

## **Remerciements**

*Nous rendons grâce à ALLAH, l'omniscient, l'omnipotent, maitre des cieux et de la terre, de nous avoir comblé de ses faveurs et bienfaits nécessaires à la réalisation de ce modeste travail.*

*A notre directrice de mémoire,*

**Dr. Khallef Messaouda**

*Notre gratitude et reconnaissance éternel envers vous pour avoir accepté de veiller à coordination et la direction de ce travail. Merci infiniment pour vos précieux conseils, votre esprit critique, votre rigueur, et surtout votre gentillesse et votre patience tout au long de notre cursus jusqu'à la réalisation de ce travail. Ce fut un privilège de bénéficier de votre savoir.*

*Aux membres du jury,*

**Pr. Benouareth Djamel Eddine,**

**Dr. Boumaza Awatif.**

*Nous vous remercions chaleureusement d'avoir accepté d'examiner et juger ce travail. En dehors de cela, nous réitérons nos vifs remerciements pour les connaissances que vous nous avez transmises durant ces cinq années à travers les différents cours.*

*Nous vous en sommes sincèrement reconnaissants.*

*A Dr. Dardar Djafar, chef d'unité du laboratoire de Microbiologie de l'hôpital Ibn Zohr de Guelma, ainsi qu'à tous les membres de ce laboratoire, en particulier Mme. Menidjel Nadia,*

*Merci infiniment pour vos conseils précieux et votre disponibilité tout au long de ce travail.*

*A nos professeurs qui nous ont enrichis de leur connaissance en ne ménageant aucun effort dans la diffusion d'un enseignement de qualité.*

*Au personnel du laboratoire pédagogique ainsi qu'à l'ensemble du personnel de l'université de Guelma pour tout le travail effectué durant toutes ces années avec patience, nous vous disons grand merci.*

*A nos coéquipières, Mlle Cheraitia Bochra et Boumerdes Ines, ainsi qu'à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail, nous vous en sommes reconnaissants.*

**MERCI INFINIMENT A VOUS TOUS**



## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail tout d'abord à mes très chères parents, Aminata Coulibaly et Sadou Diallo, mes conseillers, ma raison de vivre, mes sources de force, d'inspiration, de courage et d'espoirs ; L'éducation que vous m'avez transmise, les valeurs que vous m'avez inculqué, vos innombrables sacrifices, vos soutiens et ses prières, font de moi aujourd'hui tout ce que je suis.*

*Puisse Allah vous accorder une très longue vie.*

*A mes oncles Mohamed Coulibaly, Youssouph Coulibaly et Diakaridia Coulibaly, plus qu'un Tuteur, vous êtes un père pour moi ;*

*Toutes mes réussites, je vous les dois.*

*A mon grand frère Amadou Diallo, celui qui ne s'est jamais lassé de m'encadrer, m'orienter et me prodiguer ses précieux conseils. Je te suis, à jamais reconnaissant.*

*A toute ma famille de Côte d'Ivoire et du Mali.*

*A tous les professeurs qui mon enseigne tout au long de mon cursus, sans qui je n'aurais jamais atteint ce niveau.*

*A toute la promotion 2014 ainsi qu'à tous les maliens de Guelma, pour leurs encouragements, dévouement et leur soutien inébranlable.*

*A tous mes amis de partout le monde, une très longue liste, je ne saurais citer de noms au risque d'en oublier, mais très particulièrement à ceux d'Algérie qui ont été un très grand soutien morale durant ces cinq années passées.*

*Soyez témoin de ma profonde gratitude.*

*Diallo Youssouf*

## DEDICACE

Je dédie ce mémoire à :

Mes merveilleuses mamans

TATA~T, AMI~T, KADIA~T, HAYA~T

les personnes les plus importantes de ma vie,

mes anges gardiennes qui ont été omniprésentes

avec moi tout au long de mon existence en m'apportant

leur amour inconditionnel et inestimable, leurs bénédictions,

leur soutien indéfectible et mon papa qui a consentis

à trop d'efforts dans le cadre de mes études

pendant tous ces années.

A tous mes frères et sœurs pour les soutiens

et accompagnement dans ce cadre, notamment mon grand frère

MAMOUTOU~S qui a été d'une grande aide et m'a pris

sous ses ailes durant une grande partie de mes études.

A tous les membres de ma familles, mes amis (es), la promotion

2014, mes collègues etc... ça a été un réel plaisir de vous avoir et

d'avoir vécu cette immense et important moment avec vous.

A tous les Maliens et Africains où qu'ils soient qui lutte matin,

midi et soir pour la liberté, la paix, la prospérité et la dignité

de son continent et de ces frères et sœurs.

A vous tous qui avez et qui auront une place importante

dans mon cœur et ma vie.

**SÉKOU KANTÉ**

## Sommaire

|   |      |
|---|------|
| Remerciements .....   | I    |
| Dédicace .....  | II   |
| Liste des Figures .....   | VIII |
| Liste des tableaux.....   | IX   |
| Liste des abréviations.....   | X    |
| Introduction : .....  | 1    |
| Revue bibliographique   |      |
| Chapitre 1: Problématique de la résistance bactérienne                      |      |
| 1. Rappels sur le mécanisme antimicrobien des antibiotiques :.....          | 3    |
| 1.1 Définition : .....  | 3    |
| 1.2 Modes d'action des principaux antibiotiques : .....                     | 3    |
| 2. Généralités sur la résistance bactérienne :.....                         | 4    |
| 2.1 Définitions de la résistance aux antibiotiques : .....                  | 5    |
| 2.2 Origines de la résistance bactérienne aux antibiotiques : .....         | 5    |
| 2.3 Types de résistance : .....   | 7    |
| 2.3.1 La résistance naturelle ou intrinsèque :.....                         | 7    |
| 2.3.2 Résistance acquise : .....  | 8    |
| 2.3.3 La résistance croisée : .....   | 8    |
| 2.3.4 La Co-résistance : .....  | 9    |
| 2.4 Mécanismes biochimiques de la résistance :.....                         | 9    |
| 2.5 Facteurs contribuant à l'émergence de la résistance bactérienne : ..... | 10   |
| 3. Les bactéries multi-résistantes (BMR) :.....                             | 11   |
| 3.1 Définition : .....  | 11   |
| 3.2 Les types de bactéries multi-résistantes : .....                        | 12   |
| 3.2.1 Les BMR hospitalières :.....  | 12   |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.2.2 | Les BMR Communautaires :.....                                | 14 |
| 3.3   | Conséquences de la multi-résistance aux antibiotiques :..... | 14 |
| 3.3.1 | Conséquences individuelles : .....                           | 14 |
| 3.3.2 | Conséquences collectives :.....                              | 15 |

## Chapitre 2: Perspectives d'usage thérapeutique des nanoparticules d'argent

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Généralités sur les nanoparticules : .....                              | 16 |
| 1.1   | Définition : .....  | 16 |
| 1.2   | Origine des nanoparticules :.....                                       | 16 |
| 1.3   | Formes et classification des nanoparticules : .....                     | 17 |
| 1.4   | Propriétés des nanoparticules : .....                                   | 17 |
| 1.5   | Applications des nanoparticules d'argents :.....                        | 17 |
| 1.6   | Méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent : .....                 | 19 |
| 1.6.1 | Approche descendante « Top-down » : .....                               | 19 |
| 1.6.2 | Approche ascendante « Bottom-up » :.....                                | 19 |
| 1.6.3 | Synthèse verte ou biologique: .....                                     | 19 |
| 2.    | Effets antimicrobiens des nanoparticules d'argent :.....                | 20 |
| 2.1   | Mécanismes de pénétration des nanoparticules:.....                      | 21 |
| 2.2   | Mécanisme d'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent :..... | 22 |
| 3.    | Les effets «Zombies» des nanoparticules d'argent:.....                  | 23 |
| 4.    | Activité mutagène des nanoparticules d'argent:.....                     | 25 |

## Partie 2 : Expérimentation

### Matériel et Méthodes

|     |  |    |
|-----|--|----|
| 1.  | Modèle expérimental : .....                  | 26 |
| 1.1 | Souches de référence : .....                 | 26 |
| 1.2 | Souches cliniques pathogènes: .....          | 26 |
| 2.  | Matériel chimique :.....                     | 26 |
| 3.  | Synthèse des nanoparticules d'argent : ..... | 27 |

|   |    |
|---|----|
| 4. Repiquages des souches bactériennes :.....                                       | 28 |
| 5. Antibiogramme :.....   | 28 |
| 5.1 Principe : .....  | 29 |
| 5.1.1 Préparation de la suspension bactérienne :.....                               | 29 |
| 5.1.2 Ensemencement :.....  | 29 |
| 5.1.3 Application des disques d'antibiotique :.....                                 | 29 |
| 6. Etudes de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent :.....          | 30 |
| 6.1 La méthode de diffusion en milieu gélosé : .....                                | 30 |
| 6.1.1 Principe : .....  | 30 |
| 6.1.2 Préparation des disques :.....  | 30 |
| 6.1.3 Caractérisation des nanoparticules d'argent :.....                            | 30 |
| 6.1.4 Diffusion des différentes concentrations de nanoparticules : .....            | 31 |
| 6.1.5 Analyse statistique :.....  | 31 |
| 6.2 Association antibiotique-nanoparticules d'argent :.....                         | 31 |
| 6.2.1 Méthode : .....   | 32 |
| 6.2.2 Evaluation de l'accroissement de la zone d'inhibition :.....                  | 32 |
| 6.3 Détermination de l'activité antibactérienne des AgNps en milieu liquide : ..... | 32 |
| 6.3.1 Technique :.....  | 32 |
| 6.3.2 Evaluation de l'indice d'inhibition :.....                                    | 33 |

## Résultats et Discussion

|  |    |
|--|----|
| Résultats :.....                                       | 34 |
| 1. Antibiogramme :.....                                | 34 |
| 2. Etude de l'activité antimicrobienne :.....          | 35 |
| 2.1 Caractérisation des nanoparticules d'argent :..... | 35 |
| 2.2 Diffusion en milieu gélosé : .....                 | 36 |
| 2.3 Effets combinés de l'association ATB-AgNps :.....  | 40 |
| 2.4 Activité antibactérienne en milieu liquide : ..... | 42 |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Discussion : .....                 | 44 |
| Conclusion et perspectives : ..... | 49 |
| Références bibliographiques .....  | 50 |
| Annexe .....                       | A  |
| Résumé                             |    |
| Abstract                           |    |
| المخلص                             |    |

## Liste des Figures

| Titre  | Page |
|--|------|
| <b>Figure 1</b> : La cellule bactérienne et sites d'action des antibiotiques.....  | 4    |
| <b>Figure 2</b> : Différentes voies d'acquisition de gènes de résistance<br>aux antibiotiques chez les bactéries.....  | 6    |
| <b>Figure 3</b> : Effet de la pression de sélection des antibiotiques sur<br>la composition de la flore bactérienne.....   | 7    |
| <b>Figure 4</b> : Exemples des mécanismes de résistance aux antibiotiques .....  | 10   |
| <b>Figure 5</b> : Echelle nanométrique.....  | 16   |
| <b>Figure 6</b> : Représentation schématique des deux grandes<br>approches de synthèse de nanoparticules.....  | 20   |
| <b>Figure 7</b> : Organisation de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif.....   | 22   |
| <b>Figure 8</b> : Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries...  | 22   |
| <b>Figure 9</b> : Mécanismes de l'activité antimicrobienne des nanoparticules.....   | 23   |
| <b>Figure 10</b> : Vue d'ensemble sur l'expérience des effets zombies.....   | 24   |
| <b>Figure 11</b> : Effet bactéricide de cellules <i>P. aeruginosa</i> , traitées avec des<br>concentrations croissantes d'AgNps, envers de nouvelles cellules viables..... | 24   |
| <b>Figure 12</b> : Technique de préparation des nanoparticules d'argent.....   | 27   |
| <b>Figure 13</b> : Principe de la méthode de diffusion par disque.....   | 31   |
| <b>Figure 14</b> : Histogramme illustrant l'effet caractéristique des nanoparticules d'argent.....   | 36   |
| <b>Figure 15</b> : Histogramme des zones d'inhibition autour des disques imbibés d'AgNps.....  | 37   |
| <b>Figure 16</b> : Illustrations de l'effet des disques imbibés de différentes<br>concentrations d'AgNps.....  | 39   |
| <b>Figure 17</b> : Illustrations de l'effet combiné de l'association ATB-AgNps.....  | 41   |
| <b>Figure 18</b> : Illustrations de la CMI des différentes souches testées en milieu liquide.....  | 42   |



## Liste des tableaux

| Titre   | Page |
|---|------|
| <b>Tableau 1</b> : Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques.....                            | 11   |
| <b>Tableau 2</b> : Domaines d'application de produits contenant des AgNps.....                            | 18   |
| <b>Tableau 3</b> : Méthodes de synthèse des nanoparticules.....   | 20   |
| <b>Tableau 4</b> : Souches cliniques pathogènes étudiées.....   | 26   |
| <b>Tableau 5</b> : Liste des antibiotiques utilisés et leur charge .....                                  | 28   |
| <b>Tableau 6</b> : Antibiogramme des souches à Gram négatif entérobactéries.....                          | 34   |
| <b>Tableau 7</b> : Antibiogramme des souches <i>Pseudomonas</i> .....                                     | 34   |
| <b>Tableau 8</b> : Antibiogramme des souches <i>Staphylococcus</i> .....                                  | 35   |
| <b>Tableau 9</b> : Statistique descriptive.....   | 37   |
| <b>Tableau 10</b> : Effet des antibiotiques associés aux AgNps vis-à-vis<br>des souches cliniques.....    | 40   |
| <b>Tableau 11</b> : Effet des antibiotiques associés aux AgNps vis-à-vis<br>des souches de référence..... | 40   |
| <b>Tableau 12</b> : Indice d'inhibition des différentes concentrations d'AgNps.....                       | 43   |

## Liste des abréviations

**%** : Pourcentage

**° C** : Degré Celsius

**ADN** : Acide Désoxyribose Nucléoside

**Ag** : Argent

**Au** : Or

**Ag<sup>+</sup>** : Ions argent

**AgNps** : Nanoparticules d'Argent

**AK** : Amikacine

**Al** : Aluminium

**AMC** : Amoxicilline + acide clavulanique (Amoxiclav)

**AMX** : Amoxicilline

**ATCC** : American type culture collection

**ATB** : Antibiotique

**ATP** : Adénosine Triphosphate

**BHRe** : Bactéries Hautement Résistantes Emergentes

**BMR** : Bactéries multi-résistantes

**CA-SFM** : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

**CAZ** : Ceftazidine

**CdS** : Sulfure de cadmium

**CMI** : Concentration Minimale Inhibitrice

**Co** : Cobalt

**Cu** : Cuivre

**CZ** : Céfazoline

**DOX** : Doxycilline

**E** : Erythromycine

**EBLSE** : Entérobactéries Productrices de  $\beta$ -lactamases à Spectre Etendu

**EPC** : Entérobactéries Productrices de Carbapénémases

**ERG** : Entérocoques Résistants aux Glycopeptides

**ERO** : Espèces Réactives d'Oxygène

**ERV** : Entérocoques Résistants à la Vancomycine

**Fe** : Fer

**GEN**: Gentamicine

**IN**: Infections Nosocomiales

**K**: Kanamycine

**MH**: Muller Hilton

**mm** : Millimètre

**mM** : Millimolaire

**Ni** : Nickel

**NIT** : Nitrofuranes

**NP** : Nanoparticules

**OF** : Ofloxacin

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**P** : Pénicilline

**PLP** : Protéines de Liaison aux Pénicillines

**UV** : Ultra-Violet

**R** : Résistance

**ROS** : Espèces Réactives de l'Oxygène

**S** : Sensible

**SARM** : *Staphylococcus Aureus* Résistant à la Méricilline

**ZnO** : Oxyde de zinc

**ZnS** : Sulfure de zinc

**(\*)** : Non testé

# Introduction

**Introduction :**

Les agents antimicrobiens (en particulier les antibiotiques) ont joué un rôle indispensable dans la santé humaine au cours des 50 dernières années. Depuis la découverte fortuite de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, de nombreuses molécules d'antibiotiques ont été développées et commercialisées. Ces découvertes ont révolutionné les thérapies conventionnelles en offrant un remède simple à un certain nombre de maladies infectieuses graves, qui étaient autrefois la principale cause de décès (**Rai et al., 2016**).

