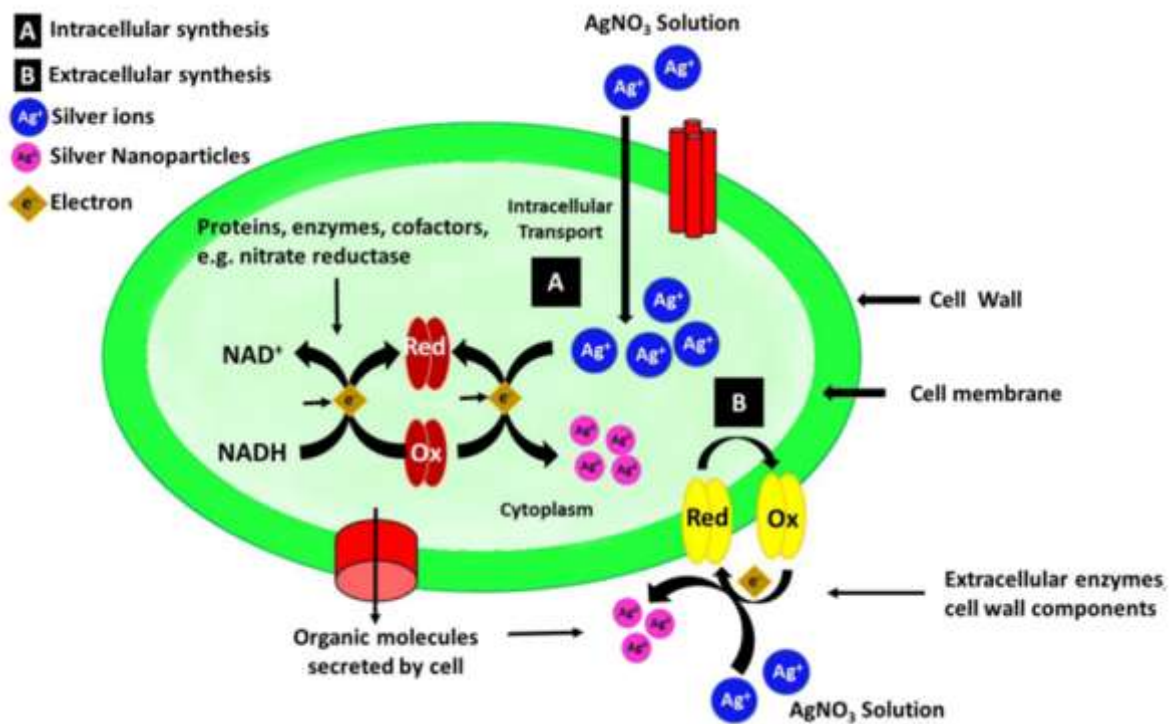


Figure 3 : Mécanisme de synthèse extracellulaire et intracellulaire des AgNPs par les actinomycètes (Kumari et al ,2019)

8. Les facteurs qui contrôlent la biosynthèse des NP :

L'optimisation des facteurs physiques contrôle efficacement la vitesse de réaction, la taille, la forme et la stabilité des NP.

-Le pH est un paramètre critique dans la synthèse des NP, en changement de pH dans les extraits peut facilement altérer les métabolismes pour réduire les ions métalliques

-La température affecte la vitesse de synthèse, la stabilité et la taille de NP

-La concentration des extraits est également importante d'optimiser la biosynthèse des NP

-Temps d'incubation nécessaire pour assurer la réduction entre l'extrait et le précurseur métallique (Kumari et al ,2019).

9. Activité antimicrobienne des nanoparticules :

L'activité antimicrobienne des NPs a été prouvée contre un large éventail de microorganisme, cependant le mécanisme exact de leur mode d'action antimicrobien n'est pas été entièrement élucidé (figure 4), d'autre recherche ont été effectuées afin de clarifier leur mode d'action proposée trois mécanisme jusqu'à présent : dommage de paroi et membrane cellulaire, pénétration et dommage intracellulaire et stress oxydatif (Roy et al ., 2018).

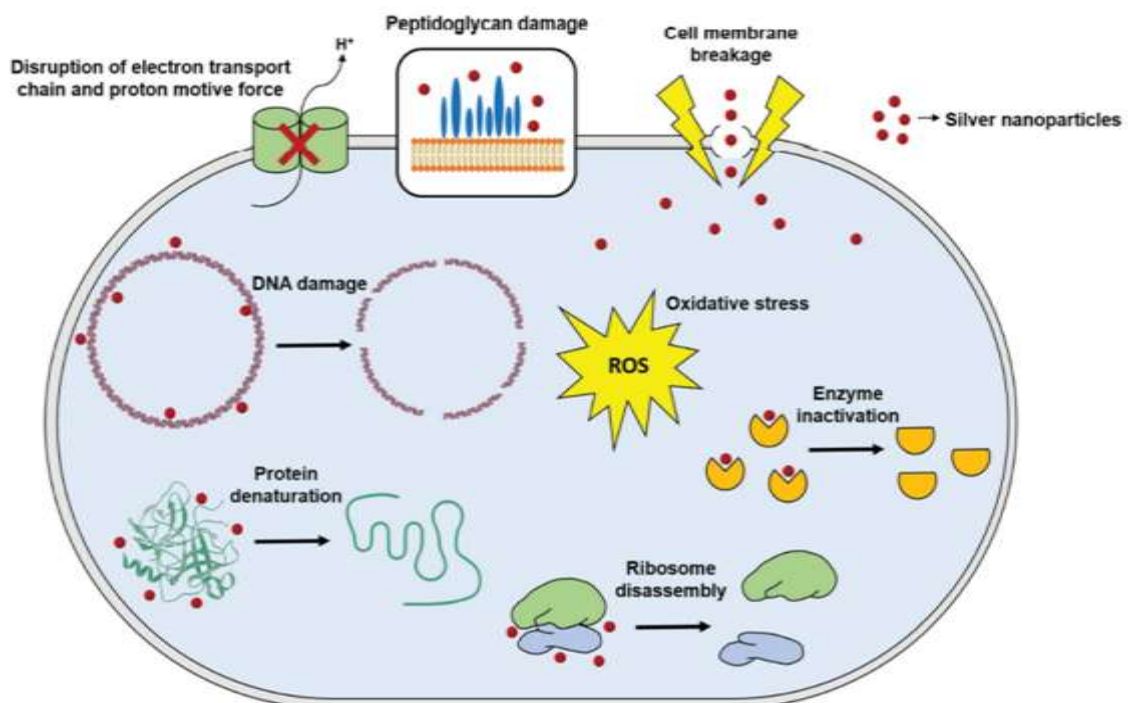


Figure 4 : Mécanismes généraux du mode d'action antimicrobien des nanoparticules

(Roy et al ., 2018).

10. Biofilm :

Le biofilm est une communauté structurée de micro-organismes, se fixant à une surface inerte ou vivante et réuni au sein d'une matrice d'exo-polysaccharides adhésives et protectrice

qu'ils secrètent. C'est une structure vivante en perpétuel remaniement. Il constitue le mode de vie majoritaire des micro-organismes, par opposition à l'état planctonique libre et isolé dans l'environnement ce qui rend l'attachement sur une surface une « stratégie de survie » Cette architecture complexe, est très variable d'un biofilm à l'autre selon les microorganismes qui le composent et les conditions environnementales et peut être constitué d'une ou plusieurs espèces de micro-organismes (Chang et al ., 2022).

10.1. Etapes de formation de biofilm :

Généralement, la formation de biofilms par des pathogènes bactériens sur surface comporte cinq grandes étapes (Srinivasan et al ., 2021) :

- Attachement : les cellules planctoniques glissent librement se connectent initialement aux surfaces biotiques ou abiotiques de manière réversible par des interactions faibles telles que les forces acides-bases, hydrophobes, et électrostatiques.
- Colonisation : les bactéries peuvent se fixer de manière irréversible aux surfaces grâce à des interactions plus fortes telles que les lipopolysaccharides, les flagelles, les pili et des liaisons au collagène.
- Prolifération : accumulation importante de cellules bactériennes multicouches et production d'énormes d'EPS.
- maturation : les cellules bactériennes multicouches qui ont adhéré se sont développées en un biofilm mature avec une structure de biofilm 3D typique.
- Dispersion : une fois le biofilm complètement développé, il est dissous ou dispersé via des procédures mécaniques et actives

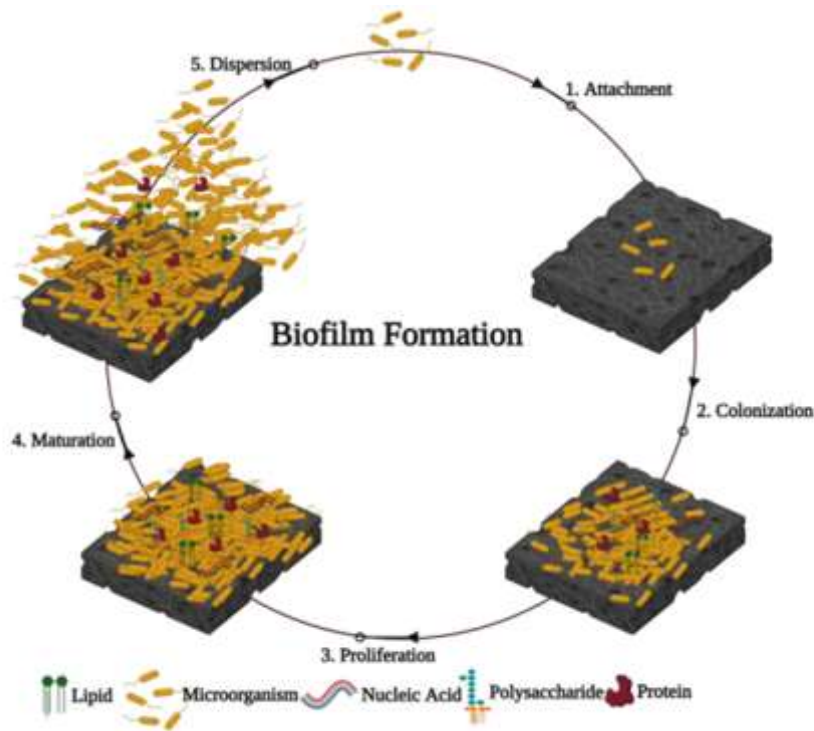


Figure 5 : les étapes de formation de biofilm (Srinivasan et al ., 2021)

11. Activité antibiofilm des nanoparticules :

Selon le rapport des Instituts nationaux de santé et centre de contrôle des maladies, environ 65 à 80 % des infections se sont produites par des microorganismes formateurs de biofilm, parmi lesquels les bactéries Gram-négatives *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* et Gram-positifs *Staphylococcus aureus* sont les plus courants. Les nanoparticules ont la capacité unique de perturber les biofilms de certains micro-organismes nuisibles cette capacité d'inhiber le biofilm et lier aux plusieurs factures incorporant l'efficacité de l'activité antimicrobienne, des caractéristiques physiques telles que la taille des nanoparticules, qui affecte la pénétration dans le biofilm, et d'autres caractéristiques chimiques telles que l'affinité entre matériau et le biofilm , l'inactivation du biofilm de *P. aeruginosa* pouvait être causée par la biosorption et que les AgNP inhibaient les cellules du biofilm de *P. aeruginosa* d'une voie dépendante de la

biosorption autre facteur démontré que les nanoparticules empêchaient la production d'exopolysaccharides, empêchant ainsi la croissance de *P. aeruginosa* et le développement de biofilms (figure 6) (Barapatre et al., 2016).

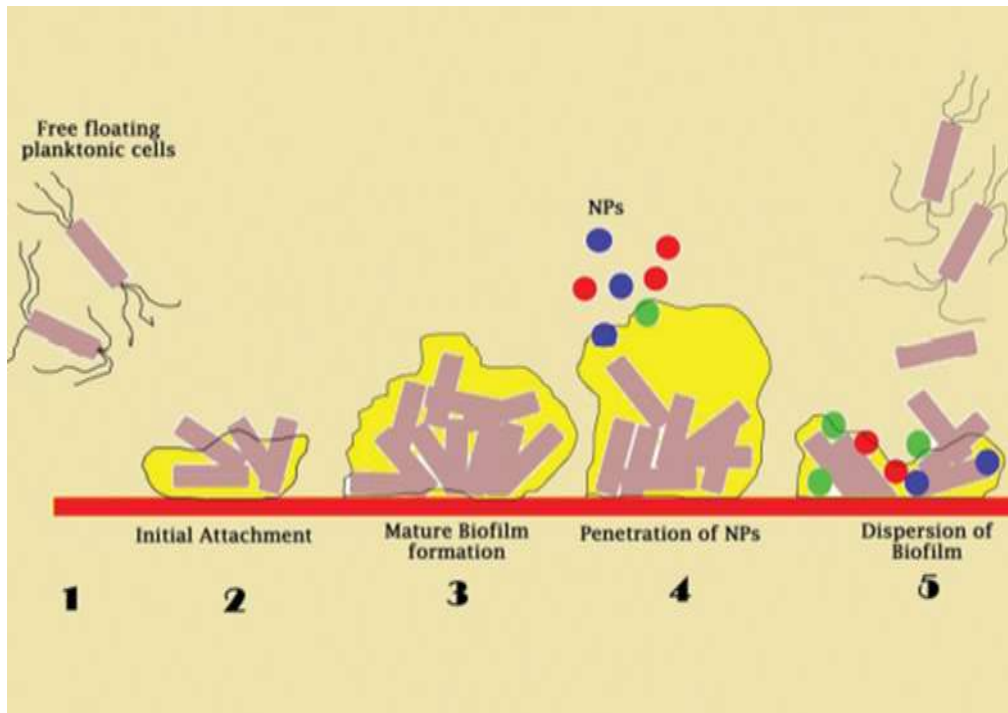


Figure 6 : Activité antibiofilm de différentes nanoparticules (LewisOscar et al., 2016)

12. Les Application des nanoparticules dans différents domaines:

12.1. Rôle des nanoparticules dans l'administration des médicaments et le diagnostique:

Les nanomatériaux peuvent être utilisés efficacement comme véhicule pour l'administration ciblée de médicaments et son outil pour améliorer la biodisponibilité, la stabilité et la bioactivité des médicaments. Les principaux nanomatériaux d'administration de médicaments comprennent les liposomes, les nanosphères, les micelles polymères, les polymères hydrosolubles, les nanoémulsions et les anticorps naturels revêtus de NP.

Ces nanomatériaux présentent de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles, par réduire le risque d'effets secondaires causés par la toxicité des médicaments chez les patients.

Les NP peuvent offrir une détection rentable, rapide, spécifique et précise des agents pathogènes ainsi que les maladies chroniques, utilisé efficacement pour l'identification, l'imagerie et le suivi des agents pathogènes et du développement des maladies (**Koul et al ., 2021**).

12.2. Application des nanoparticules dans l'industrie alimentaire :

Les NP peuvent être utilisées dans l'industrie alimentaire dans deux domaines importants, l'emballage alimentaire et préparation des aliments. Par exemple, Espitiaet et al., 2012 mélanges d'oxyde de zinc NPs avec un matériau polymère pour la synthèse de matériaux d'emballage ,les tissus nouvellement synthétisés a montré des caractéristiques antibactériennes améliorées (**Koul et al ., 2021**).

12.3. Applications des nanoparticules en agriculture :

Les utilisations des NP dans l'agriculture en tant que nano-fertilisants, nano-pesticides et nano-insecticides (**Koul et al ., 2021**).

Matériels et Méthodes

1. Origine de la souche.

La souche S26 utilisé dans cette étude a été isolée à partir d'un échantillon de sédiments marins prélevé à une profondeur de 3 m, à partir de la cote d'Ain Turk (Wilaya d'Oran), en utilisant le milieu caséine amidon agar. Cette souche a été sélectionnée, parmi plusieurs isolats obtenus à partir de sédiments marins, parce qu'elle a montré une bonne activité antimicrobienne contre plusieurs bactéries et champignons testés.

2. Biosynthèse des nanoparticules.

2.1 Préparation de la culture.

Dans le but de préparer les cultures qui sont utilisées ensuite pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent et de zinc, des erlenmeyers de 250 ml contenant 100 ml de milieu de culture GYM liquide (10g d'extrait de malt, 4 g de glucose, 4 g d'extrait de levure, 2 g de Cacao₃, 1 L eau distillé ; pH=7,2) ont étéensemencé par les spores de la souche S26. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à la température de 30°C sous agitation de 150 rpm. La durée d'incubation variée en fonction du cas, en effet, pour préparer les nanoparticules à partir de la biomasse, les erlenmeyers sont incubés pendant 5 jours, alors que pour la préparation des nanoparticules à partir de surnageant, la durée de la culture est prolongé jusqu'aux 14 jours. (Khalil, et al .,2022 ; Adgüzel et al .,2018 ; Mohd Yusof et al ., 2020)

2.2 Préparation des nanoparticules à partir de surnagent et de la biomasse.

Les cultures sont ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 40 min, pour séparer la biomasse par rapport au surnageant. La biomasse a été ensuite lavée trois fois avec l'eau distillée stérile, puis repris dans 100 ml d'eau distillée stérile dans deux erlenmeyers différents. Le nitrate d'argent (AgNO₃) et le nitrate de zinc (ZnNO₃) ont été ajoutés séparément à chacun des deux erlenmeyers à la concentration finale de 1 mM. Les erlenmeyers sont ensuite incubés à l'obscurité pendant 5 jours, et la biosynthèse des nanoparticules est détectée par virage de couleur, en effet, pour les nanoparticules d'argent la couleur devient brune noire, alors pour les nanoparticules de zinc la couleur devient blanchâtre. Les nanoparticules synthétisées sont séparées par centrifugation, puis lavé trois fois par l'eau distillée suivie par un séchage. (Sholkamy et al., 2019 ; Mohd Yusof et al ., 2020)

3. Caractérisation des nanoparticules biosynthétisées.

La caractérisation des nanoparticules biosynthétisées a été effectuée par différentes techniques spectrales et microscopiques, ci-après les techniques utilisées ;

3.1. La spectrophotométrie UV-visible.

Les spectres d'absorbance UV-visible des échantillons biosynthétisés par la souche S26 ont été mesurés par un spectrophotomètre dans l'intervalle de 200 à 800 nm. À cet effet, la poudre des nanoparticules d'argent et zinc lyophilisé a été dispersée dans d'eau distillée stérile et sonique pendant quelques minutes (Barani et al ., 2021).