Cependant après une période de forte efficacité contre les maladies infectieuses, les antibiotiques se présentent de moins en moins efficaces face à certaines infections bactériennes (**Abraham et Chain, 1940**). La production généralisée et la consommation abusive d'antibiotiques ont contribué à l'émergence de bactéries multi-résistantes (BMR) responsables de l'augmentation des frais médicaux, du taux de mortalité et de la durée du séjour des patients. Au cours de la dernière décennie, ce phénomène est devenu une préoccupation majeure en santé publique mondiale (**Cavassin et al., 2015**). Plus de 70% des infections nosocomiales sont causées par les BMR (**Quinteros et al., 2016**).

Compte tenu de ces faits, de nombreux chercheurs ont mené des expériences pour mettre au point de nouveaux médicaments antimicrobiens puissants, efficace et moins coûteux afin de contrôler les agents pathogènes résistants (**Lara et al., 2011**).

De nos jours, les progrès de la nanotechnologie ont ouvert la voie en offrant l'opportunité d'utiliser les nanoparticules métalliques comme moyen efficace de contrôler ces microbes pathogènes impliqués dans les maladies infectieuses (**Li et al., 2011**). Parmi les nanomatériaux prometteurs, les nanoparticules d'argent (AgNps) jouent un rôle essentiel de par leurs propriétés antibactériennes. Par ailleurs, plusieurs questions restent en suspens compte tenu de leur utilisation comme une nouvelle génération d'agents antimicrobiens pour le traitement et la prévention des micro-organismes multi-résistants (**Rai et al., 2016**).

Dans cette optique, notre travail vise à étudier l'activité antibactérienne des AgNps, leur combinaison avec les antibiotiques usuels et à déterminer si cette activité est de large spectre et potentiellement significative pour éradiquer ce problème de multi-résistance.

Pour ce faire, nous procéderons d'abord par une détermination des effets antibactériens des AgNps utilisées seules et en combinaison avec les antibiotiques en milieu solide gélosé puis nous étudierons leurs effets de manière approfondie en milieu liquide.

Ce présent document est structuré en trois parties : la première constitue la recherche bibliographique qui est composée de deux chapitres dans lesquels nous évoquerons d'abord les problématiques liées à la multi-résistance aux antibiotiques, les mécanismes de résistance ainsi que les différentes souches bactériennes susceptibles d'induire une multi-résistance aux antibiotiques, puis nous mettront en lumière les perspectives d'usage thérapeutique des nanoparticules d'argent comme agent antibactérien, leurs avantages par rapport aux agents usuels et leur mécanismes d'action contre les bactéries. Dans la seconde, nous décrirons les différentes méthodes suivies et le matériel utilisé tout au long de ce travail. La troisième partie sera consacrée à la présentation des principaux résultats obtenus et leur discussion.

Enfin nous ferons une conclusion générale de ce travail et présenterons quelques perspectives pour les prochaines études semblables.

En espérant que ce travail vous donne satisfaction, nous vous souhaitons une excellente lecture émaillée de découvertes fascinantes et passionnantes.

**Partie 1**

***Revue bibliographique***





## **Chapitre 1**

### ***Problématique de la résistance bactérienne***

## 1 Rappels sur le mécanisme antimicrobien des antibiotiques :

### 1.1 Définition :

Les molécules antimicrobiennes les plus utilisées dans le domaine médical sont les composés communément appelés « antibiotiques » (Kohanski et al., 2010).

Un antibiotique est une molécule qui peut être d'origine biologique, produite par des microorganismes (bactéries, champignons) ou de synthèse chimique. Il pourra soit inhiber la multiplication bactérienne, on parle alors d'activité bactériostatique, soit entraîner la mort de la cellule bactérienne, on parle alors d'activité bactéricide (Deredjian, 2010).

La caractéristique principale des antibiotiques est leur grande spécificité d'action car ils agissent sur des cibles cellulaires structurales ou métaboliques spécifiques des procaryotes. Cette caractéristique leur permet d'être efficace à de faibles concentrations et d'être, la plupart du temps, non toxiques pour les espèces animales : c'est le principe de la toxicité sélective. Il reste, cependant, les risques de réactions allergiques et, la grande similitude entre les cellules procaryotes et les mitochondries des cellules eucaryotes qui est à l'origine d'une grande toxicité de certains antibiotiques pour les espèces animales (exemple du chloramphénicol) (Targant, 2010).

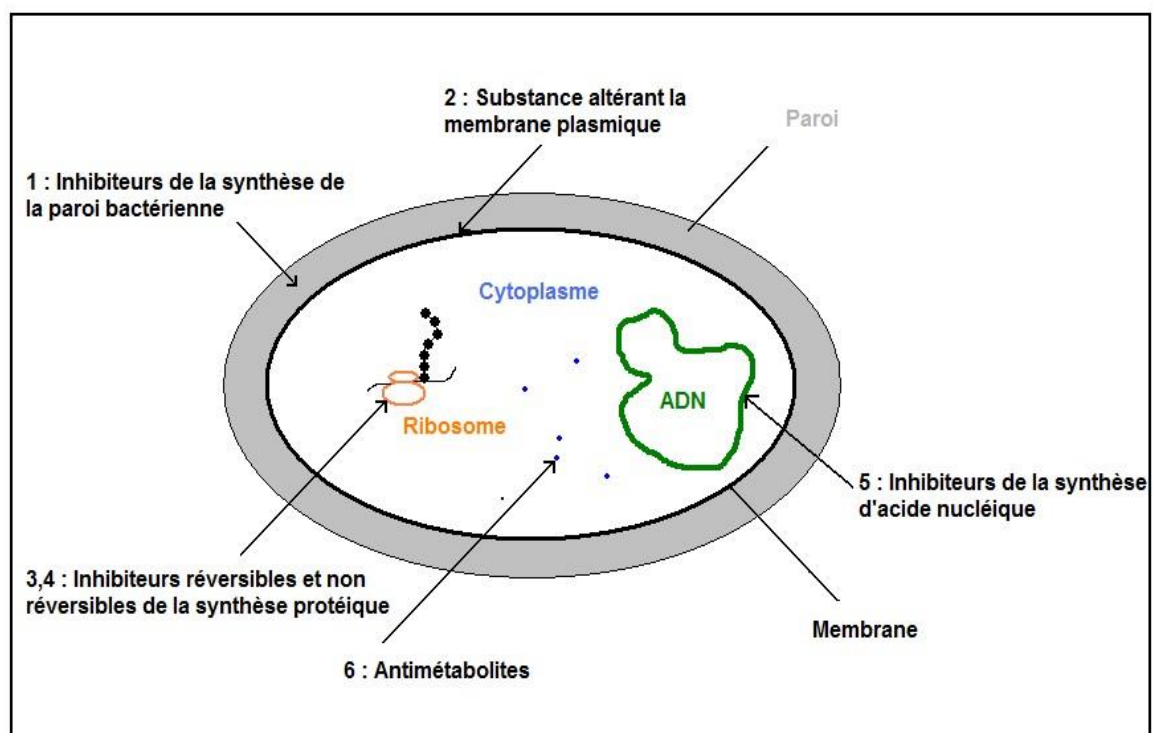
Les antibiotiques peuvent être classés comme à large spectre, ce qui signifie qu'ils sont actifs contre un large éventail de bactéries ou à spectre étroit, ce qui signifie qu'ils sont efficaces contre un nombre limité de bactéries (Padget, 2016).

### 1.2 Modes d'action des principaux antibiotiques :

Un grand nombre d'antibiotiques différents existent avec divers mécanismes d'action. Très largement répandus depuis le XXe siècle, leur stratégie d'action repose principalement sur l'inhibition de la croissance bactérienne (Mutschler, 2017), en détériorant la paroi ou la membrane cytoplasmique de la bactérie, en empêchant la synthèse des protéines ou la réplication de l'ADN (Fig. 1). Pour ce faire les antibiotiques ont été classés en six grandes classes d'agents antimicrobiens:

- **Inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire** : pénicillines et céphalosporines, cyclosérine, vancomycine, bacitracine, imidazole et dérivés.
- **Substances altérant la membrane plasmique** : polymixines et colistiméthate (détergents), polyène (nystatine et amphotéricine B).

- **Inhibiteurs réversibles de la traduction (action sur sous-unités ribosomales 30S et 50S) :** chloramphénicol, florfénicol, tétracyclines, érythromycine, clindamycine.
- **Inhibiteurs non réversibles de la traduction (par liaison à la sous-unité 30S) :** aminoglycosides (néomycine, kanamycine, gentamicine, streptomycine, spectinomycine).
- **Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (réplication et transcription) :** rifampicines, quinolones.
- **Anti-métabolites (blocage de certaines étapes du métabolisme énergétique) :** triméthoprime, sulfamides (Targant, 2010).



**Figure 1 :** La cellule bactérienne et sites d'action des antibiotiques.

Source : (Targant, 2010).

## 2 Généralités sur la résistance bactérienne :

Depuis les débuts de l'utilisation des antibiotiques, les bactéries n'ont cessé de développer différentes stratégies de résistance. Pour chaque nouvelle classe d'antibiotiques développée et commercialisée, des souches bactériennes résistantes ont émergé. Ce phénomène a été amplifié par l'utilisation abusive des antibiotiques depuis un demi-siècle. En effet, des consommations élevées et un mésusage de ces molécules sont à l'origine de l'émergence et de la diffusion de résistances (Muller, 2017).

En Avril 2014, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a signalé des niveaux élevés de résistance bactérienne à travers le monde, y compris dans les pays à revenu élevé et à revenu faible [1]. Le rapport met l'accent sur la résistance aux antibiotiques chez sept espèces bactériennes responsables d'infections graves. Ces bactéries multi-résistantes ont été détectées à l'intérieur et à l'extérieur des établissements hospitaliers et incluent d'importants agents pathogènes tels que les entérobactéries productrices de carbapénémase et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (Padget, 2016).

## 2.1 Définitions de la résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques est définie comme la capacité acquise d'un microorganisme à résister à l'action inhibitrice d'antibiotiques auxquelles l'espèce est généralement sensible (Debabza, 2015). On peut dire aussi qu'une souche est résistante lorsqu'elle peut supporter une concentration d'antibiotiques beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce [2].

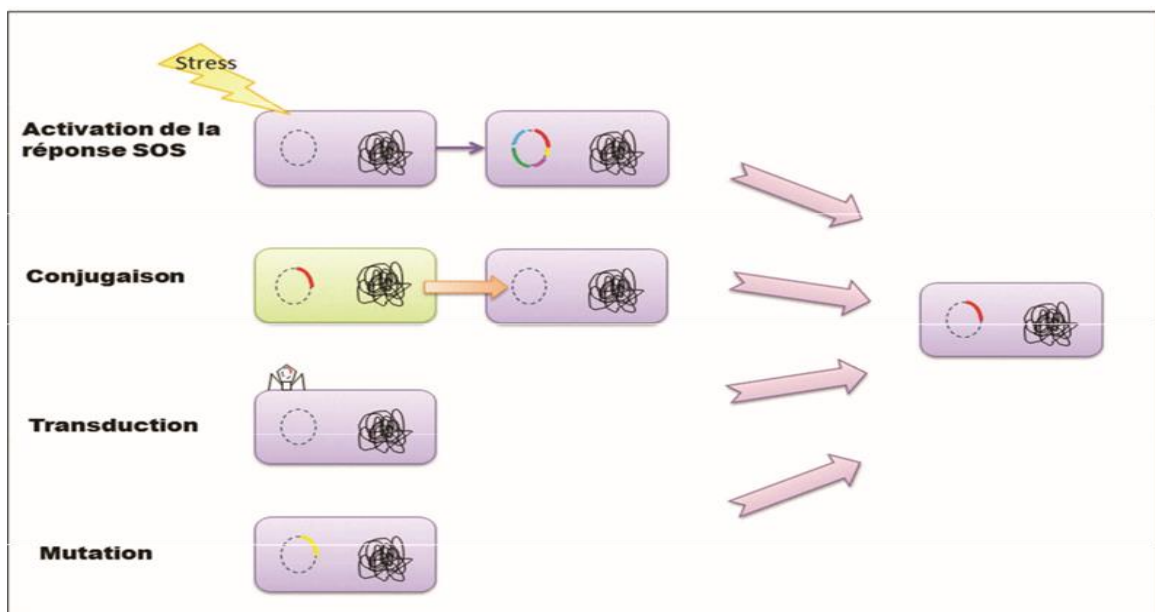
La résistance bactérienne résulte toujours de l'incapacité de l'antibiotique à agir sur sa cible, du fait de la réaction des bactéries vis à vis de l'antibiotique, exprimée par divers mécanismes (Debabza, 2015).