3.2. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

Les Spectres de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) des échantillons ont été enregistrés sur un spectrophotomètre en utilisant la méthode des pastilles KBr dans la plage de $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, avec la résolution de 4 cm^{-1} , pour mettre en évidence les molécules bioactives responsable de la réduction et de la biosynthèse des nanoparticules (Barani et al ., 2021).

3.3. Microscopie à force atomique (AFM).

Les échantillons ont été préparés en immergeant une feuille de mica fraîchement clivée dans une suspension des nanoparticules pendant 30 min. Pour l'analyse AFM dans des conditions d'air ambiant (par exemple, humidité et température ambiantes), les échantillons ont été lavés dans d'eau distillée stérile (3 fois, 1 min chacun) et laissés sécher dans des conditions d'air ambiant et ont été analysés 24 h plus tard pour permettre l'évaporation de l'excès d'eau (Baalousha ., 2013) .

4. Evaluation de l'activité antimicrobienne.

4.1. Préparation des suspensions de bactéries testés :

L'activité antimicrobienne des nanoparticules d'Ag et de Zn, préparés à partir de la souche S26, a été évaluée contre des souches pathogènes de Gram positive (*Staphylococcus aureus*) et de Gram négative : (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica*) obtenus à partir l'hôpital 240 lits – Laghouat.

Les suspensions des micro-organismes pathogènes ont été préparées après ensemencement des bactéries testes, sur le milieu BHIB. Après 24 h d'incubation à 37°C , la turbidité de chaque micro-organisme testé a été ajustée à 0,5 McFarland, qui correspond à une absorbance

de (0.08-0.1) mesurés par un densitomètre réglé à 600 nm. Les suspensions ainsi préparées, sont ensuite ensemencées sur la surface des boîtes de pétri qui contient le milieu Muller-Hinton

4.2. Evaluation de l'activité antimicrobienne par la méthode des puits

Pour tester l'effet antimicrobien des nanoparticules de zinc et d'argent, biosynthétisées par la souche S26, 0.33 mg des NPs sèches sont dilués dans 1 ml de l'eau distillée stérile.

Des puits de 6 mm de diamètre, sont formés dans chaque boîte de Pétri déjà ensemencé par la bactérie test, à l'aide du bout d'une pipette Pasteur. Ensuite, une suspension de 20 µL de la solution de nanoparticules de zinc ou d'argent, est ajouté dans chaque puits formé au centre de la boîte de pétri (**Vanden Berghe et Vlietinck, 1991**). Les boîtes sont ensuite incubées à 37C°, après 24 heures d'incubation, les diamètres des zones des inhibitions sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse.

5. Evaluation de l'activité antibiofilm.

Dans le but de tester les nanoparticules d'argent et de zinc sur le biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae*, la souche a été ensemencée dans le milieu LB. Après 24 h d'incubation à 37 C°, une suspension de turbidité équivalente à 0.08-0.1 a été préparée.

L'activité des nanoparticules contre le biofilm de 24 h formé par la souche *Klebsiella pneumoniae* a été évaluée sur une microplaque de 96 puits.

Les puits des colonnes de la microplaque ont été remplis par 100 µl de la suspension préparée à partir de la souche *Klebsiella pneumoniae*. La microplaque a été ensuite incubée à 37 C°. Après 24 h d'incubation, la culture de la bactérie testée a été retirée par pipetage, ensuite les puits de la microplaque sont rincés par l'eau potable.

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

La microplaque a été incubée à 37C°. Après 24 h d'incubation, les puits de la microplaque ont été rincés avec l'eau distillée. Les biofilms formés sur les parois des puits de la microplaque ont été colorés par l'ajout de 100 µl d'une solution de cristal violet à 0.1 %. Après 30 minutes d'incubation sous l'obscurité à la température ambiante, le cristal violet est retiré par pipetage puis la microplaque est rincée par l'eau distillée (**O'Toole, 2011**).

Le taux d'éradication de biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae*, a été estimé après avoir ajouté dans chaque puits de l'acide acétique dilué à 30%, ensuite, la densité optique est mesurée après 20 min d'incubation à la température ambiante, par un spectrophotomètre (Lecture de microplaque) réglé à 550 nm. La moyenne des D.O des puits témoins ont été calculée, puis comparés avec les moyennes des puits traités par les nanoparticules de zinc et d'argent.

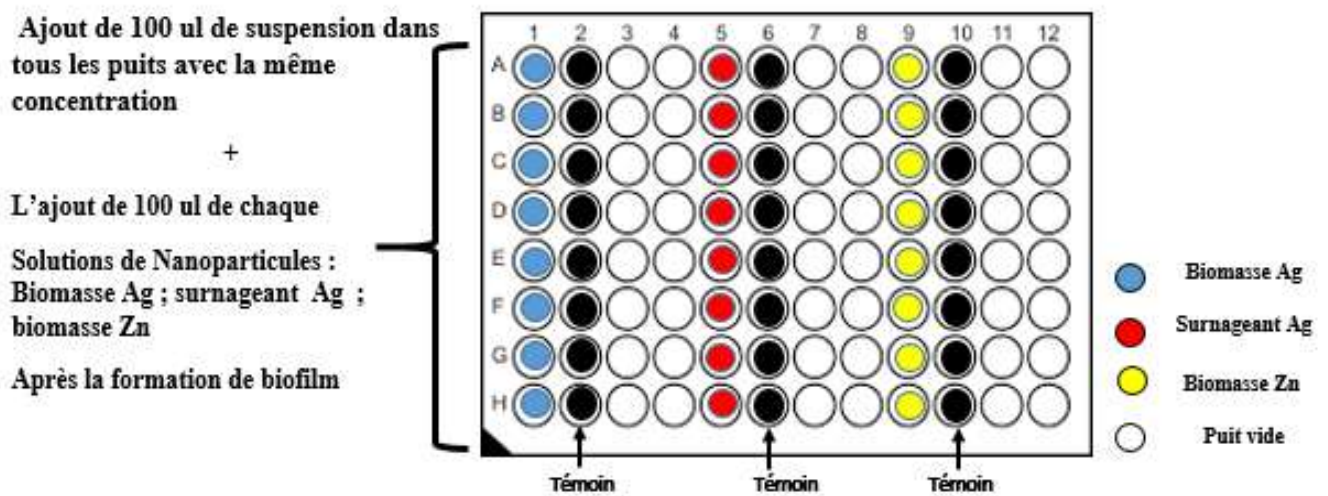


Figure 7 : Schéma de préparation de microplaque pour la réalisation du test d'activité antibiofilm

Résultats et Discussion

1. La biosynthèse des nanoparticules à partir de la biomasse de la souche (S26).

La biosynthèse des nanoparticules de zinc et d'argent a été vérifiée après 5 jours d'incubation de la souche S26 à 30°C, les résultats sont indiqués dans la **Figure 8**:

A



Avant l'ajout d'AgNO₃



Après l'ajout d'AgNO₃

B



Avant l'ajout d'ZnNO₃



Après l'ajout d'ZnNO₃

C



Avant l'ajout d'AgNO₃



Après l'ajout d'AgNO₃

Figure 8 : les résultats de la biosynthèse des NPs par la souche S26 : A : AgNPs de la biomasse, B : ZnNPs de la biomasse , C :AgNPs de surnageant.

D'après les résultats de la biosynthèse des nanoparticules d'argent et de zinc par la biomasse de la souche S26 (Figure 8, A et B), on remarque un changement de la couleur de la biomasse de cette souche du jaune pâle au brune noire (Figure 7, A), quand le nitrate d'argent (AgNO₃) est utilisé comme précurseur, alors quand le nitrate de zinc (ZnNO₃) est utilisé comme précurseur, la couleur de la biomasse de la souche S26 se changera de la couleur blanchâtre à la couleur jaune pâle. Ce changement de couleurs peut être attribué à la biosynthèse intracellulaire des nanoparticules d'argent (AgNPs) et de zinc (ZnNPs) par la biomasse de la souche S26, suite à la réduction des ions d'argent et de zinc de l'état ionique (Ag⁺, Zn⁺²) vers l'état métallique (Ag[°] et Zn[°]), par le baies de différents enzymes intracellulaires comme le nitrate réductase (**Figure 8**), selon les réactions ci-après (**Mohd Yusof et al ., 2020 ; Ghabbana et al ., 2022 ; Sanjivkumar et al ., 2022**):



Les résultats de la biosynthèse des nanoparticules d'argent par le surnageant de la souche S26, préparé à partir de la culture de ce dernier dans le milieu GYM après 10 jours d'incubation, indiquent un changement de la couleur du jaune pâle au brun noir (Figure 7, C). Cela peut être expliqué par la présence dans le surnageant de métabolites secondaires bioactives sécrétés par la souche S26, doué d'un grand pouvoir réducteur, capable de réduire les ions d'argent de l'état ionique (Ag⁺) vers l'état métallique Ag[°] (**Figure 9**), donc il s'agit d'une biosynthèse extracellulaire (**Mondal et al ., 2020 ; Khalil et al ., 2022**).

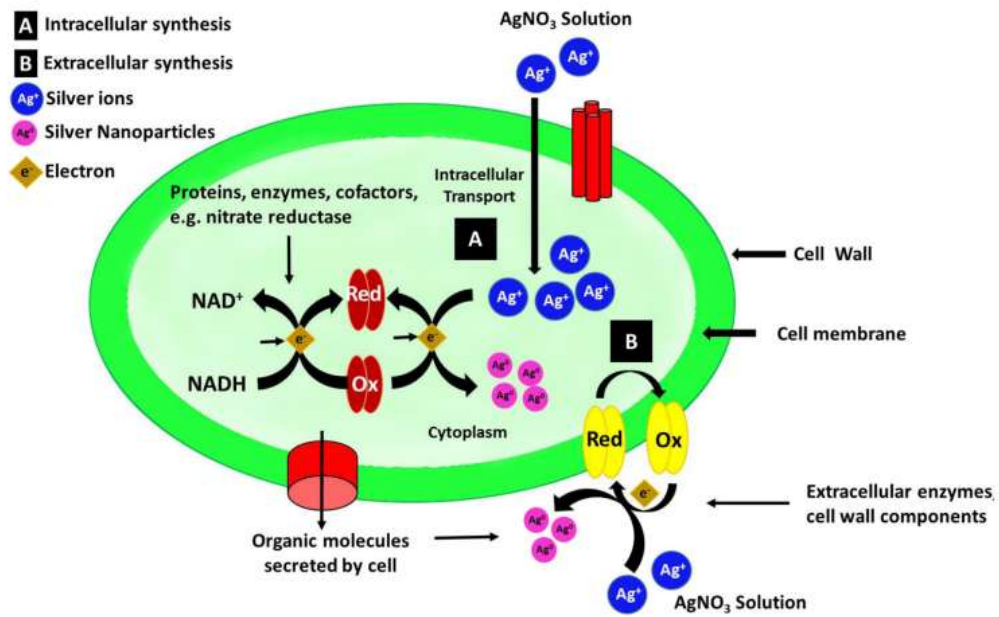


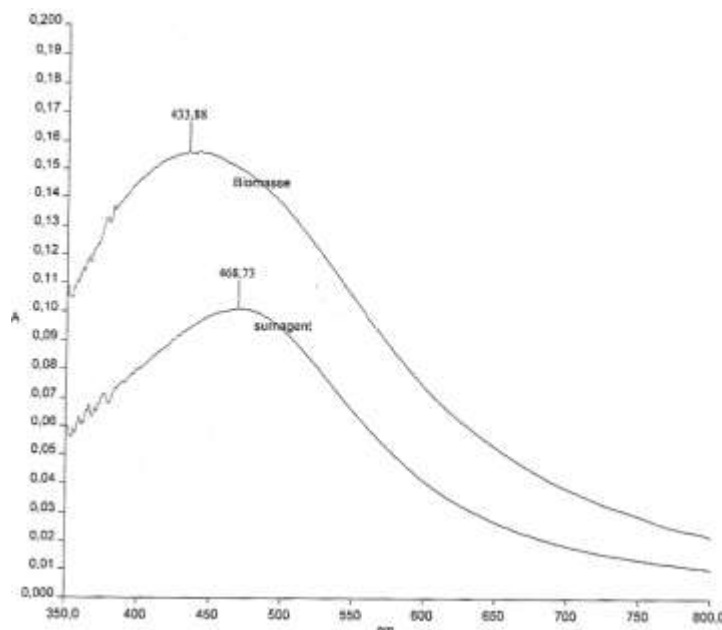
Figure 3 : Mécanisme de synthèse extracellulaire et intracellulaire des AgNPs par les actinomycètes (Kumari et al ,2019)

2. Confirmation et caractérisation des nanoparticules biosynthétisé.

2.1. Confirmation par spectrophotométrie UV-visible.

La confirmation de la biosynthèse des nanoparticules d'argent et de zinc par la souche S26, a été effectuée après analyse des échantillons par spectrophotométrie UV-visible, les résultats obtenus sont représentés dans la (Figure 9).

A



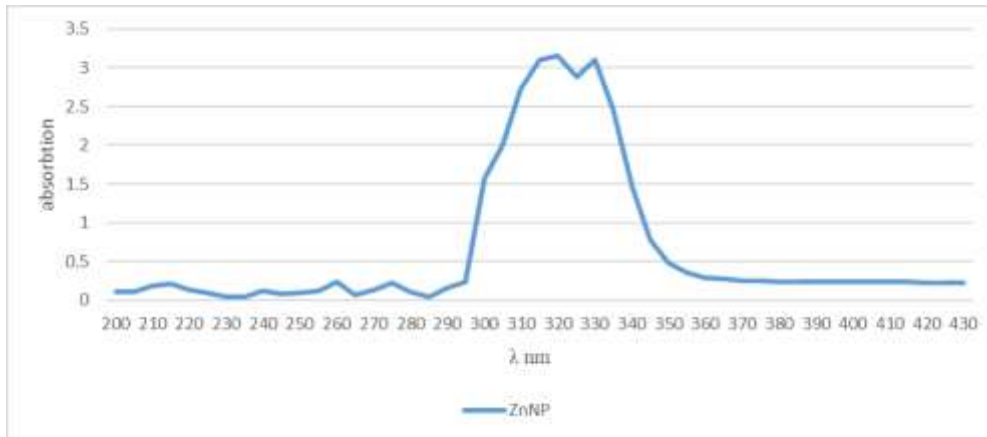
B

Figure 9 : Les spectres UV-VIS des nanoparticules d'argent (**A**) et de zinc (**B**), biosynthétisés par la biomasse et le surnageant de la souche S26.

L'analyse des spectres UV-visibles des solutions de nanoparticules d'argent préparées à partir de la biomasse et le surnageant de la souche S26 (**Figure 9, A**), indique que la longueur d'onde correspond au maximum d'absorption (λ_{\max}) pour les nanoparticules d'argent de la biomasse est au autour de $\lambda_{\max}= 433$ nm, alors le λ_{\max} pour les nanoparticules d'argent de surnageant est égal à $\lambda_{\max}= 468$ nm. Ces valeur de λ_{\max} obtenus, représentent l'intervalle d'absorbance maximal caractéristique des nanoparticules d'argents (**Khalil et al ., 2022**)

Tandis que la solution de nanoparticule de zinc, préparé à partir de la biomasse de la souche S26, à donner une longueur d'onde d'absorption maximale (λ_{\max}) égal à 320 nm (**Figure 9, B**), qui est caractéristique des nanoparticules de zinc (**Jayachandran et al ., 2021 ; Vaseem et al ., 2012**).

Ces valeurs de λ_{\max} observés (422, 468 et 320) nm sont en relation avec les électrons libres des nanoparticules métalliques d'argent et de zinc, qui donnent lieu à des bandes de résonance plasmonique de surface (SPR : surface plasmon résonance). En effet, le maximum d'absorbance (λ_{\max}) pour chaque nanoparticule est en relation avec sa taille, sa forme et sa couleur, par exemple, une augmentation du diamètre de la nanoparticule donne généralement une longueur d'onde plus longue (**Rosyidahab et al, 2022**).

2.2. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) :

Les nanoparticules d'argent et de zinc, biosynthétisé par la biomasse de la souche S26, ont été caractérisées par infrarouge, les résultats obtenus sont représentés dans les **Figures 10** et **11**.