## 2.2 Origines de la résistance bactérienne aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques bactériens n'est pas un phénomène récent. Les microorganismes se font constamment concurrence pour l'espace et la nourriture et ont mis au point un certain nombre de mécanismes pour contribuer à leur survie. Ces mécanismes incluent la production d'antibiotiques pour tuer ou ralentir la croissance d'organismes concurrents, notamment de bactéries. Afin de contrer ces antibiotiques, les bactéries reposent sur une activation et un échange efficaces des gènes, y compris des gènes de résistance aux antibiotiques. Au fil des siècles, cette lutte continue a abouti à la constitution d'un réservoir profond de gènes résistants aux antibiotiques, auxquels les bactéries peuvent accéder si nécessaire. La forte utilisation d'antibiotiques par les humains en médecine humaine et animale au cours des 70 dernières années a créé une pression de sélection importante pour que les bactéries développent une résistance et a considérablement accéléré l'accès de cette collection globale de gènes de résistance ou « résistomes antimicrobiens », ce qui a entraîné les niveaux élevés de résistance observés aujourd'hui (Padget, 2016). L'apparition d'un gène de résistance chez une bactérie peut résulter de plusieurs mécanismes (Fig. 2) :

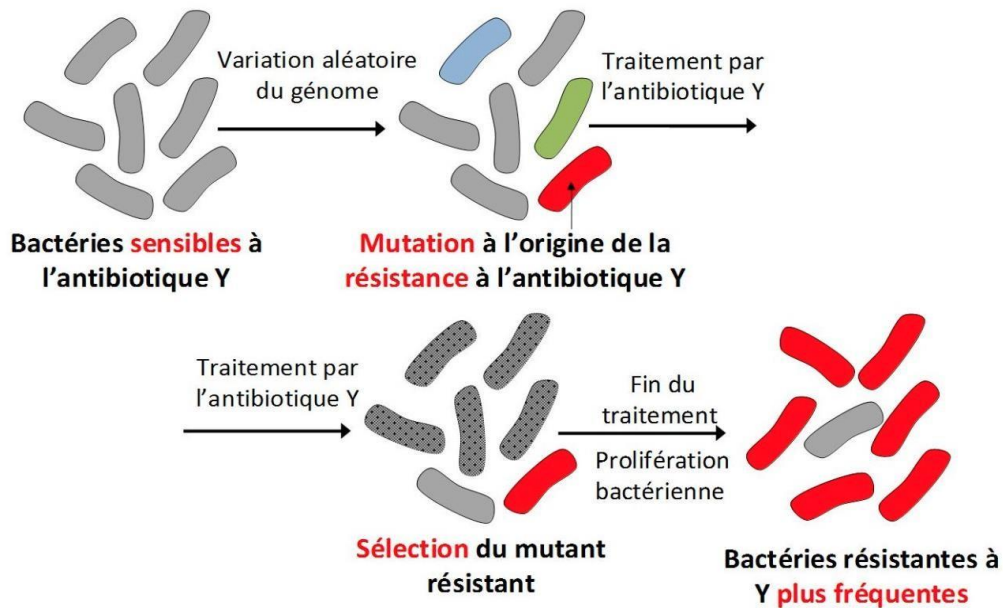
- ❖ Mutations sur des gènes chromosomiques, spontanées ou induites :
  - Mutations spontanées : c'est un changement spontané, rare et héréditaire, qui va affecter la séquence nucléotidique du génome bactérien ;
  - Mutations induites : adaptation d'une bactérie à des conditions défavorables à sa croissance (notamment présence d'antibiotiques) ;
- ❖ Acquisition de gènes de résistance provenant d'autres souches :
  - Par conjugaison : un gène est transféré d'une bactérie à une autre via des plasmides ou des transposons (transfert inter-espèce, souvent à partir de bactéries non pathogènes de l'environnement) ;
  - Par transduction : un gène est transféré d'une bactérie à une autre via un bactériophage (transfert intra-espèce) ;
  - Par transformation : transfert d'ADN nu entre deux bactéries (transfert intra- ou inter-espèce) (**Muller, 2017**).

La réponse SOS est un mécanisme de régulation permettant l'adaptation et l'évolution des bactéries stressées par des conditions environnementales défavorables à leur croissance (antibiotiques, UV, etc.). L'activation de la réponse SOS augmente la fréquence d'émergence de mutants résistants aux antibiotiques par plusieurs mécanismes : augmentation de la fréquence de mutation, accélération du transfert de gènes de résistance entre les bactéries et du réarrangement des gènes cassettes portés par les intégrons et augmentation de l'expression de certains mécanismes de résistance aux antibiotiques (**Bouvier-Slekovec, 2013**).



**Figure 2 :** Différentes voies d'acquisition de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Source (**Bouvier-Slekovec, 2013**).

Une fois la résistance apparue, la pression de sélection des antibiotiques va jouer un rôle important en sélectionnant les bactéries résistantes. En effet, au sein d'une flore bactérienne essentiellement sensible à un antibiotique administré (flore intestinale notamment), cet antibiotique va avoir une action inhibitrice sur les bactéries sensibles de la flore commensale, entraînant leur disparition transitoire, et laissant alors de la place aux souches ayant acquis le gène de résistance, permettant ainsi leur croissance (**Fig. 3**) (Muller, 2017).



**Figure 3** : Effet de la pression de sélection des antibiotiques sur la composition de la flore bactérienne. Source (Muller, 2017).

### 2.3 Types de résistance :

La résistance bactérienne à un ATB est d'origine génétique. On distingue deux types de résistance bactérienne : La résistance naturelle ou intrinsèque et la résistance acquise.

#### 2.3.1 La résistance naturelle ou intrinsèque :

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'ATB afin de déterminer son activité et contribue à définir son spectre antibactérien. Cette résistance peut être due à l'inaccessibilité de la cible ou encore son absence pour l'ATB. La résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique (Dali, 2015).

Ainsi, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois, présentent une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (Normak et Normak, 2002).

### 2.3.2 Résistance acquise :

Plus inquiétante, la résistance acquise entraîne la résistance à un ou plusieurs antibiotiques auxquels la bactérie était sensible auparavant. Cette résistance est souvent instable et peut survenir via une mutation (directement sur le chromosome bactérien) ou plus fréquemment par acquisition de matériel génétique mobile (plasmide, transposon, intégron..) permettant dans les deux cas de contourner l'effet délétère de l'antibiotique (Coustès, 2016).

#### 2.3.2.1 Résistances par mutation chromosomique spontanée (évolution verticale)

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux ATB chez environ 10 à 20% des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Cette mutation n'affecte qu'un caractère et la résistance ne concerne généralement qu'un ATB ou qu'une famille d'ATB ayant le même mécanisme d'action (Yamashita et al., 2000).

#### 2.3.2.2 Résistances extra-chromosomiques (évolution horizontale)

Les résistances extra-chromosomiques sont fréquentes (plus de 80% des résistances acquises), et contagieuses. Les supports de ces résistances peuvent être des plasmides qualifiés plasmides R (R: résistance) ou des transposons acquis par conjugaison ou plus rarement par transduction. Ces résistances se transmettent horizontalement entre bactéries cohabitant, même d'espèces différentes. Du fait que les plasmides R codent le plus souvent pour plusieurs résistances aux antibiotiques, appartenant à des familles différentes, leur acquisition confère une résistance multiple qui pose de grands problèmes dans l'utilisation thérapeutique des antibiotiques (Debabza, 2015).

### 2.3.3 La résistance croisée :

La résistance croisée correspond à l'acquisition de résistances à d'autres membres d'une classe d'antibiotiques présentant des mécanismes d'action similaires à l'antibiotique de cette même classe contre lequel la bactérie était déjà résistante. La conséquence de cette

résistance est la sélection croisée. Cela implique que n'importe quel antibiotique de la classe peut sélectionner, dans le milieu, des bactéries résistantes à tous les autres antibiotiques de cette classe alors même qu'elles n'ont jamais été exposées à ces molécules. On peut prendre l'exemple des bêta-lactamases à spectre étendu (BLSE) qui confèrent une résistance croisée aux bêta-lactamines et aux céphalosporines (Neely et Holder, 1999 ; Coustès, 2016).

#### 2.3.4 La Co-résistance :

La Co-résistance correspond à l'acquisition de résistances à plusieurs antibiotiques de classes différentes. Cela est principalement dû au fait que les plasmides échangés sont généralement porteurs de plusieurs résistances. C'est le cas de la co-résistance d'*E. coli* aux céphalosporines, pénicillines, au chloramphénicol, aux tétracyclines et aux fluoroquinolones. De la même manière que pour la sélection croisée, l'utilisation d'un antibiotique auquel la bactérie résiste va permettre la co-sélection de toutes les résistances portées par le même plasmide (Neely et Holder, 1999 ; Coustès, 2016).

#### 2.4 Mécanismes biochimiques de la résistance :

Trois grands mécanismes permettent aux bactéries de résister face à un ATB (Fig. 4).

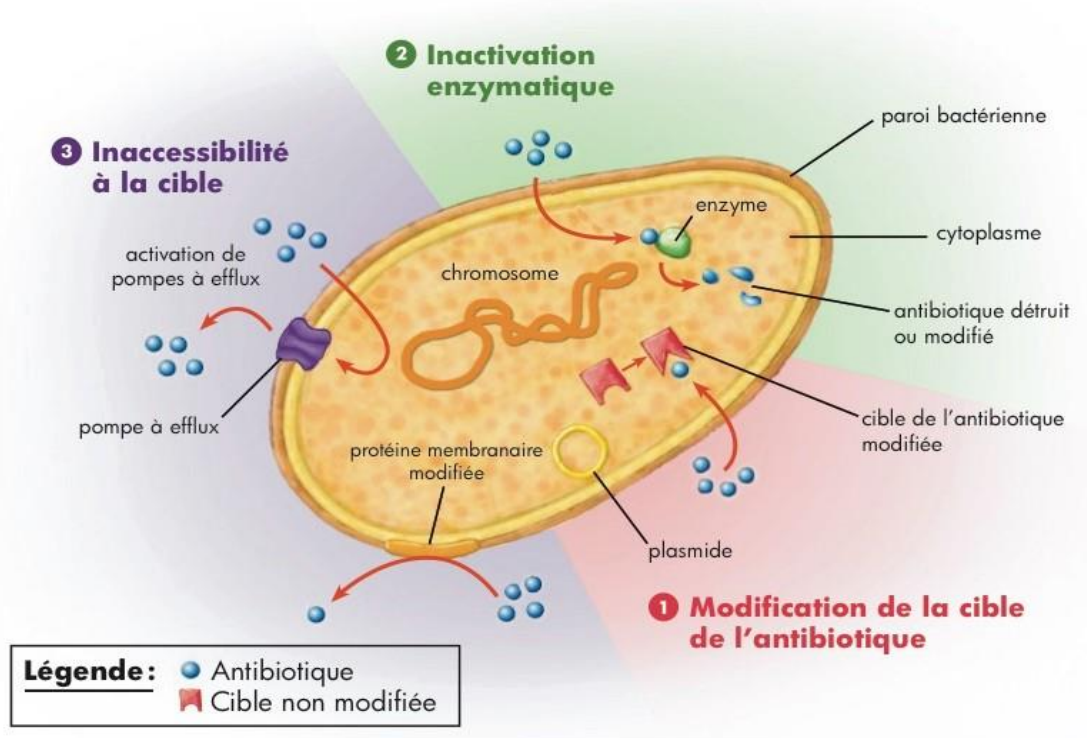
Le premier mécanisme consiste pour la bactérie à modifier la cible de l'antibiotique. Cette modification peut être soit directement due à une modification de la structure de la cible soit due à une modification de la voie de synthèse de cette cible pour lui conférer une nouvelle structure tridimensionnelle. Ce mécanisme va jouer sur différents composants cellulaires et est globalement utilisé contre la majorité des antibiotiques notamment chez les bactéries Gram négatif qui, en modifiant les cibles des antibiotiques, développent un haut degré de résistance. Les antibiotiques d'une même famille ayant généralement la même cible, ce mécanisme confère aux bactéries une résistance croisée pour toutes les molécules de la même famille. Cliniquement, cette résistance ne se traduit pas toujours par un échec thérapeutique. En effet, certaines familles d'antibiotiques conservent une efficacité car leur CMI n'est pas forcément proportionnellement augmentée (Guerine-Fauble, 2010 ; Coustès, 2016).

Le deuxième mécanisme consiste à détruire ou modifier l'antibiotique par une inactivation enzymatique l'empêchant alors de reconnaître sa cible. Ce mécanisme se rencontre surtout contre les bêta-lactamines, les macrolides, le chloramphénicol et les



aminosides. Une résistance croisée est également possible mais moindre que pour le premier mécanisme (Guerine-Fauble, 2010 ; Coustès, 2016).

Enfin, les bactéries peuvent également rendre leurs cibles inaccessibles. Ce mécanisme consiste soit à diminuer la perméabilité membranaire à la pénétration de l'antibiotique soit à rejeter l'antibiotique par phénomène actif d'efflux. La diminution de la perméabilité membranaire est rendue possible grâce à une mutation des gènes codant les porines membranaires, portes d'entrée des antibiotiques, réduisant leur diamètre et empêchant leur passage dans le milieu intracellulaire. Le phénomène d'efflux est un mécanisme actif rejetant directement les antibiotiques à l'aide de pompes membranaires spécifiques (Guerine-Fauble, 2010 ; Coustès, 2016).



**Figure 4 :** Exemples des mécanismes de résistance aux antibiotiques (D'après l'Encyclopedia Britannica 2009). Source (Coustès, 2016).

### 2.5 Facteurs contribuant à l'émergence de la résistance bactérienne :

L'émergence et la propagation de la résistance aux antibiotiques sont le résultat d'une pression sélective exercée par les agents antimicrobiens et de la transmission des microorganismes résistants (Simonsen et al., 2004). Par ailleurs d'autres facteurs contribuant à l'émergence et à la propagation de la résistance bactérienne aux ATB sont connus (Tab. 01) (Murthy, 2001 ; Rybak, 2004).

**Tableau 1 : Facteurs contribuant à la résistance aux antibiotiques  
(Murthy, 2001 ; Rybak, 2004)**

| Facteurs   | Exemples (liste exhaustive)   |
|--|---|
| Emergence de la résistance                                   | -Usage abusif d'antibiotique ;<br>- Gravité accrue de l'état des malades hospitalisés ;<br>-Manque de fidélité au traitement ;<br>-Durée trop courte ou dose sous-thérapeutique ;<br>-Diagnostic non confirmé d'infection bactérienne ;<br>-Utilisation inadéquate d'antibiotique dans les pays en voie de développement.   |
| Propagation des souches résistantes                          | -Mesures d'hygiène inadéquate dans les hôpitaux ;<br>-Non-respect des directives de lutte contre les infections ;<br>-Promiscuité des patients hospitalisés ;<br>-Réduction du personnel infirmier et de soutien ;<br>-Déplacement accrus des patients (transfert de patients colonisés ou infectés entre hôpitaux et milieu communautaire) ;<br>-Voyages internationaux. |
| Utilisation d'antibiotiques dans le secteur agro-alimentaire | -Animaux destinés à la consommation ;<br>-Agriculture et aquaculture.   |
| Utilisation d'antibiotiques de désinfectants                 | -Agents antimicrobiens dans les produits d'entretien ménager, le dentifrice, les pastilles contre le mal de gorge, les savons, etc...   |

### 3 Les bactéries multi-résistantes (BMR) :

#### 3.1 Définition :

Par définition, la multi-résistance aux antibiotiques caractérise les bactéries qui présentent une résistance, naturelle ou acquise, à au moins 3 classes d'antibiotiques (Magiorakos *al.*, 2012). Elle concerne d'abord les infections hospitalières (ex. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline ou SARM) mais aussi communautaires (ex. pneumocoques ou bacille de la tuberculose multi-résistants...).

Echappant aux traitements de première intention, les infections à bactéries multi-résistantes (BMR) entraînent un retard à la mise en place d'une antibiothérapie adaptée et contribuent à une augmentation de la mortalité des patients (Schwaber et al., 2006).

### 3.2 Les types de bactéries multi-résistantes :

#### 3.2.1 Les BMR hospitalières :

##### ❖ *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline (SARM) :

*S. aureus* est une des deux principales espèces responsables d'infections nosocomiales (IN). Le développement incontrôlé des épidémies de SARM et les preuves répétées de leur diffusion clonale justifient à eux seuls la mise en place d'un programme de lutte contre les BMR. Les SARM représentent 5 à 10% des bactéries isolées des IN. Les SARM sont résistantes à toutes les  $\beta$ -lactamines et très souvent résistants aux aminosides, aux macrolides et aux fluoroquinolones (Mainardi et al., 1995). Leur résistance est due à l'acquisition du « gène *mecA* », entraînant la production d'une protéine liant la pénicilline (PLP2a), et donc modification de la cible de l'antibiotique qui est une protéine de la paroi bactérienne (Muller, 2017).

##### ❖ Entérobactéries productrices de $\beta$ -lactamases à spectre étendu (EBLSE) :

Les entérobactéries dans leur ensemble représentent 35 à 40% des bactéries responsables d'IN. Les EBLSE représentent environ 1% des bactéries isolées des IN. La tendance à la diffusion clonale des EBLSE est bien démontrée. Les souches EBLSE (principalement *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* et à un moindre degré *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter sp*) sont résistantes à de nombreuses  $\beta$ -lactamines (sauf imipénème), et souvent céphamycines pour les espèces qui y sont naturellement sensibles, et très souvent résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones [3].

##### ❖ Entérobactéries productrice de céphalosporinases :

Chez certaines espèces d'entérobactéries, en particulier *Enterobacter cloacae*, *E.aerogenes*, *Serratia marcescens* et *Citrobacter freundii*, une proportion importante des souches (10 à 30%) sont résistantes aux  $\beta$ -lactamines par hyperproduction de céphalosporinase. Les traitements antibiotiques jouent un rôle essentiel dans l'émergence de

ces souches dont la diffusion clonale (transmission croisée) est beaucoup plus limitée que celle des souches productrices de BLSE, sauf peut-être pour *Serratia* [3].

De nouvelles BMR ont émergé et diffusé depuis plusieurs années, mais à la différence des BMR « classiques », celles-ci ont acquis un niveau de résistance plus élevé : elles sont identifiées comme bactéries hautement résistantes émergentes, ou BHRe (Muller, 2017). Deux types de bactéries sont identifiés comme BHRe :

❖ **Les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) :**

Elles vont être capables de synthétiser une enzyme inhibant les carbapénèmes, classe d'antibiotiques à très large spectre considérée comme de dernière ligne thérapeutique ;

❖ **Les entérocoques résistants aux glycopeptides, ou ERG (aussi appelés entérocoques résistants à la vancomycine ou ERV) :**

Elles représentent environ 1% des souches d'entérocoques isolées à l'hôpital et environ 5 à 8% des bactéries responsables des IN [3]. Leur résistance est due à l'acquisition du « *gène van* » qui va entraîner une modification de la cible de l'antibiotique, en modifiant un acide aminé sur le dipeptide terminal ciblé, passant de D-alanyl-D-alanyl à D-alanyl- D-lactate (Muller, 2017).

❖ ***Acinetobacter baumannii* multi-résistante :**

Elles représentent 2 à 4% des bactéries responsables d'IN, jouent un rôle non négligeable dans certains secteurs hospitaliers (soins intensifs) et sont parfois à l'origine de bouffées épidémiques dans lesquelles la contamination de l'environnement des patients porteurs joue un rôle. Certaines souches épidémiques résistantes à l'imipénème conduisent à des impasses thérapeutiques [3].

❖ ***Pseudomonas aeruginosa* multi-résistante :**

Les souches de *P. aeruginosa* résistantes aux  $\beta$ -lactamines (ticarcilline, ceftazidime ou imipénème) ont tendance à être résistantes aussi aux aminosides et aux fluoroquinolones. Dans les hôpitaux concernés, ces souches doivent faire l'objet d'une stratégie spécifique, notamment une politique de prescription des antibiotiques, et des mesures de contrôle de l'environnement [3].

### 3.2.2 Les BMR Communautaires :

Les BMR communautaires sont des bactéries impliquées dans les infections survenant en dehors d'un établissement de santé, par opposition des BMR hospitaliers. Ces germes sont caractérisés par une probabilité de résistances relativement faibles, les plus fréquentes de ce type de BMR sont les pneumocoques et les bacilles de la tuberculose (Znazen et al., 2006).

#### ❖ *Streptococcus pneumoniae* :

C'est un pathogène majeur, responsable d'infections communautaires à type de pneumonies, de bactériémies, de méningites, d'otites et de sinusites, la pneumocoque a acquis au cours des cinq dernières décennies de nombreuses résistances à : sulfamides, tétracyclines, érythromycine, pénicilline et chloramphénicol. La résistance du pneumocoque aux  $\beta$ -lactamines est liée à une modification des protéines de liaison aux pénicillines (PLP).

La surveillance de la sensibilité du pneumocoque aux antibiotiques est nécessaire afin d'adapter les recommandations thérapeutiques des infections pneumococciques.

#### ❖ **Bacille de la tuberculose :**

Le bacille de la tuberculose peut devenir résistant aux antimicrobiens utilisés pour guérir la maladie. La tuberculose multi-résistante (MR) est une tuberculose contre laquelle l'isoniazide et la rifampicine, les 2 antituberculeux les plus puissants, ne sont pas efficaces. La mauvaise gestion du traitement antituberculeux et la transmission interhumaine expliquent la propagation de la tuberculose multi-résistante (Znazen et al., 2006)

### 3.3 Conséquences de la multi-résistance aux antibiotiques :

La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est un grave problème de santé publique mondiale avec des conséquences multiples :

#### 3.3.1 Conséquences individuelles :

La survenue d'infection due à des espèces bactériennes ayant acquis des mécanismes de résistance peut être responsable de plusieurs phénomènes dont :

- Un retard thérapeutique,
- La nécessité d'utiliser des molécules récentes et coûteuses dont les modalités d'administration optimale et la toxicité ne sont pas encore bien identifiées,
- La prolongation de durée de séjour voire une surmortalité (Zahar, 2012).

### 3.3.2 Conséquences collectives :

Au plan collectif, les conséquences de la résistance sont plus difficilement évaluables. Toutefois, elles se résument en :

- Une modification des pratiques antibiotiques des cliniciens, les amenant à une surconsommation de molécules dites de réserves ou à large spectre,
- L'augmentation de la charge en soin,
- L'augmentation des coûts (**Zahar, 2012**).

## **Chapitre 2**

### ***Perspectives d'usage thérapeutique des nanoparticules d'argent***

## 1 Généralités sur les nanoparticules :

### 1.1 Définition :

Le terme « nanoparticule » désigne un assemblage d'atomes qui constitue des particules, dont 50% ou plus se situent dans la gamme de taille 1-100 nm (Ema et al, 2017). Le rayon typique d'un atome étant de l'ordre de 0,1nm, une nanoparticule peut être constituée d'une dizaine à plusieurs centaines d'atomes (Zeyons, 2008). Les nanoparticules sont des structures relativement fréquentes et se situent, sur l'échelle du monde vivant, entre l'hélice d'ADN (3,4 nm) et un virus (100 nm) (Fig. 5) (Simon-Deckers, 2008).

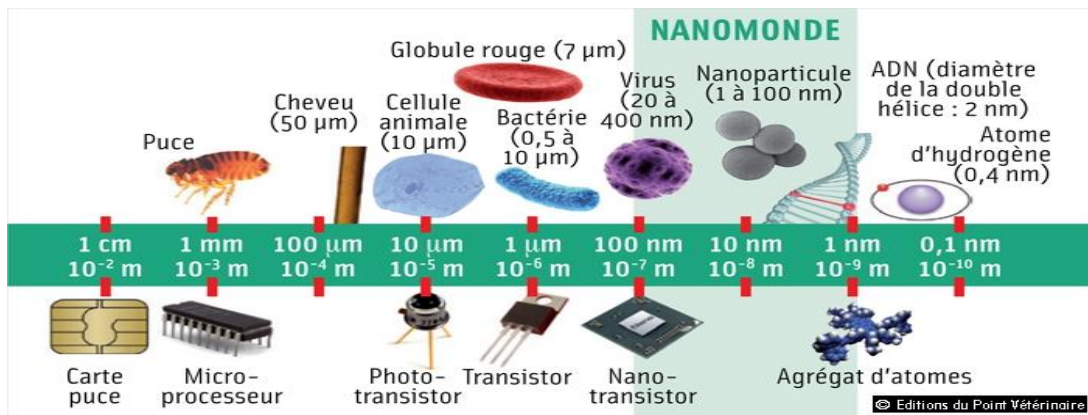


Figure 5: Echelle nanométrique [4]

### 1.2 Origine des nanoparticules :

Les nanoparticules existent dans la nature mais elles sont aussi fabriquées et utilisées dans de nombreux domaines (Sedira, 2014). On en distingue trois types selon leur origine :

- **Les nanoparticules d'origine naturelle** : résultent essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère (incendies, éruptions volcaniques ...)
- **Les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle** : issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs (pollutions, émissions diesel, combustions diverses ...)
- **Les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle** : nanoparticules manufacturées par l'industrie ou dans les laboratoires de recherche. Ce sont sur ces dernières que nous allons nous focaliser plus précisément dans cette étude (Andujar, 2009).



### 1.3 Formes et classification des nanoparticules :

La forme des NP conditionne leurs effets biologiques. Les NP manufacturées peuvent avoir des formes très diverses : sphériques, fibreuses, tubulaires, circulaires et planes. Elles pourraient généralement être classées comme inorganiques et organiques.

Les nanoparticules inorganiques constituent des nanoparticules semi-conducteurs (comme ZnO, ZnS et CdS), les nanoparticules métalliques (comme Au, Ag, Cu et Al) et les nanoparticules magnétiques (comme Co, Fe et Ni). Les nanoparticules organiques, quant à elles, subsument les nanoparticules de carbone (comme les fullerènes, les points quantiques, les nanotubes de carbone). Les nanoparticules d'Or et d'Ag (métal noble) fournissent des caractéristiques supérieures avec une souplesse utile (**Rafique et al. 2016**).

### 1.4 Propriétés des nanoparticules :

La diminution de la taille d'une particule conduit à l'apparition de caractéristiques spécifiques et de propriétés nouvelles selon la forme, la taille et la distribution (**Hervé-Bazin, 2007 ; Mishra et al., 2014**). A l'échelle nanométrique, On note principalement des propriétés optiques, électriques, catalytiques, thermiques, magnétiques, mécaniques ou encore biologiques (**Zeyons, 2008**).

Les nanoparticules manufacturées diffèrent de celles naturelles par l'homogénéité de leurs caractéristiques, leur plus grande stabilité, la réactivité chimique, le rapport surface/volume élevé et les propriétés de surface biocompatibles favorisant les diverses applications médicales telles que les activités antimicrobiennes, mutagènes et anti-inflammatoires particulières (**Perrault, 2012 ; Singh et al., 2013 ; Mathur et al., 2018**).

### 1.5 Applications des nanoparticules d'argents :

Le **tableau 2** expose un inventaire non exhaustif des domaines pour lesquels sont développés et commercialisés des produits contenant des nanoparticules d'argent et montre la diversité des applications actuelles.

**Tableau 2 :** Domaines d'application de produits contenant des AgNps (Sedira, 2014).

| Domaines   | Applications  | Utilités  |
|--|---|---|
| <b>Secteur Biomédical</b>                          | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Des pansements dits «argentiques» (tels que des pansements Acticoat)</li> <li>-Des cathéters urinaires, vasculaires et péritonéaux</li> <li>-Des masques chirurgicaux</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Prévenir des infections,</li> <li>-Prévenir la formation de biofilms bactériens,</li> <li>-Guérir des blessures,</li> <li>-Ne provoquent pas d'allergie ni d'irritation.</li> </ul>           |
| <b>Agro-alimentaire et le traitement de l'eau</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Des équipements en argent,</li> <li>-Des films alimentaires dans lesquels sont incorporées des particules de phosphate de calcium biodégradables portant des nanoparticules d'argent</li> <li>-Des membranes de filtration imprégnées de nanoparticules d'argent</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Eviter les contaminations et prévenir l'apparition d'un goût métallique,</li> <li>- Empêcher le développement d'agents infectieux dans les circuits de distribution d'eau potable.</li> </ul> |
| <b>Hygiène des personnes</b>                       | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Déodorant (Shiseido), savon, gel bactéricide pour les mains,</li> <li>-Produits cosmétiques,</li> <li>-Sièges des toilettes publiques</li> <li>-Vêtements et textiles</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Retarder le développement des bactéries et champignons,</li> <li>-Eviter les mauvaises odeurs,</li> <li>-Empêcher l'adhésion des pollens allergènes.</li> </ul>                               |
| <b>Désinfection des surfaces</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Peintures murales, revêtement de sol,</li> <li>-Revêtement de surfaces d'acier inoxydable pour les équipements médicaux, industries agroalimentaires ou pharmaceutiques</li> </ul>  | <p>Surtout pour les personnes allergiques aux désinfectants habituels.</p>  |
| <b>Technologies et équipements électroménagers</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ordinateur, Combinés téléphoniques, calculatrice, clavier d'ordinateurs...</li> <li>-Machines, réfrigérateurs, aspirateur...</li> </ul>   | <p>Libération d'ions Ag<sup>+</sup> à partir d'argent métalliques grâce à un courant électrique.</p>  |

## 1.6 Méthodes de synthèse de nanoparticules d'argent :

Les nanoparticules d'argent sont généralement synthétisées selon deux approches principales : l'approche dite descendante « Top-down » et l'approche dite ascendante « bottom-up » (**Fig. 6**). De nos jours, trois méthodes de synthèse adaptées à ces approches, ont été développées pour permettre l'obtention de telles particules (**Tab. 3**).

### 1.6.1 Approche descendante « Top-down » :

Dans cette approche, les nanoparticules sont synthétisées par les méthodes physiques, basées sur la décomposition d'un matériau massif afin d'en réduire la taille. Par contre, elles nécessitent un matériel coûteux pour un rendement en nanoparticules souvent très limité.