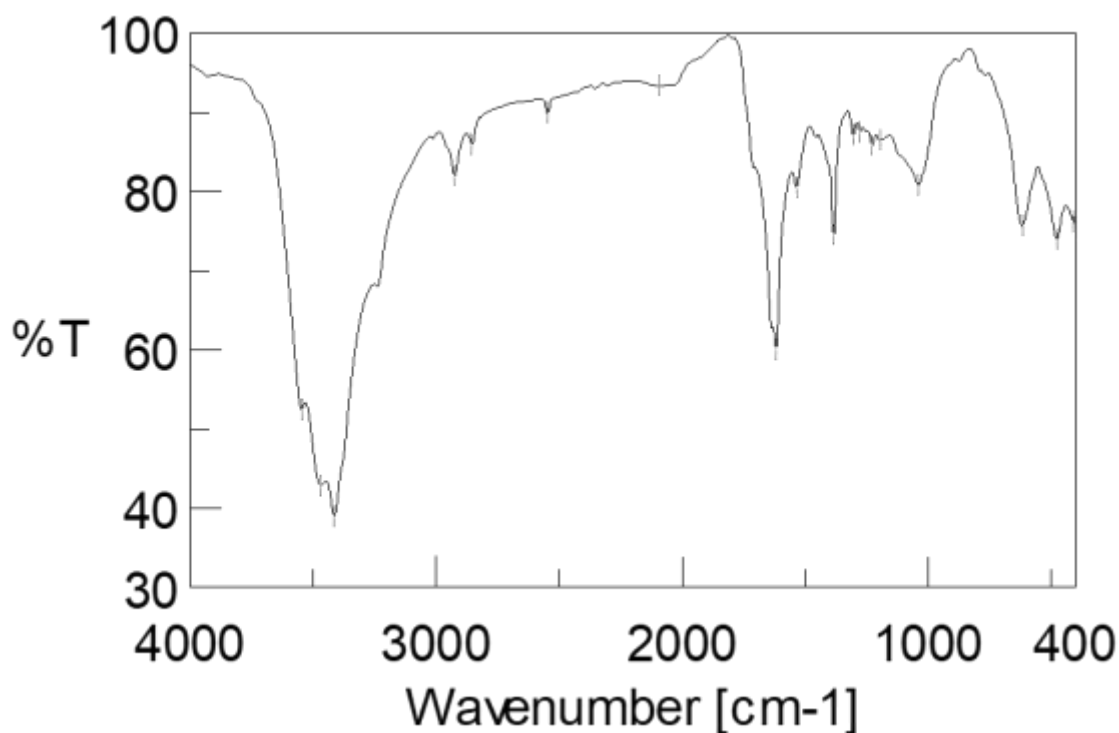


Figure 10 : Spectre FTIR de AgNPs de biomasse

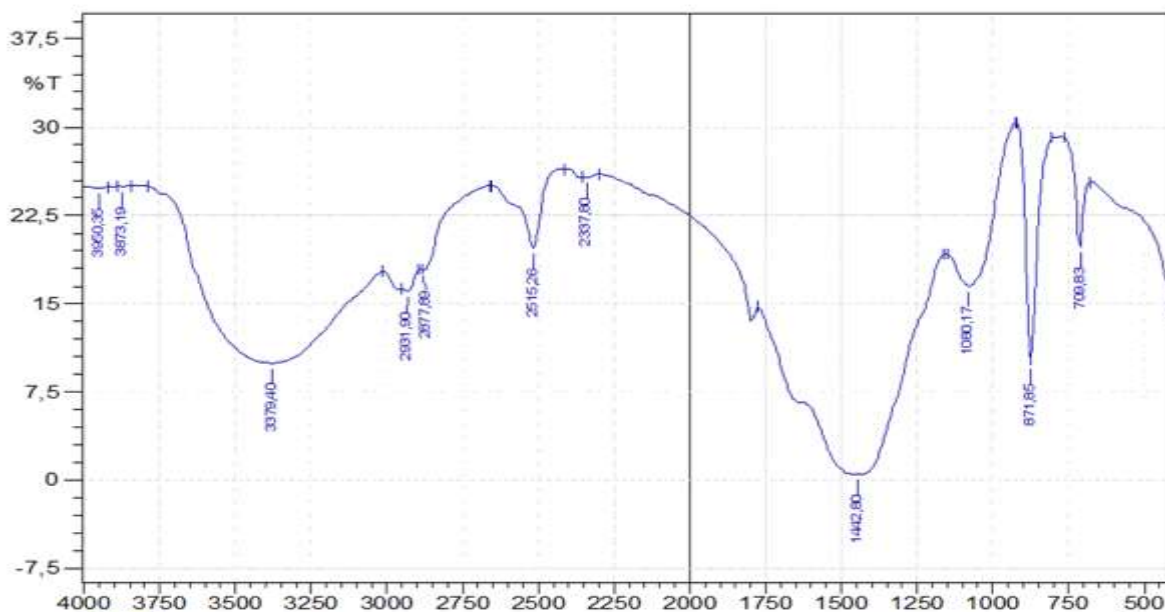


Figure 11 : spectre FTIR de ZnNPs de biomasse

L'infrarouge est une technique spectral qui permet d'analyser les groupements fonctionnels présents dans une molécule ou nanoparticules. Les résultats sont présentés sous forme d'un spectre de différentes bandes d'absorption. Chaque bande caractérise un groupe fonctionnel ou une liaison présente dans l'échantillon à analyser.

L'analyse du spectre IR de nanoparticules d'argent préparé à partir de la biomasse de la

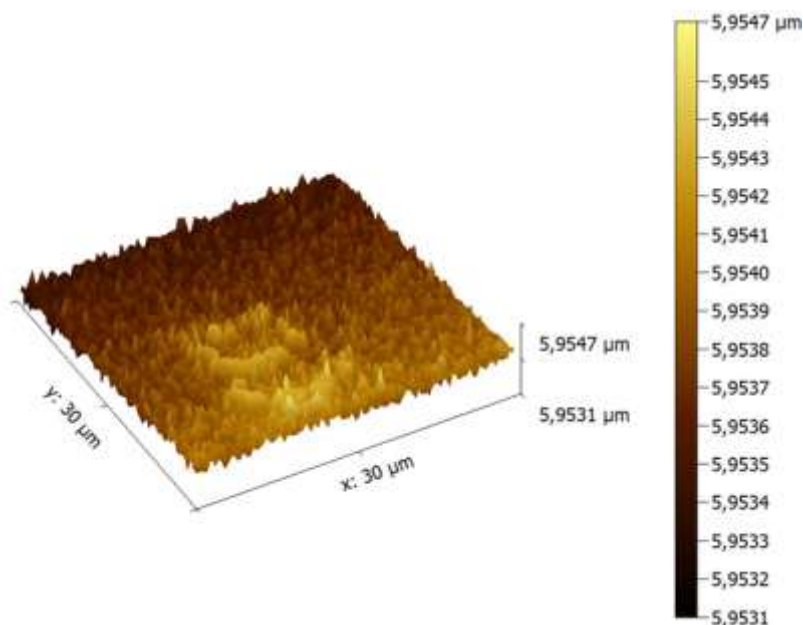
souche S26 (**Figure 10**), a montré une bande d'absorption à $3\,399\text{ cm}^{-1}$ qui peut être attribuée à la liaison N-H qui correspond à un amine primaire ou un groupe hydroxyle (-OH) liée. Alors la bande observée à $2\,932\text{ cm}^{-1}$ peut être lié à la liaison C-H qui correspond à un méthylène (CH₂), tandis que la bande à 1630 cm^{-1} correspond aux liaisons C=C qui caractérisant les cycles aromatiques, et peut aussi confirmer la présence de fonction amine primaire ($1560\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$). Le signal faible observé à $1\,381\text{ cm}^{-1}$ correspond au groupement nitro aliphatiques « N-O » (**Awwad et al .,2013**).

L'analyse du spectre IR de nanoparticules de zinc préparer à partir de la biomasse de la souche S26 (**Figure 11**), indiquent que certaines bandes sont en commun entre les deux spectres IR de zinc et d'argent, comme les bandes de $3\,399\text{ cm}^{-1}$, $2\,932\text{ cm}^{-1}$. Alors que certaines bandes caractérisent le spectre IR de zinc, comme la bande d'absorbance à 2877.90 cm^{-1} qui peut correspond à un méthyle (CH₃), tandis que la bande à 1442.80 cm^{-1} correspond à la liaison C=C caractérisent les noyaux aromatiques (**Barani .D ., 2020**).

2.3. Microscopie à force atomique.

La microscopie à force atomique a été réalisée pour déterminer la topologie des nanoparticules métalliques d'argent et zinc préparés à partir de la souche S26, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 12**.

A



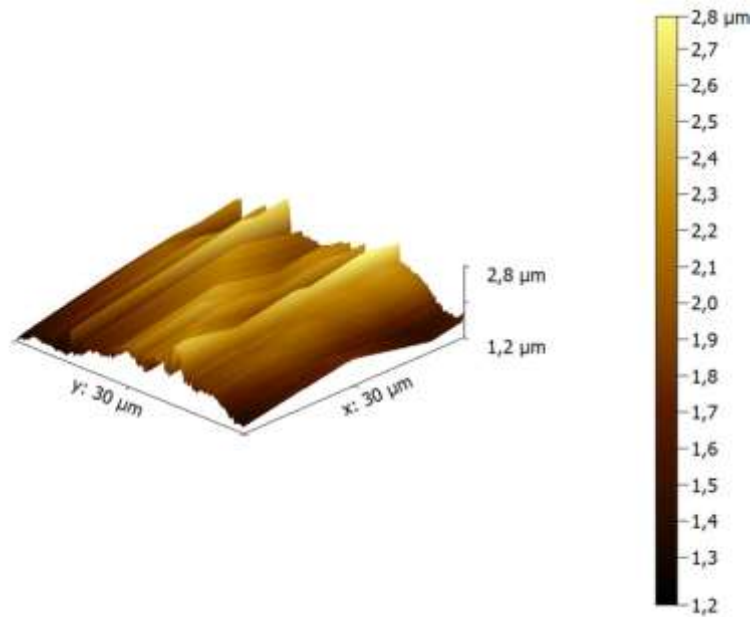
B

Figure 12 : Des images tridimensionnelles de la Microscopie à force atomique des nanoparticules d'argent (A) et de zinc (B).