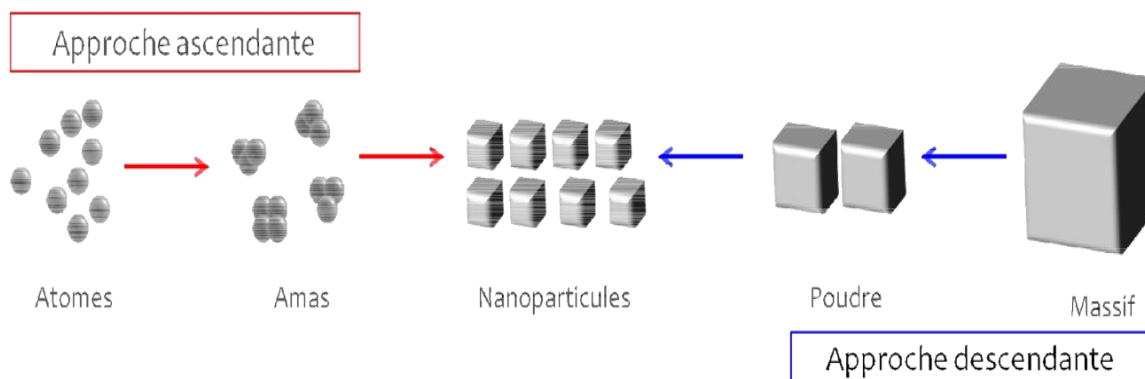
### 1.6.2 Approche ascendante « Bottom-up » :

Dans cette approche, les nanoparticules sont synthétisées dans les laboratoires à l'aide de méthodes chimiques et biologiques par l'auto-assemblage atome par atome, molécule par molécule ou agrégat par agrégat, qui se développent en particules de taille nanométrique. Ces méthodes présentent l'avantage d'être en général simples à mettre en œuvre, peu coûteuses et permettent la production d'une grande quantité de nanoparticules dans un court laps de temps, contrairement aux méthodes physiques (**Mathur et al., 2018**).

### 1.6.3 Synthèse verte ou biologique:

Si les nanoparticules sont habituellement synthétisées par les méthodes physiques et chimiques, la synthèse verte émerge progressivement comme une meilleure option dans cette branche de la nanotechnologie. Elle consiste en la production des nanoparticules à l'aide d'entités biologiques telles que les micro-organismes, les extraits ou les biomasses de plantes (feuilles, fleurs, écorces, graines etc.) et les enzymes et pourrait être une suppléante des méthodes chimiques et physiques dans le cadre du respect de l'environnement. Cette méthode est préférée sur les deux autres car elle offre de nombreux avantages, non seulement du point de vue écologique, mais aussi pour sa compatibilité à des applications pharmaceutiques et biomédicales. Cela est lié au fait qu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits chimiques toxiques lors du processus de synthèse. En outre, l'utilisation d'extraits de végétaux est

potentiellement bénéfique que les microorganismes en raison de la facilité d'amélioration et le processus laborieux de conservation les cultures cellulaires, selon les besoins du processus de micro-organisme. (Ahmed et al., 2016)



**Figure 6 :** Représentation schématique des deux grandes approches de synthèse de nanoparticules (Andrieux – Ledier, 2012).

**Tableau 3 :** Méthodes de synthèse des nanoparticules (Mathur et al., 2018)

| Méthodes Physiques  | Réductions Chimiques   | Méthodes biologiques   |
|---|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>-Ultrasonication</li> <li>-Irradiation</li> <li>-Micro-ondes</li> <li>-Electrochimiques</li> <li>-Laser pulsé</li> <li>- Pyrolyse laser....</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Transfert de phase liquide-liquide</li> <li>- Voie micellaire inverse</li> <li>-Techniques solution-gélification « Sol-gel »</li> <li>-Synthèse radiolytique</li> <li>-Réduction de sels métalliques ...</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>-Micro-organismes (bactéries, levure, champignons etc.)</li> <li>-Plantes (angiospermes et gymnospermes)</li> </ul> |

## 2 Effets antimicrobiens des nanoparticules d'argent :

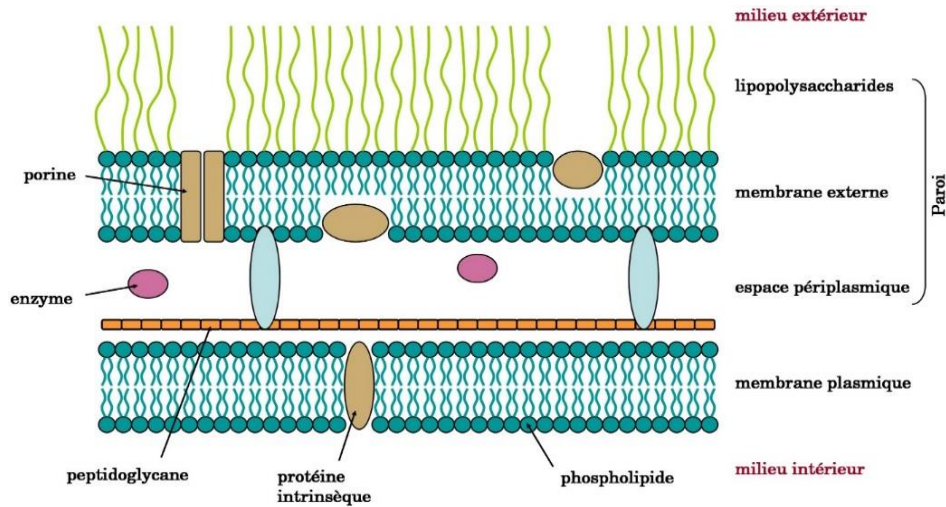
L'argent (Ag), sous forme colloïdal, a longtemps été utilisé comme substance antimicrobienne. Par conséquent, les nanoparticules d'argent présentent un grand potentiel en tant que nouveaux agents antimicrobiens (Butler et al., 2015).

Comparées aux autres sels, les nanoparticules d'argent montrent une propriété antimicrobienne efficace en raison de leur grande surface qui offre un meilleur contact avec le microorganisme et augmente la libération d'ions argentés ( $\text{Ag}^+$ ). Ces ions présentent un large spectre d'action contre les champignons, les virus et un grand nombre de bactéries infectieuses (à Gram positif et à Gram négatif), dont *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Vibrio choléra*, *Pseudomonas aeruginosa*, *syphilis typhus* et *Staphylococcus aureus* (Rajeshkumar et Malarkodi, 2014 ; Soleimani et Habibi-pirkoohi, 2017 ; Suwan et al., 2018). Par contre, elles sont relativement non toxiques pour les cellules humaines et animales et ont une probabilité beaucoup moindre de provoquer une résistance bactérienne que les antibiotiques (Li et al., 2016). Une autre étude de Panacek et al., 2006 a également démontré l'activité antimicrobienne des AgNps contre les souches bactériennes multirésistantes.

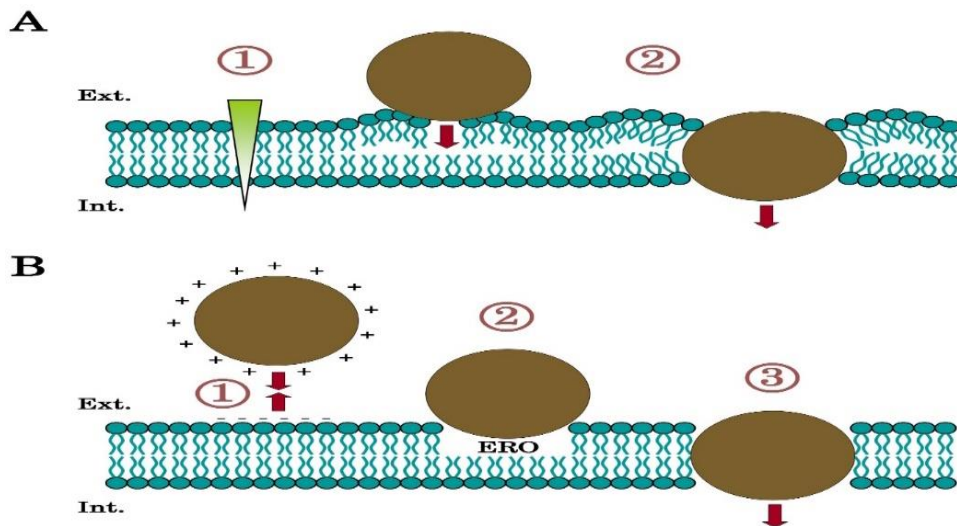
## 2.1 Mécanismes de pénétration des nanoparticules:

Le mécanisme exact de pénétration des nanoparticules reste encore moins élucidé, car il n'a été que très peu étudié. En effet, il est bien connu que la pénétration des nanoparticules dépend fortement de la nature, mais aussi la taille et la forme de ces dernières. Ainsi, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer leur pénétration dans la paroi bactérienne :

- **Passage via les porines** : Cette hypothèse semble peu probable.
- **Passage mécanique** : la différence de concentrations en osmolytes de part et d'autre de la membrane permet aux nanoparticules d'exercer une pression mécanique sur la paroi (Fig. 8A). Cependant, certaines études montrent que cette osmolalité est très faible (Simon-Deckers, 2008).
- **Passage par détérioration de la membrane externe** : les nanoparticules chargées positivement, attirées par la membrane externe chargées négativement, peuvent produire des espèces réactives d'oxygène (ERO) et ainsi provoquer des trous dans la membrane permettant leur pénétration dans le périplasme ou le cytoplasme (Katva et al., 2018) (Fig. 7 et Fig. 8B)



**Figure 7 :** Organisation de la paroi bactérienne des bactéries à Gram négatif.

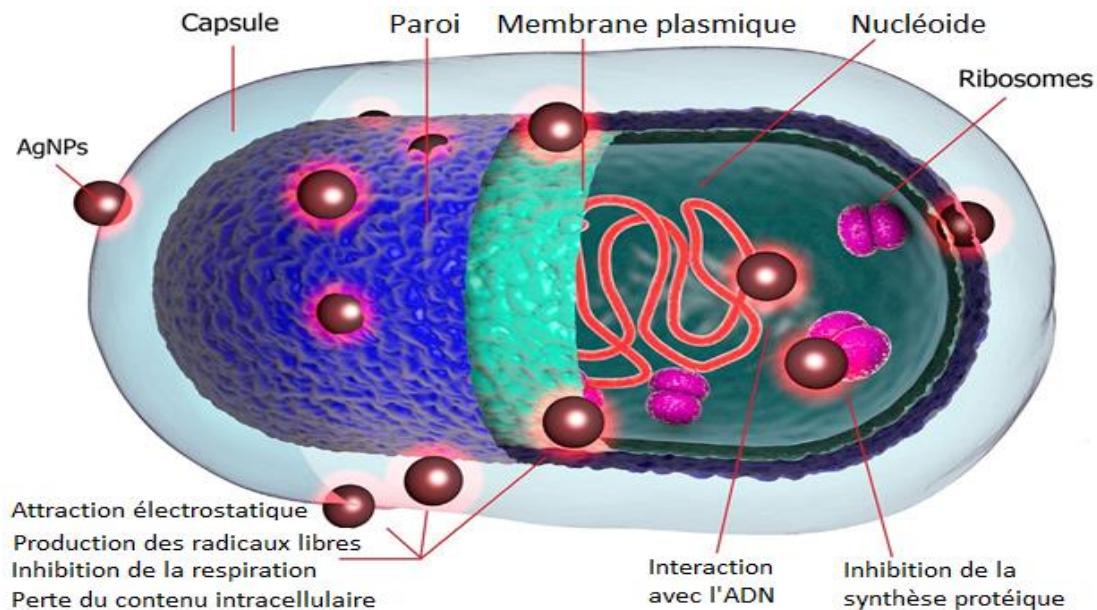


**Figure 8 :** Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries. (A) Hypothèse du passage mécanique. (B) Hypothèse du passage par détérioration de la membrane externe (Neal, 2008)

## 2.2 Mécanisme d'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent :

Le mécanisme d'action inhibitrice des ions argentés sur les micro-organismes est partiellement connu (Katva et al., 2018). De nombreuses études appuient la proposition selon laquelle la pénétration des AgNps à travers la paroi bactérienne conduit à leur dissolution en ions argentés ( $Ag^+$ ). Ces ions  $Ag^+$  ainsi libérés vont interagir avec les groupes thiol (SH), constituants des membranes cellulaires et des enzymes, et forment des liaisons S – Ag stables (Rai et al., 2016). Ce qui provoque l'inactivation des protéines membranaires,

la dénaturation des enzymes vitales, épuisement des niveaux d'ATP intracellulaire et l'activité bactéricide conséquente (Chudobova *et al.*, 2013 ; Cavassin *et al.*, 2015). En revanche, Sondi et Salopek-Sondi, 2004 ont démontré que l'action antibactérienne était due à la formation de trous dans la paroi cellulaire de bactérie Gram négatif, conduisant à la mort cellulaire. Un autre mécanisme suggère la génération de radicaux libres, qui affectent les lipides membranaires, et la formation éventuelle de pores sur la paroi (Fig. 9) (Banerjee *et al.*, 2010).



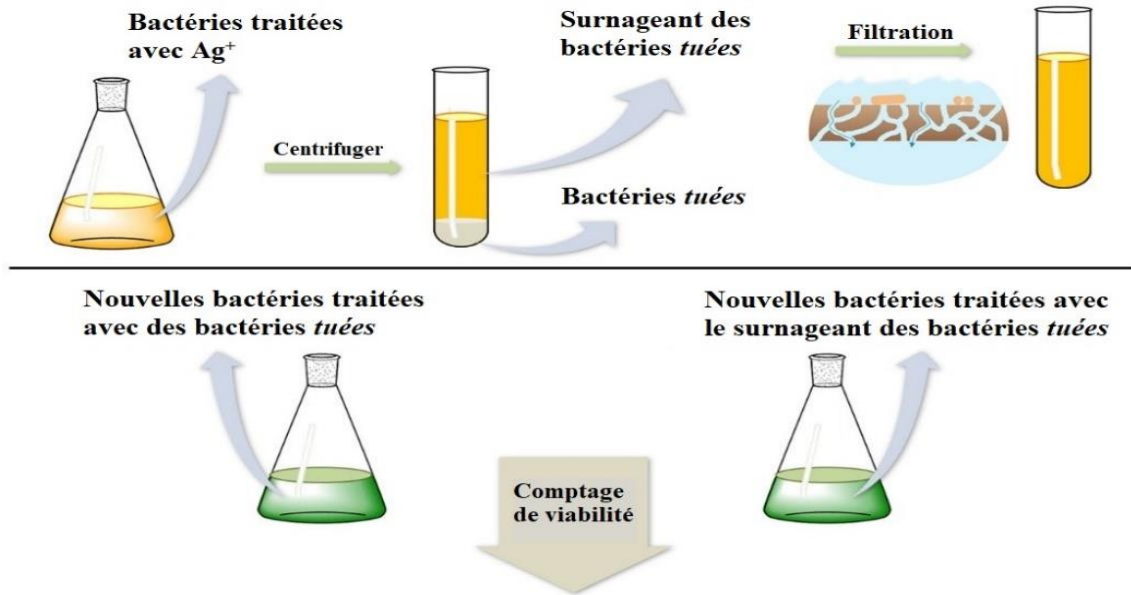
**Figure 9 :** Mécanismes de l'activité antimicrobienne des nanoparticules (Rai *et al.*, 2016)

### 3 Les effets «Zombies» des nanoparticules d'argent:

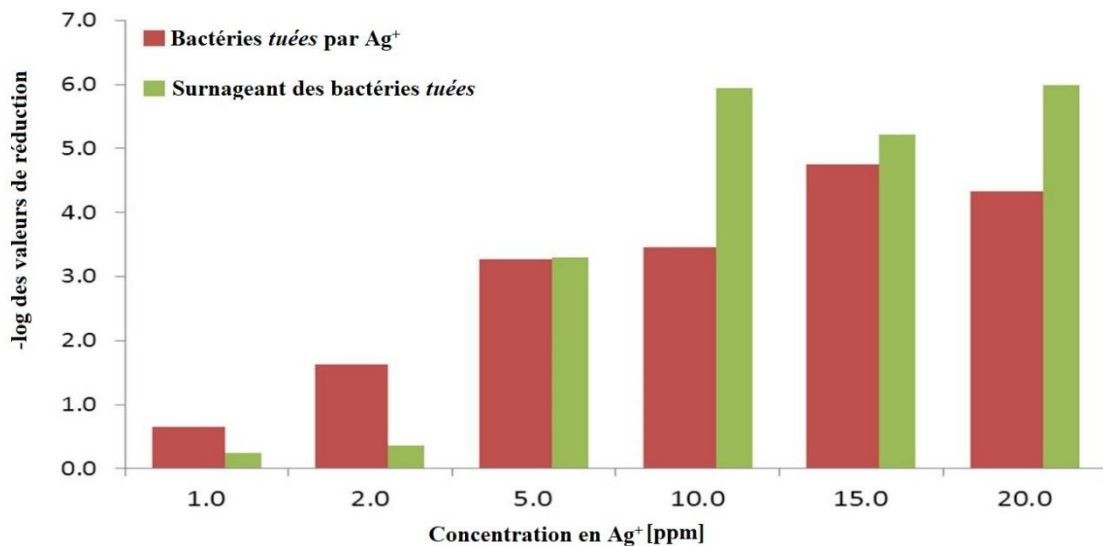
Un des avantages majeurs des nanoparticules d'argent métallique réside dans le fait qu'elles représentent un réservoir d'ions  $\text{Ag}^+$ . Ce qui permet une activité antibactérienne pendant une période de temps plus longue (Mtimet, 2012).

Wakshlak *et al.*, 2015 ont montré que les bactéries tuées sous action des ions  $\text{Ag}^+$  exercent une activité biocide significative envers une population viable de la même bactérie (Fig. 10 et Fig. 11). Selon les auteurs, l'origine de ce phénomène découle de deux caractéristiques de l'action biocide induite par les AgNps:

- Les espèces métalliques ne sont pas désactivées à la suite du mécanisme d'inhibition de la bactérie, et peuvent donc poursuivre leur effet biocide à plusieurs reprises.
- Les bactéries mortes servent d'un réservoir de relargage des ions  $Ag^+$  et peuvent donc libérer ces cations métalliques létaux pour de nouvelles actions contre d'autres bactéries vivantes.



**Figure 10 :** Vue d'ensemble sur l'expérience des effets zombies (Wakshlak et al., 2015)



**Figure 11 :** Effet bactéricide de cellules *P. aeruginosa*, traitées avec des concentrations croissantes d'AgNps, envers de nouvelles cellules viables, après 6h d'exposition

Vert : L'activité antibactérienne du surnageant des bactéries tuées

Rouge : L'activité antibactérienne des bactéries tuées (Wakshlak et al., 2015).



#### 4 Activité mutagène des nanoparticules d'argent:

Les AgNps sont connus comme étant très toxiques pour les microorganismes contrairement aux cellules humaines. D'autre part, la génotoxicité des AgNps varie grandement parmi les bactéries et a été évaluée pour trois mécanismes potentiels: la mutagenicité, la clastogénicité et les lésions de l'ADN causées par la cassure de brins d'ADN (Bovenkamp *et al.*, 2013 ; Butler *et al.*, 2015).

Il a été démontré que des ions  $Ag^+$  inhibent la réplication cellulaire en induisant la condensation de l'ADN et en agissant directement avec les bases des acides nucléiques de diverses bactéries. En effet, ces ions peuvent intercaler entre la paire de base de purine et de pyrimidine, perturbant ainsi la liaison H entre les brins antiparallèles. Ce qui pourra avoir plusieurs conséquences telles que l'induction d'une mutation ou même la dénaturation de l'ADN et l'inactivation subséquente des bactéries (Li *et al.*, 2016).

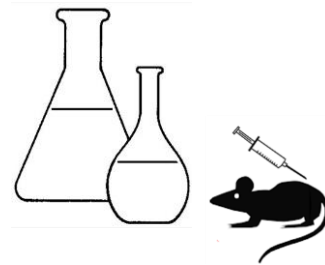
Les ions  $Ag^+$  ont également été impliqués dans la génération et l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les bactéries, ce qui peut entraîner des dommages aux composants cellulaires, y compris la chromatine, perturbant ainsi les fonctions critiques des cellules (Choi et Hu, 2008).

Enfin, au cours de leur étude sur l'interaction directe entre les nanoparticules d'argent et l'ADN génomique chez *E. coli*, Yang *et al.*, 2009 ont constaté une augmentation d'un facteur 3 de la fréquence de mutation du génome d'*E. coli* en présence de nanoparticules d'argent de 30-50 nm de diamètre (la fréquence de mutation passe de  $1,08 \cdot 10^{-6}$  dans le contrôle à  $3,14 \cdot 10^{-6}$  pour l'échantillon). Ils ont donc conclu que les nanoparticules d'argent se lient à l'ADN et compromettent la fidélité de la réplication aussi *in vitro* et *in vivo*.



## **Partie 2**

### ***Expérimentation***



## **2.1**

### ***Matériel et Méthodes***

## 1 Modèle expérimental :

### 1.1 Souches de référence :

Trois souches de référence, du laboratoire de microbiologie de la faculté des sciences de la nature et de la terre et de l'univers, université 8 Mai 1945 Guelma, ont été utilisées pour mener à bien ce travail :

- *Escherichia coli* (ATCC 25922)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)
- *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

### 1.2 Souches cliniques pathogènes:

Les souches cliniques utilisées dans ce travail étaient des souches bactériennes isolées principalement des prélèvements biologiques (urine et pus) dans le cadre des projets PFE des années 2017 et 2018 dirigés par Mme Khallel M. (collection personnelle). Ces souches étaient sur milieu de conservation en provenance de l'Institut Pasteur d'Algérie et des géloses inclinées. Ajouter à celles-ci, nous avons également recueilli, sur gélose inclinée, d'autres souches multirésistantes au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Hôpital Ibn Zohr de Guelma sous l'assistance du responsable du service Dr. Dardar D., elles sont présentées dans le **Tableau 4**.

**Tableau 4** : Souches cliniques pathogènes étudiées

| Gram                                       | Germes                              | Prélèvement |
|--|-------------------------------------|-------------|
| <b>Gram négatif<br/>entérobactérie</b>     | <i>E. coli</i> BLSE +               | Urine       |
|  | <i>Klebsiella pneumoniae</i> BLSE + | Urine       |
|  | <i>Serratia liquefaciens</i> BLSE + | Pus         |
| <b>Gram négatif<br/>non entérobactérie</b> | <i>Pseudomonas</i>                  | Urine       |
| <b>Gram positif</b>                        | <i>Staphylococcus aureus</i>        | Pus         |

## 2 Matériel chimique :

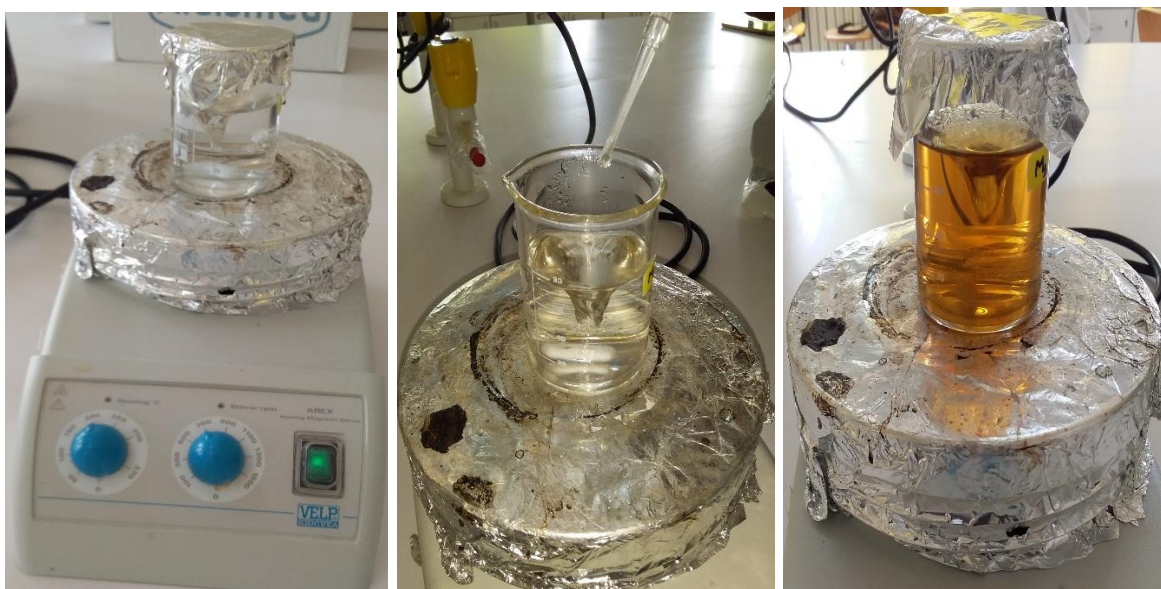
La solution de nitrate d'argent que nous avons utilisé, portant la référence 0.01g Cl-/ml, 0.252 N, 1000 mg/l, a été fabriquée par la compagnie Schlumberger (Mi-SWACO) spécialisée dans le secteur de pétrole et d'énergie.

Quant à la solution de trisodium citrate, nous l'avons préparé à partir de la poudre (Lot : B6132043-1104-1, Formule =  $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ , MM = 294.09 g/mol), disponible au niveau du laboratoire de biochimie de l'université 08 Mai 1945 de Guelma.

### 3 Synthèse des nanoparticules d'argent :

Il existe une variété de méthodes pour synthétiser les AgNps impliquant les méthodes biologiques, physiques et chimiques. Néanmoins, la méthode la plus simple, la plus avérée et la plus courante demeure la réduction chimique des sels d'argent métalliques. Cette méthode a été appliquée pour synthétiser les formes stables et variées de AgNps dans l'eau en utilisant différents agents réducteurs (ex : acide ascorbique, hydrazine, sodium borohydrure et trisodium citrate etc.) (El-Faham *et al.*, 2014 ; Tippayawat *et al.*, 2016).

Dans notre étude, nous avons appliqué la méthode développée par **Turkevich *et al.*, 1951**, qui consiste à synthétiser les AgNps à partir du nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ) en utilisant le trisodium citrate comme agent réducteur. A cet effet, une solution de  $AgNO_3$  de concentration 1mM dans l'eau distillée, contenu dans un bécher, a été chauffée sous agitation continue, jusqu'à la température d'ébullition. Dès que la solution commence à bouillir, on y ajoute goutte à goutte 1% de la solution de trisodium citrate (**Voir annexe**). La couleur de la solution change progressivement en « Jaune dorée », ce qui indique la réduction du nitrate d'argent ( $AgNO_3$ ) en nanoparticules d'argent (AgNps). Ensuite, on retire délicatement le bécher de la plaque chauffante et on laisse la solution se refroidir à la température ambiante (**Fig. 12**) (Pillai *et al.*, 2004 ; Prasad, 2016).



**Figure 12 :** Technique de préparation des nanoparticules d'argent

#### 4 Repiquages des souches bactériennes :

Pour chacune des souches obtenues, un inoculum a été réalisé sur bouillon nutritif, par piqure centrale de l'anse à partir du milieu de conservation puis incubé 24 heures à 37° C.

Après 24 heures d'incubation, les différentes souches ont été ensemencée sur gélose nutritive et des milieux spécifiques de culture, par la méthode des stries, puis incubées dans l'étuve à 37° C pendant 24 heures, afin d'obtenir une culture jeune et des colonies bien isolées servant à préparer d'éventuels inoculums bactériens. Les milieux spécifiques utilisés à cet effet sont :

- Gélose Mac conkey : pour l'isolement des souches *Escherichia coli*
- Gélose Hektoen : pour les souches *Klebsiella pneumoniae*
- Gélose Cetrimide : pour les souches *Pseudomonas aeruginosa*
- Gélose Chapman : pour les souches *Staphylococcus aureus*

#### 5 Antibiogramme :

Les antibiotiques utilisés sont mentionnés dans le **tableau 5**.

**Tableau 5** : Liste des antibiotiques utilisés et leur charge

| Antibiotiques utilisés                                   | Code | Charge des disques |
|--|------|--------------------|
| <b>Amikacine</b>   | AK   | 30µg               |
| <b>Amoxicilline</b>                                      | AMX  | 30µg               |
| <b>Amoxicilline + Acide clavulanique<br/>(Amoxiclav)</b> | AMC  | 30µg               |
| <b>Céfazoline (céphalo. 1<sup>ère</sup> G)</b>           | CZ   | 30µg               |
| <b>Ceftazidine (céphalo. 3<sup>ème</sup> G)</b>          | CAZ  | 30µg               |
| <b>Doxycycline</b>                                       | Dox  | 30µg               |
| <b>Erythromycine (macrolide)</b>                         | E    | 15µg               |
| <b>Gentamicine</b>                                       | GEN  | 10µg               |
| <b>Kanamycine</b>  | K    | 30µg               |
| <b>Nitrofurane</b>                                       | NIT  | 300µg              |
| <b>Ofloxacin</b>   | OF   | 5µg                |
| <b>Pénicilline G</b>                                     | P    | 10µg               |

## 5.1 Principe :

Le but de l'antibiogramme est d'étudier la sensibilité ou la résistance des souches bactériennes vis à vis d'un certain nombre d'antibiotiques précis pour chaque type. Pour le réaliser, nous avons appliqué la méthode de diffusion classique de disques d'antibiotiques sur gélose Muller Hinton (MH) qui est un milieu standardisé pour toutes les bactéries sauf quelques souches exigeantes.