D'après la Figure 12, A, qui présente les nanoparticules d'argent présent sous forme conique avec une taille allant de 30 à 50 nm.

Indique que les nanoparticules de zinc portent la forme pyramidal tandis que l'image (B) indique que les nanoparticules d'argent portent la forme conique.

3. Activité antibactérienne.

L'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent et de zinc biosynthétisées par la souche S26, contre différentes bactéries pathogènes de Gram positif et Gram négatif a été évaluée par la méthode de diffusion des puits sur milieu MH solide. Les résultats obtenus sont montrés dans le tableau 1 :

Tableau 1 : les zones d'inhibition d'activité antimicrobienne (en mm) des nanoparticules

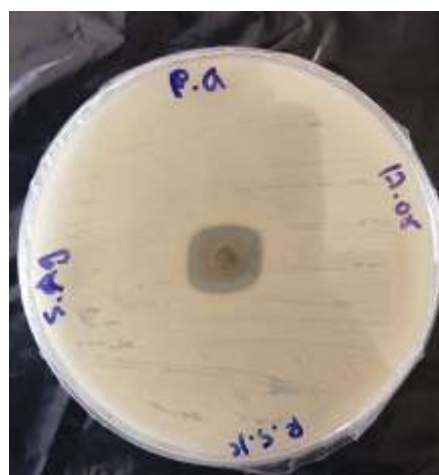
Les souches testées	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
AgNP Surnageant	17.5	12.5	–	12.5	11
AgNP Biomasse	11	16	–	10	13
ZnNP Biomasse	16.9	20.9	24.2	16.7	20.2

D'après les résultats du Tableau 1, une bonne activité contre toutes les bactéries testées utilisées, à l'exception de *K. pneumoniae*, a été signalé pour les nanoparticules d'argent préparé à partir de surnageant et de biomasse, avec des zones d'inhibition varient entre 10 mm contre *E. coli* pour les nanoparticules d'argent formé à partir de la biomasse, jusqu'au 17.5 mm contre *P. aeruginosa*, pour les nanoparticules d'argent formé à partir de surnageant (**Figure 13**). Tandis que les nanoparticules de zinc préparé à partir de la biomasse de la souche S26 ont montré une activité antimicrobienne contre toutes les bactéries testes utilisées, avec des zones d'inhibition varient entre 16.7 mm contre *E. coli*, jusqu'au 24.2mm contre *K. pneumoniae* (**Figure 13**).

La comparaison entre l'activité antimicrobienne des deux types de nanoparticules indique que les ZnNPs présentent une remarquable activité contre les bactéries testées utilisées, par rapport au AgNPs synthétisées à partir de surnageant ou de la biomasse de la souche S26, cette différence peut être attribuée à la différence de taille et de forme entre les différents types de nanoparticules. En effet, plus la taille des nanoparticules est petite plus l'activité est importante (**Azam et al .,2012**).



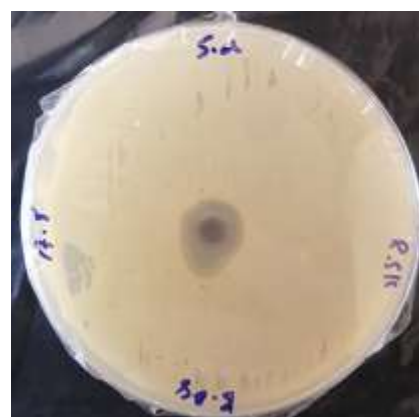
E.coli



P. aeruginosa



P. aeruginosa



S. aureus



K.pneumoniae



S.aureus

Figure 13 : Images des zones d'inhibition d'AgNPs de surnageant et biomasse et ZnNPs de biomasse

Le mode d'action et les mécanismes de l'activité antimicrobienne des nanoparticules sur les bactéries ne sont pas encore complètement connus. Les principaux mécanismes connus jusqu'au jour d'aujourd'hui, sont représenté dans la **Figure 14** :

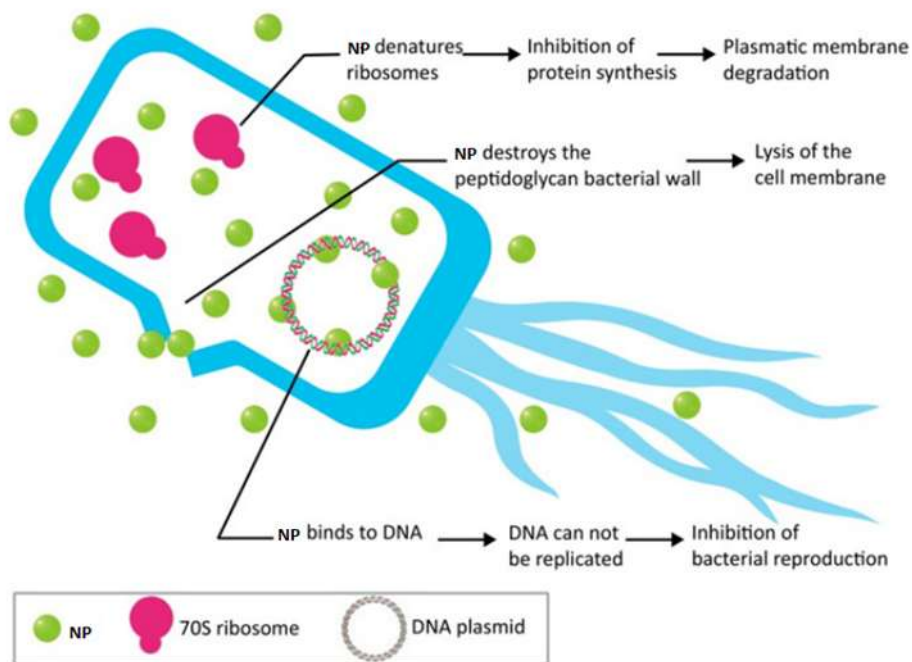


Figure 14 : Mécanismes de l'activité antibactérienne des nanoparticules (**Domenech.M et al ., 2013**)

Généralement, le principal effet antibactérien des NPs sur les bactéries est par induction d'une production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui provoque un état de stress oxydatif pour les bactéries, ce qui induit l'un des effets suivants, qui peuvent se produire simultanément ou séparément :

- (1) perturbation de la production d'ATP et de la réplication de l'ADN
- (2) interaction des NPs avec les protéines bactériennes, perturbant la synthèse protéique
- (3) Les NPs endommagent directement les membranes cellulaires, interagissant avec la paroi cellulaire du peptidoglycane et la membrane plasmique provoquant la lyse cellulaire.

En outre, sans tenir compte du mécanisme exact d'interaction, plusieurs travaux ont indiqué que les NPs pourraient augmenter la perméabilité de la membrane cellulaire et, par la suite, pénétrer à l'intérieur des cellules pour induire l'un ou l'ensemble des décrits précédemment (**Domenech.M et al ., 2013**).

4. Activité antibiofilm.

L'activité anti-biofilm de différents nanoparticules biosynthétisé par la souche S26 , a été déterminé par estimation du taux d'éradication de biofilm de 24 h formé par *K.pneumoniae*, les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 15**.

Les résultats montrent que les AgNPs synthétisé à partir la biomasse de la souche S26 sont plus efficaces que les ZnNPs, contre le biofilm de 24 heures de la souche *K.pneumoniae*, avec une bonne éradication visible qui induit une réduction de l'intensité de la couleur de cristal violet par comparaison avec le témoin positif (**Figure 15**). Par contre, les AgNPs de surnageant n'ont montré aucun effet visible sur le biofilm de *K.pneumoniae*.

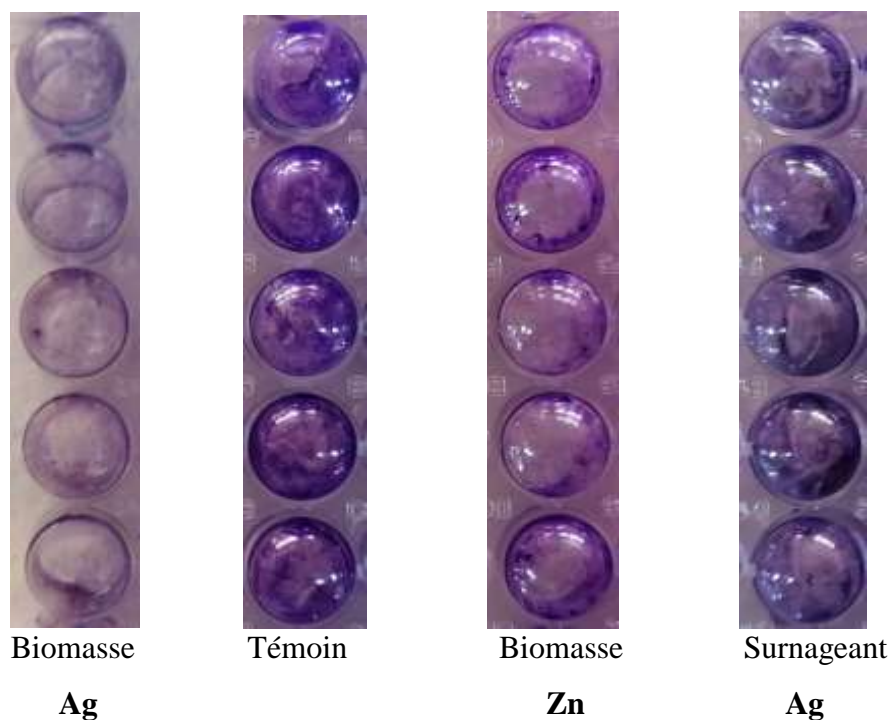


Figure 15 : Résultats d'activité des nanoparticules d'argent et de zinc contre le biofilm formé par *K.pneumoniae* sur la microplaque de 96 puits.