Le principe consiste à déposer des disques, chargés d'une dose connue d'antibiotiques, à la surface de la gélose MH préalablementensemencé de souches étudiées, suivi d'une incubation des boîtes dans l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 h (**Joffin et Leyral, 2003**). La liste des antibiotiques utilisés pour cet essai, avec leur charge (concentration) en µg spécifique, est résumée dans le **tableau 5**.

### 5.1.1 Préparation de la suspension bactérienne :

À partir d'une culture fraîche de 18 à 24 heures, quelques colonies ont été prélevées à l'aide d'une anse de platine puis immerger dans de l'eau physiologique stérile à 0.9% jusqu'à l'obtention d'une charge bactérienne de l'ordre de 0,5 Mc Farland ( $\approx 1 \times 10^8$  CFU/mL), équivalente à une densité optique de 0.08 à 0.1. L'ensemencement a été effectué dans les 15 minutes qui ont suivi la préparation de l'inoculum.

### 5.1.2 Ensemencement :

Le milieu Mueller-Hinton est fondu dans un bain-marie et ramené en surfusion puis coulé dans des boîtes de pétri. Après solidification, la surface de la gélose est ensemencée par des stries serrées, à l'aide d'un écouvillon stérile légèrement imbibé de suspension bactérienne. Cette opération est répétée 2-3 fois en tournant la boîte à 60°C (trois directions).

### 5.1.3 Application des disques d'antibiotique :

Les disques d'antibiotiques, choisis explicitement en fonction de la nature du germe, ont été déposés sur la gélose MH ensemencé, à l'aide d'une pince stérile. Ensuite les boîtes ont été incubées dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

La lecture des résultats se fait par la mesure (en mm), à l'aide d'une règle, du diamètre d'inhibition caractérisé par une zone dépourvue de croissance bactérienne autour du disque.

## 6 Etudes de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent :

L'effet antibactérien des AgNps a été évalué selon trois méthodes :

- ✓ La méthode de diffusion sur gélose,
- ✓ L'association Antibiotique-Nanoparticules d'argent,
- ✓ La détermination de l'activité antibactérienne des AgNps en milieu liquide.

### 6.1 La méthode de diffusion en milieu gélosé :

Dans le but de tester l'effet antibactérien des AgNps, nous avons appliqué la méthode de diffusion de Kirby-Bauer tel qu'indiqué par **Naqvi et al.** Cette méthode est réalisée sur gélose Mueller Hinton (MH) d'environ 4 mm d'épaisseur contenu dans des boîtes de pétrie.

Pour réaliser cette méthode, des dilutions de la solution mère de nanoparticules d'argent (1mM) ont été effectuées de sorte à obtenir quatre concentrations : 1 mM, 0.75 mM, 0.50 mM et 0.25 mM.

#### 6.1.1 Principe :

Cette méthode permet de déterminer l'activité inhibitrice de croissance des biocides par la mesure du diamètre d'inhibition autour d'un disque de papier Whatman imprégné par les différentes dilutions de la solution à tester (**Fig. 13**).

#### 6.1.2 Préparation des disques :

Les disques sont préparés à partir de papier Whatman (ou autre type de papier buvard). A l'aide d'un emporte-pièce, le papier Whatman a été découpé en des disques de 6 mm de diamètre. Par la suite, ces disques sont mis dans un tube à essai (ou plus si nécessaire), et stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes.

#### 6.1.3 Caractérisation des nanoparticules d'argent :

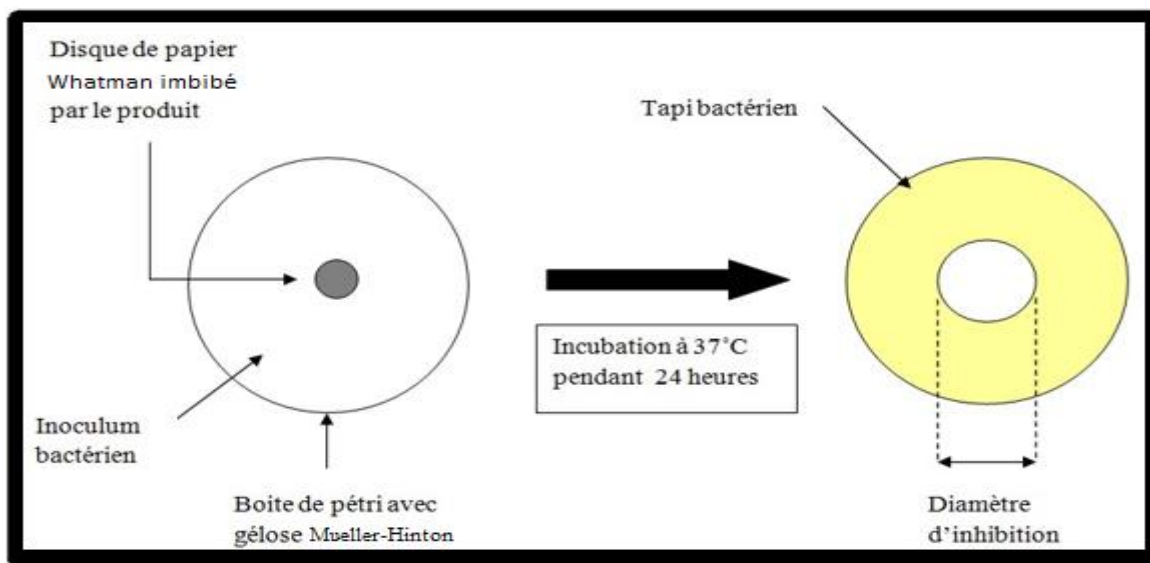
A l'entame de cette étude sur l'activité antimicrobienne, nous nous sommes d'abord assurés d'être en possession des AgNps. L'objectif était de déterminer si les éventuels effets inhibiteurs des AgNps pourraient être dus à l'un des produits ou l'une des substances impliquées dans leur synthèse. Ainsi, une diffusion sur gélose MH a été réalisée en utilisant la souche *E. coli* tout en suivant le même principe que celui de l'antibiogramme.



Après avoir ensemencé la surface de la gélose, quatre disques de papier Whatman stériles y ont été appliqués à l'aide de la pince. Ensuite les disques ont imbibés séparément de 50µl de chacune des solutions suivantes : AgNO<sub>3</sub>, AgNps, Citrate trisodique et eau distillée comme contrôle négatif.

#### 6.1.4 Diffusion des différentes concentrations de nanoparticules :

Comme pour l'antibiogramme, les disques de papier Whatman stériles ont été déposés à l'aide d'une pince stérile, sur la surface de la gélose MH préalablement ensemencée de suspension bactérienne de 0,5 Mc Farland. Les disques ont, par la suite, été imbibés de 0.05 ml (50µl) de différentes concentrations d'AgNps (1 mM, 0.75 mM, 0.50 mM et 0.25 mM). Les boîtes sont fermées puis laissés pendant un certain temps à la température ambiante pour permettre la diffusion des solutions. Ensuite, elles sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Cette étape a été réalisée en deux essais pour chacune des souches (Singh *et al.*, 2013).



**Figure 13** : Principe de la méthode de diffusion par disque.

#### 6.1.5 Analyse statistique :

Une étude statistique descriptive des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel XLSTAT version 2015.4.01.22368.

#### 6.2 Association antibiotique-nanoparticules d'argent :

Cette méthode, appliquée dans plusieurs études (Birla *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2013 ; Naqvi *et al.*, 2013), présente une grande similitude avec la précédente, à la différence

qu'elle nécessite l'utilisation des disques d'antibiotiques. L'objectif visé était d'évaluer la capacité des AgNps à amplifier l'efficacité des antibiotiques vis-à-vis des souches testées.

Pour cette étape, toutes les souches ont été testées avec trois antibiotiques : l'Amoxicilline (AMX), la Gentamicine (GEN) et la Céfazoline (Cz).

### 6.2.1 Méthode :

Après avoirensemencé la suspension bactérienne de chacune des souches sur différentes boîtes contenant la gélose MH, des disques d'antibiotiques y ont été déposés puis imbibés de 0.05 ml (50µl) de 1mM de AgNps. En guise de contrôle, chaque disque a été déposé en double sur la gélose. Le second, n'ayant pas été imbibé de nanoparticules, servait de contrôle négatif pour une éventuelle évaluation de l'accroissement de la zone d'inhibition induit par l'effet des nanoparticules. Puis les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures.

### 6.2.2 Evaluation de l'accroissement de la zone d'inhibition :

Après 24 heures d'incubation, les diamètres des zones d'inhibition, générées par les antibiotiques seuls ainsi que les associations Antibiotique-AgNps, ont été mesurés. L'accroissement du diamètre d'inhibition lié à l'effet combinatoire des antibiotiques et nanoparticules d'argent a été évalué selon la formule :  $(b^2 - a^2) / a^2$  où « a » représente le diamètre de la zone d'inhibition générée par l'antibiotique seul (A) et « b » représente celui généré par le disque d'antibiotique imbibé de AgNps (B) (Birla et al., 2008).

### 6.3 Détermination de l'activité antibactérienne des AgNps en milieu liquide :

L'effet antibactérien des AgNps a été également déterminé selon la méthode adoptée par Chaïbi et al., 1996. Cette méthode est réalisée sur le bouillon Mueller-Hinton (BMH). Les AgNps ont été testées aux concentrations de 1mM, 0.75mM, 0.50mM, 0.25mM, 0.20mM et 0.15mM.

#### 6.3.1 Technique :

Les tubes contenant 5 ml de bouillon Mueller-Hinton (BMH) ont été aseptiquement inoculés par les différentes souches à tester de façon à obtenir une densité de l'ordre de 0.5 Mc Farland ( $\approx 1 \times 10^8$  CFU/mL). Ensuite 1 ml de chacune des six concentrations de nanoparticules a été additionné à l'inoculum dans des tubes distincts. Pour chaque souche, un tube contenant uniquement l'inoculum, servait de témoin négatif. Les tubes sont ensuite

incubés avec agitation à 37°C pendant 24 heures. Cette opération a été effectuée trois fois pour chacune des souches et concentration. À chaque fois, la densité optique (DO) a été mesurée à une longueur d'onde de 625 nm au temps initial et après 24 h d'incubation.

### 6.3.2 Evaluation de l'indice d'inhibition :

L'inhibition est exprimée par l'indice d'inhibition ( $\Pi$ ) calculé selon la formule :

$$\Pi = 1 - \frac{dA_1}{dA_2}$$

$dA_1$  : différence entre l'absorbance après 24 h d'incubation et l'absorbance au temps initialensemencé et contenant l'échantillon (AgNps);

$dA_2$  : différence entre l'absorbance après 24 h d'incubation et l'absorbance au temps initialensemencé et sans l'échantillon.

Un  $\Pi = 0$  indique qu'il n'y a pas d'inhibition ; un  $\Pi = 1$  montre une inhibition totale; un  $\Pi > 1$  se traduit par une lyse cellulaire alors qu'un  $\Pi < 0$  indiquerait qu'il y a une stimulation de la croissance (**Chaibi et al., 1996**)

## **2.2**

### ***Résultats et Discussion***



**Résultats :**

**1 Antibiogramme :**

Après 24 heures d’incubation de la culture bactérienne en présence des ATBs soigneusement sélectionnées selon les souches, des zones d’inhibition caractéristiques de l’effet de ces ATBs sont apparues. La mesure du diamètre de ces zones nous donne les résultats consignés dans les **tableaux 6, 7 et 8**. Selon les recommandations du comité de l’antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM), on a pu classer les bactéries dans l’une de ces catégories suivantes: Sensible- Résistante –Intermédiaire (**Joffin et Leyral, 2003**).

**Tableau 6 :** Antibiogramme des souches à Gram négatif entérobactéries.

| ATB        | <i>E. coli</i> BLSE |                 | <i>K. pneumoniae</i> |                 | <i>S. liquefaciens</i> |                 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |                 |
|------------|---------------------|-----------------|----------------------|-----------------|------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
|            | Diamètre (mm)       | Classe clinique | Diamètre (mm)        | Classe clinique | Diamètre (mm)          | Classe clinique | Diamètre (mm)             | Classe clinique |
| <b>NIT</b> | -                   | R               | -                    | R               | 27                     | S               | *                         | *               |
| <b>OF</b>  | 8                   | R               | 23                   | S               | 28                     | S               | 31                        | S               |
| <b>CZ</b>  | 7                   | R               | -                    | R               | -                      | R               | -                         | R               |
| <b>CAZ</b> | 7                   | R               | -                    | R               | 10                     | R               | 8                         | R               |
| <b>GEN</b> | 18                  | S               | 11                   | R               | 22                     | S               | 30                        | S               |
| <b>AMC</b> | 7                   | R               | 7                    | R               | -                      | R               | *                         | *               |
| <b>AMX</b> | *                   | *               | *                    | *               | -                      | R               | -                         | R               |

(-) : Absence de zone d’inhibition ; (R) : Résistante ; (S) : Sensible ; (\*) : Non testé

**Tableau 7 :** Antibiogramme des souches *Pseudomonas*

| ATB        | <i>P. aeruginosa</i> |                 | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 |                 |
|------------|----------------------|-----------------|---------------------------------|-----------------|
|            | Diamètre (mm)        | Classe clinique | Diamètre (mm)                   | Classe clinique |
| <b>CAZ</b> | -                    | R               | -                               | R               |
| <b>GEN</b> | 15                   | S               | 19                              | S               |
| <b>AMC</b> | 8                    | R               | 8                               | R               |
| <b>AK</b>  | 20                   | S               | *                               | *               |
| <b>DOX</b> | -                    | R               | 19                              | S               |

**Tableau 8 :** Antibiogramme des souches *Staphylococcus*

| ATB        | SARM          |                 | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |                 |
|------------|---------------|-----------------|-----------------------------|-----------------|
|            | Diamètre (mm) | Classe clinique | Diamètre (mm)               | Classe clinique |
| <b>AMC</b> | 21            | S               | *                           | *               |
| <b>AMX</b> | 7             | R               | -                           | R               |
| <b>E</b>   | 9             | R               | 8                           | R               |
| <b>K</b>   | 26            | S               | 26                          | S               |
| <b>P</b>   | 7             | R               | -                           | R               |

La souche pathogène *E. coli* est multirésistante à cinq des six ATB testés excepté la gentamicine vis-à-vis duquel elle est sensible. Par ailleurs, la souche de référence *E. coli* ATCC 25922 est résistante à la céfazoline et la ceftazidine et l’amoxicilline.