L'activité observée dans la **Figure 15**, a été confirmée par comparaison entre la moyenne des densités optiques, mesurées par spectrométrie UV-visible, dans les puits traités par les nanoparticules de zinc et d'argent, avec la moyenne des DO mesurée dans les puits témoins. Les résultats obtenus sont représentés dans la **Figure 16**.

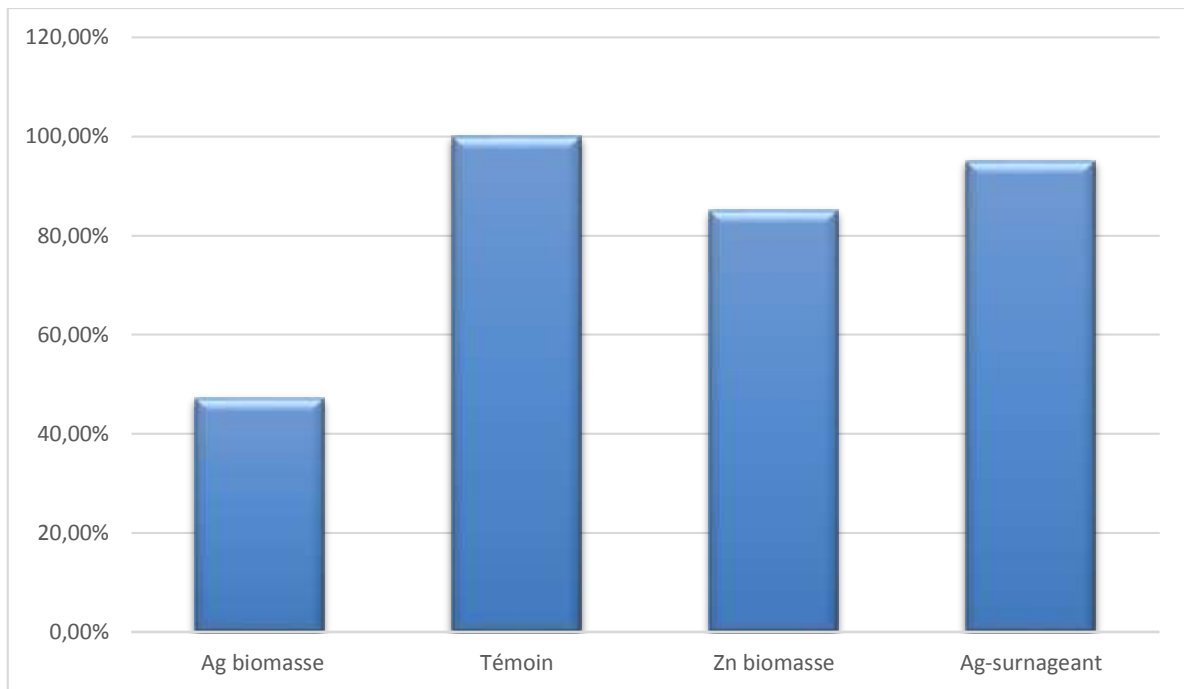


Figure 16 : L'activité antibiofilm des nanoparticules d'argent et de zinc contre le biofilm de *K. pneumoniae*.

D'après la **Figure 16**, un taux d'éradication fort de 53 % de biofilm de 24 h formé par *K. pneumoniae*, a été observé quand les puits sont traités par les nanoparticules d'argent de la biomasse, alors qu'une éradication faible de 15% et 5%, a été observé quand les puits sont traités par les nanoparticules d'argent biosynthétisé par le surnageant ainsi que les nanoparticules de zinc biosynthétisé par la biomasse de la souche S26, respectivement. (Siddique et al ., 2020) signalés l'efficacité des nanoparticules d'argent contre le biofilm formé par *K.pneumoniae*, ils ont réussi à éradiquer 74 % de biofilm formé par une souche de *K.pneumoniae*.

Conclusion

Les progrès significatifs dans le domaine de la nanotechnologie ont abouti à un procédé qui fait l'objet d'une attention considérable au cours de ces dernières décennies, et qui consiste à la synthèse verte des nanoparticules par l'utilisation de différentes sources biologiques naturelles dont les bactéries, les champignons, les actinomycètes, ainsi que les plants. Cette synthèse verte des nanoparticules prise l'avantage par rapport à la synthèse traditionnelle par voie physique ou chimique, parce qu'elle est rentable, moins coûteuse et non dangereuse pour l'environnement. Pour cela, notre travail vise à évaluer l'activité biologique, notamment l'activité antimicrobienne et antibiofilm, des nanoparticules métalliques d'argent et de zinc préparées à partir de la biomasse et le surnageant de la souche d'actinomycètes, S26, qui a été isolé à partir de la cote d'Ain Turk (Wilaya d'Oran).

La biosynthèse des nanoparticules de zinc et d'argent, a été vérifiée par un changement de couleur du jaune pâle au brun noir pour les nanoparticules d'argent et du jaune pâle au blanchâtre pour les nanoparticules de zinc. Ensuite la biosynthèse a été confirmée par spectrophotométrie UV-visible.

La caractérisation des nanoparticules biosynthétisées par la souche S26 a été entreprise en utilisant différentes techniques spectrales et microscopiques. En effet, la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) montre la présence de plusieurs groupements fonctionnels dus à des agents de coiffage, présents à la surface des nanoparticules et qui ont pour rôle de stabiliser et pour empêcher une excroissance et une agglomération supplémentaires et contrôler la forme et la taille des nanoparticules biosynthétisées. La microscopie à force atomique (AFM) a indiqué que les nanoparticules d'argent possèdent une forme conique, alors que les nanoparticules de zinc possèdent une forme pyramidale.

L'évaluation de l'activité antimicrobienne a indiqué que les nanoparticules de zinc préparées à partir de biomasse de la souche S26, présente une bonne activité antimicrobienne contre toutes les souches testées utilisées, alors que les nanoparticules d'argent préparées à partir de la biomasse et le surnageant de la souche S26 présentent une activité antimicrobienne moyenne à faible contre les bactéries testées utilisées.

Une bonne activité antibiofilm a été observée pour les nanoparticules d'argent préparé à partir de la biomasse de la souche S26 avec une éradication de (53%) du biofilm de 24 heures de la souche *Klebsiella pneumoniae*. Alors que les nanoparticules d'argent préparé à partir de surnageant ne présentent pas un effet éradicateur sur le biofilm formé par *Klebsiella pneumoniae*.

Cela indique que les nanoparticules de zinc et les nanoparticules d'argent biosynthétisées à partir de la biomasse de la souche S26, sont efficaces pour perturber rapidement l'architecture tridimensionnelle du biofilm de 24 h formé par *Klebsiella pneumoniae*.

Il apparaît clairement, d'après les résultats obtenus de ce travail, que les actinomycètes dont la souche S26 utilisé dans cette étude pour la synthèse des nanoparticules d'argent et de zinc, est considérée comme une bonne micro-nano-usine naturelle capable de réduire les sels métalliques due à son pouvoir de résistance aux métaux et de biosynthétiser des nanoparticules métalliques. Ainsi, ces nanoparticules présentent différentes activités biologiques surtout antimicrobienne et antibiofilm.

En perspective de cette étude il est suggéré de :

- Effectuer des tests d'activité antibactérienne et antibiofilm des nanoparticules sur d'autres souches microbiennes.
- Tester d'autres activités biologiques des nanoparticules synthétisées par la souche S26, dont l'activité anticancéreuse, antivirale, antiparasitaire... etc.
- Pensé à une incorporées des nanoparticules synthétisées par la souche S26 dans les produits de nettoyage utilisés dans les protocoles de CIP (clean in place), afin d'éradiquer les biofilms formés sur les surfaces et les canalisations d'usines.
- Les nanoparticules d'argent et de zinc, peuvent être utilisés comme nanoporteurs de médicaments, afin de permettre le transport des molécules bioactives jusqu'à leur ciblée, ce qui permet de limiter les effets indésirables et la toxicité des médicaments.

Références bibliographiques

1. Adiguzel, A. O., Adiguzel, S. K., Mazmanci, B., Tunçer, M., & Mazmanci, M. A. (2018). Silver nanoparticle biosynthesis from newly isolated streptomyces genus from soil. *Materials Research Express*, 5(4), 045402.
2. Awwad, A. M., Salem, N. M., & Abdeen, A. O. (2013). Green synthesis of silver nanoparticles using carob leaf extract and its antibacterial activity. *International journal of Industrial chemistry*, 4(1), 1-6.
3. Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., & Memic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *International journal of nanomedicine*, 7, 6003.
4. Baalousha, M., & Lead, J. R. (2013). Characterization of natural and manufactured nanoparticles by atomic force microscopy: Effect of analysis mode, environment and sample preparation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 419, 238-247.
5. Barani, M., Masoudi, M., Mashreghi, M., Makhdoumi, A., & Eshghi, H. (2021). Cell-free extract assisted synthesis of ZnO nanoparticles using aquatic bacterial strains: Biological activities and toxicological evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 606, 120878.
6. Barapatre, A., Aadil, K. R., & Jha, H. (2016). Synergistic antibacterial and antibiofilm activity of silver nanoparticles biosynthesized by lignin-degrading fungus. *Bioresources and Bioprocessing*, 3(1), 1-13.
7. Chang, C., Yu, X., Guo, W., Guo, C., Guo, X., Li, Q., & Zhu, Y. (2022). Bacteriophage-Mediated Control of Biofilm: A Promising New Dawn for the Future. *Frontiers in microbiology*, 13.
8. Domènech, B., Muñoz, M., Muraviev, D. N., & Macanás, J. (2013). Polymer-silver nanocomposites as antibacterial materials. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Badajoz: Formatex, 630-640.
9. Filipe, J. A., & Ferreira, M. A. M. (2021). Analysis of nanosciences and nanotechnology and their applications. *arXiv preprint arXiv:2111.03425*.

10. Ghabban, H., Alnomasy, S. F., Almohammed, H., Al Idriss, O. M., Rabea, S., & Eltahir, Y. (2022). Antibacterial, Cytotoxic, and Cellular Mechanisms of Green Synthesized Silver Nanoparticles against Some Cariogenic Bacteria (*Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*). *Journal of Nanomaterials*, 2022.
11. Gour, A., & Jain, N. K. (2019). Advances in green synthesis of nanoparticles. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 844-851.
12. Jayachandran, A., Aswathy, T. R., & Nair, A. S. (2021). Green synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles using *Cayratia pedata* leaf extract. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 100995.
13. Khalil, M. A., El-Shanshoury, A. E. R. R., Alghamdi, M. A., Alsalmi, F. A., Mohamed, S. F., Sun, J., & Ali, S. S. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles by Marine actinobacterium *Nocardiopsis dassonvillei* and exploring their therapeutic potentials. *Frontiers in Microbiology*, 12.
14. Khan, I., Saeed, K., & Khan, I. (2019). Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian journal of chemistry*, 12(7), 908-931.
15. Koul, B., Poonia, A. K., Yadav, D., & Jin, J. O. (2021). Microbe-mediated biosynthesis of nanoparticles: Applications and future prospects. *Biomolecules*, 11(6), 886.
16. Kumari, S., Tehri, N., Gahlaut, A., & Hooda, V. (2020). Actinomycetes mediated synthesis, characterization, and applications of metallic nanoparticles. *Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 51(10), 1386-1395.
17. Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010). Les sources de nanoparticules. *Revue française d'allergologie*, 50(3), 211-213.
18. LewisOscar, F., Vismaya, S., Arunkumar, M., Thajuddin, N., Dhanasekaran, D., & Nithya, C. (2016). Algal nanoparticles: synthesis and biotechnological potentials. *Algae-organisms for imminent biotechnology*, 7, 157-182.
19. Liu, X., Chen, J. L., Yang, W. Y., Qian, Y. C., Pan, J. Y., Zhu, C. N., ... & Zhang, D. P. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles with antimicrobial and anticancer properties using two

- novel yeasts. *Scientific Reports*, 11(1), 1-12.
20. Manimaran, M., & Kannabiran, K. (2017). Actinomycetes- mediated biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: progress and challenges. *Letters in applied microbiology*, 64(6), 401-408.
21. Mekonnen, G. (2021). Review on application of Nanotechnology in animal health and production. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 12, 559.
22. Mohd Yusof, H., Rahman, A., Mohamad, R., Zaidan, U. H., & Samsudin, A. A. (2020). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles by cell-biomass and supernatant of *Lactobacillus plantarum* TA4 and its antibacterial and biocompatibility properties. *Scientific reports*, 10(1), 1-13.
23. Mondal, A. H., Yadav, D., Mitra, S., & Mukhopadhyay, K. (2020). Biosynthesis of silver nanoparticles using culture supernatant of *Shewanella* sp. ARY1 and their antibacterial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 8295.
24. Otari, S. V., Patil, R. M., Ghosh, S. J., Thorat, N. D., & Pawar, S. H. (2015). Intracellular synthesis of silver nanoparticle by actinobacteria and its antimicrobial activity. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1175-1180.
25. O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (47), e2437.
26. Pal, G., Rai, P., & Pandey, A. (2019). Green synthesis of nanoparticles: A greener approach for a cleaner future. In *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles* (pp. 1-26). Elsevier.
27. Prakasham, R. S., Kumar, B. S., Kumar, Y. S., & Shankar, G. G. (2012). Characterization of silver nanoparticles synthesized by using marine isolate *Streptomyces albidoflavus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(5), 614-621.
28. Rajivgandhi, G., Gnanamangai, B. M., Prabha, T. H., Poornima, S., Maruthupandy, M., Alharbi, N. S., ... & Li, W. J. (2022). Biosynthesized zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using actinomycetes enhance the anti-bacterial efficacy against *K. Pneumoniae*. *Journal of King Saud University-Science*, 34(1), 101731.

Références bibliographiques

29. Roy, A., Bulut, O., Some, S., Mandal, A. K., & Yilmaz, M. D. (2019). Green synthesis of silver nanoparticles: biomolecule-nanoparticle organizations targeting antimicrobial activity. *RSC advances*, 9(5), 2673-2702.
30. Salem, S. S., & Fouda, A. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles and their prospective biotechnological applications: an overview. *Biological Trace Element Research*, 199(1), 344-370.
31. Sanjivkumar, M., Silambarasan, T., Ananthi, S., & ThangaTharani, K. (2022). Biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from an estuarine-associated actinobacterium *Streptomyces* spp. and its biotherapeutic applications. *Archives of Microbiology*, 204(1), 1-15.
32. Sholkamy, E. N., Ahamd, M. S., Yasser, M. M., & Eslam, N. (2019). Anti-microbiological activities of bio-synthesized silver Nano-stars by *Saccharopolyspora hirsuta*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(1), 195-200.
33. Siddique, M. H., Aslam, B., Imran, M., Ashraf, A., Nadeem, H., Hayat, S., ... & Muzammil, S. (2020). Effect of silver nanoparticles on biofilm formation and EPS production of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Biomed research international*, 2020.
34. Somasundaram, S., & Kumaravel, V. (2019). Application of Nanoparticles for Self-Cleaning Surfaces. In *Emerging Nanostructured Materials for Energy and Environmental Science* (pp. 471-498). Springer, Cham.
35. Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., & Xiangmin, L. (2021). Bacterial biofilm inhibition: A focused review on recent therapeutic strategies for combating the biofilm mediated infections. *Frontiers in Microbiology*, 12, 676458.
36. Vaseem, M., Lee, K. M., Shin, J. K., & Hahn, Y. B. (2012). Synthesis of ZnO nanoparticles and their ink-jetting behavior. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 12(3), 2380-2386.
37. Weeranantanapan, O., Chudapongse, N., Limphirat, W., & Nantapong, N. (2022). *Streptomyces chiangmaiensis* SSUT88A mediated green synthesis of silver nanoparticles: characterization and evaluation of antibacterial action against clinical drug-resistant strains. *RSC advances*, 12(7), 4336-4345.

Annexes



Aspect macroscopique de la souche S26 sur le milieu GYM



Culture de la souche S26 sur le milieu GYM liquide



Agitateur Shaker



Centrifugeuse



Spectrophotomètre

Milieux de cultures utilisés :

Muller Hinton (MH)

Composition de Muller Hinton :

- Infusion de viande 300 g
- Hydrolysate de caséine 17,5 g
- Amidon 1,5 g
- Agar 17 g
- Eau distillé 1 L
- pH 7,4

BHIB : Braine Heart InfusionBrouth

Composition de Braine Heart InfusionBrouth

- Peptone 10,0 g
- infusion de cervelle de veau 12,5g
- infusion de crue de bœuf 5,0 g
- glucose 2,0 g
- chlorure de sodium 5,0 g
- hydrogénophosphate de sodium 2,5 g
- Eau distillé 1 L
- pH 7,4

GYM: Glucose Yeast Medium

Composition de Gym liquide

- 10g d'extrait de malt
- 4 g de glucose
- 4 g d'extrait de levure
- 2 g de Cacao3
- Eau distillé 1 L
- pH=7,2