La souche *K. pneumoniae* est multirésistante à tous les ATB testés sauf l’Offloxacine. La souche *S. liquefaciens*, est multirésistante à quatre ATB (la céfazoline, la ceftazidine, amoxicille+ac. clavulanique et amoxicilline) et sensible aux trois autres (la nitrofuranes, offloxacine et la gentamicine).

Les deux souches de *P. aeruginosa* sont résistantes à la fois, à la ceftazidine et l’amoxiclav, mais sensibles à la gentamicine. La souche pathogène *P. aeruginosa* montre également une sensibilité vis-à-vis de l’amikacine et est résistante à la doxycilline contrairement à la souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853 qui est sensible à cette dernière.

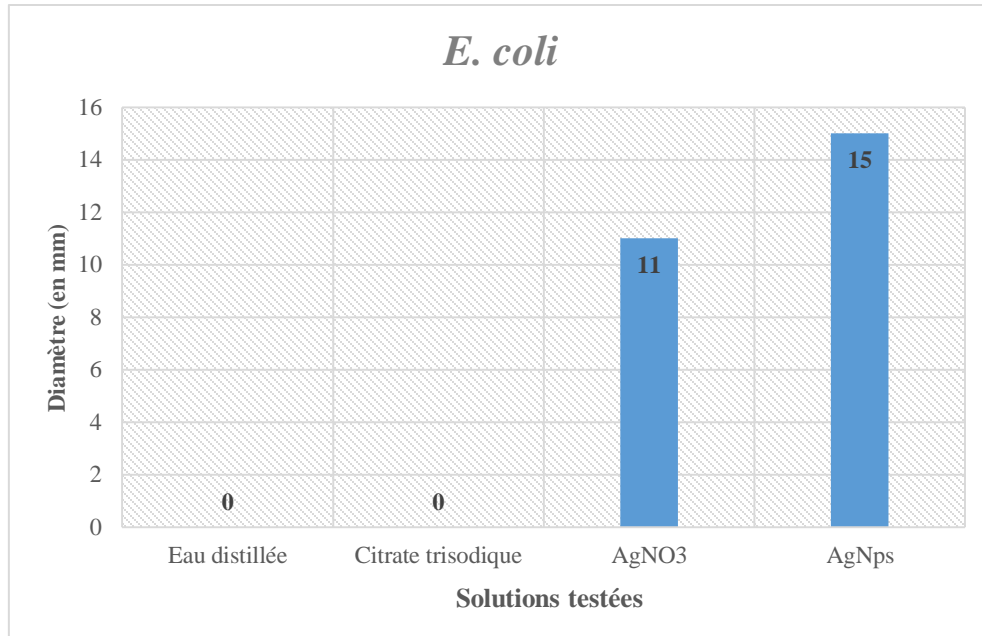
La souche *S. aureus* SARM montre une sensibilité à l’effet de l’amoxiclav et de la kanamycine. Par contre, les deux souches *S. aureus* SARM et *S. aureus* ATCC 25923 sont résistantes à l’amoxicilline, l’érythromycine et la pénicilline G.

## 2 Etude de l’activité antimicrobienne :

### 2.1 Caractérisation des nanoparticules d’argent :

La diffusion sur gélose de différents composants impliqués dans la synthèse des AgNps montre, après 18 à 24 h d’incubation, une croissance bactérienne autour des disques imbibés

respectivement de l'eau distillée et de citrate trisodique. En outre, des zones d'inhibition ont été observées autour des disques contenant le nitrate d'argent et les nanoparticules d'argent (**Fig. 14**).



**Figure 14 :** Histogramme illustrant l'effet caractéristique des nanoparticules d'argent

Cette figure montre une différence de l'effet antibactérien de chacune des substances impliquées dans la synthèse des nanoparticules d'argent. On observe que les disques imbibés d'eau distillée et de solution de trisodium citrate ne donnent aucune zone d'inhibition de la croissance bactérienne. Par contre une zone d'inhibition d'un diamètre de 11 mm est observée autour du disque contenant la solution d'AgNO<sub>3</sub>. Cette zone d'inhibition est encore plus grande (15 mm) autour du disque contenant la solution des AgNps.

## 2.2 Diffusion en milieu gélosé :

Après 24 heures d'incubation à 37°C, des zones d'inhibitions, caractérisées par l'absence totale d'une croissance bactérienne, sont apparues autour des disques imbibés de différentes concentrations de nanoparticules d'argent. Ces zones d'inhibition sont synonymes de l'effet inhibiteur des nanoparticules d'argent vis-à-vis de la souche bactérienne concernée. La mesure du diamètre de ces zones d'inhibition nous donne les valeurs montrées par l'histogramme (**Fig. 15 et 16**) et les résultats de l'analyse statiques sont consignés dans le tableau (**Tab. 9**).

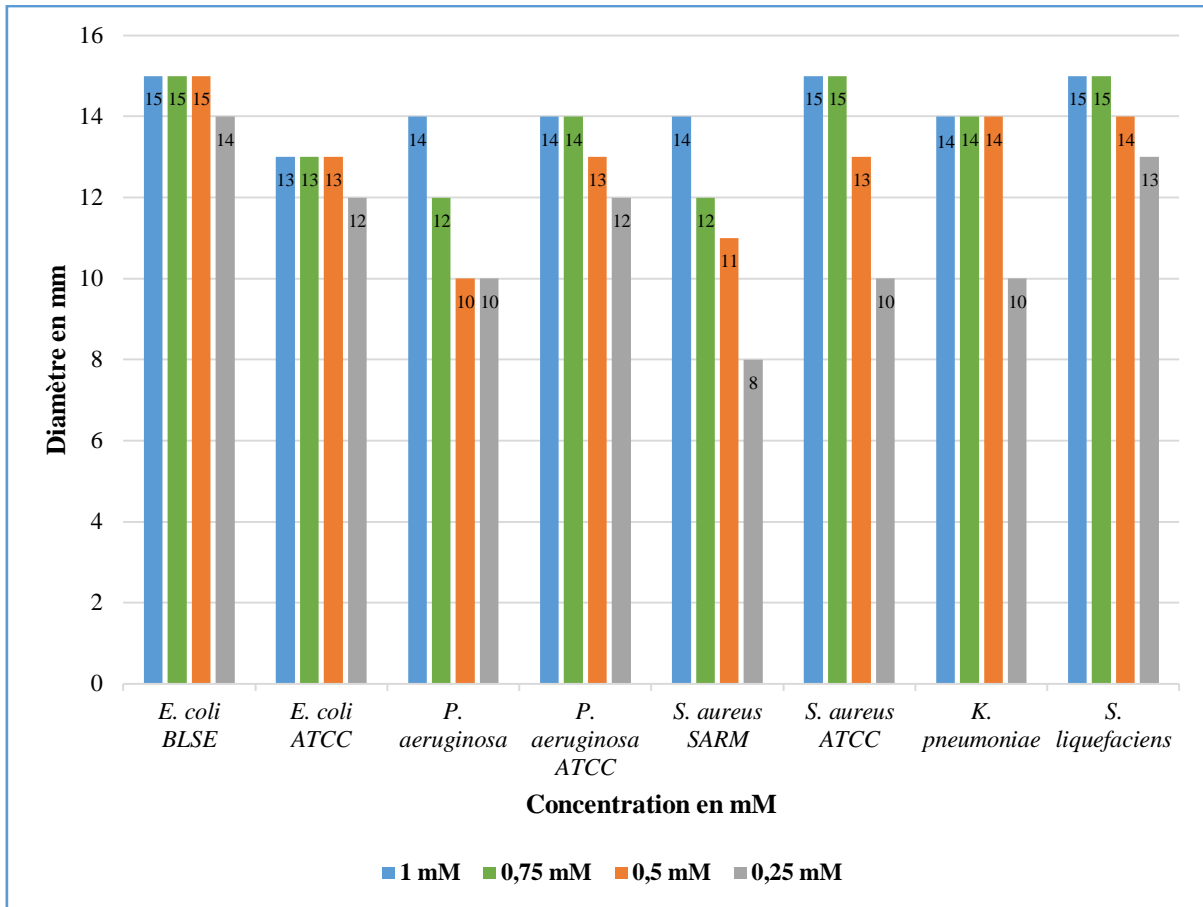


Figure 15 : Histogramme des zones d’inhibition générées par les disques imbibés d’AgNps

Tableau 9 : Statistique descriptive

| C | 1 mM   |      |    | 0,75 mM |      |    |      | 0,50 mM |      |      |    |      | 0,25 mM |      |    |      |      |
|---|--------|------|----|---------|------|----|------|---------|------|------|----|------|---------|------|----|------|------|
| D | 13     | 14   | 15 | 12      | 13   | 14 | 15   | 10      | 11   | 13   | 14 | 15   | 8       | 10   | 12 | 13   | 14   |
| % | 12,5   | 37,5 | 50 | 25      | 12,5 | 25 | 37,5 | 12,5    | 12,5 | 37,5 | 25 | 12,5 | 12,5    | 37,5 | 25 | 12,5 | 12,5 |
| M | 14,370 |      |    | 13,75   |      |    |      | 12,87   |      |      |    |      | 11,12   |      |    |      |      |
| E | 0,74   |      |    | 1,28    |      |    |      | 1,64    |      |      |    |      | 1,96    |      |    |      |      |

C : Concentration de nanoparticules en millimolaire (mM), D : Diamètre d’inhibition en millimètre (mm), % : Pourcentage, M : Moyenne, E : Ecart-type

La figure 15 montre l’histogramme des zones d’inhibition générées par l’effet des quatre concentrations de nanoparticules d’argent sur les différentes souches bactériennes testées. On observe que le diamètre de ces zones varie d’une manière dose-dépendante et en fonction de la



souche bactérienne. Ainsi pour *E. coli* BLSE, il est de 15 mm aux concentrations 1 mM, 0.75 mM et 0.50 puis diminue à 14 mm lorsque la concentration est 0.25 mM. La souche de référence *E. coli* ATCC 25922 testée montre par contre une légère diminution du diamètre de la zone d'inhibition qui stagne à 13 mm pour les concentrations 1 mM, 0.75 mM et 0.50 mM puis diminue à 12 mm pour 0.25 mM.

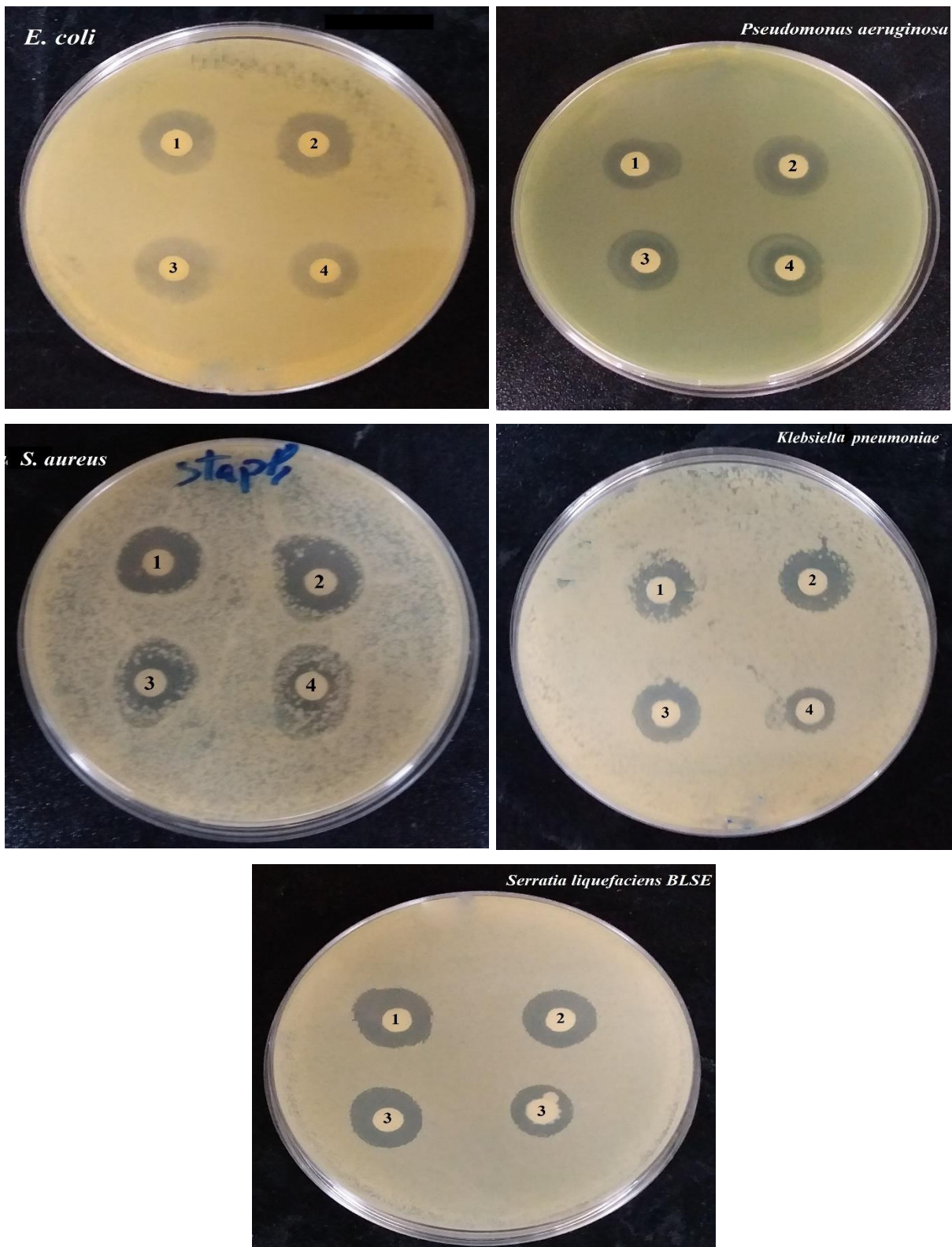
Pour la souche pathogène *P. aeruginosa*, le diamètre mesuré est 14 mm à la concentration 1 mM puis diminue à 12 mm pour 0.75 mM et enfin stagne à 10 mm aux concentrations 0.50 mM et 0.25 mM. La souche de référence *P. aeruginosa* ATCC 27853, en revanche, montre un diamètre de 14 mm aux concentrations 1 mM et 0.75 mM puis diminue respectivement en 13 mm pour 0.50 mM et 12 mm pour 0.25 mM.

Pour *S. aureus* SARM, seule souche Gram+ testée, le diamètre d'inhibition est de 14 mm à la concentration 1 mM, puis diminue à 12 mm pour 0.75 mM, 11 mm pour 0.5 mM et chute enfin à 08 mm lorsque la concentration est de 0.25 mM. Par ailleurs, le diamètre d'inhibition de la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923 stagne à 15 mm aux concentrations 1 mM et 0.75 mM puis diminue à 13 mm et 10 mm respectivement pour les concentrations 0.50 mM et 0.25 mM.

Pour la souche *Klebsiella pneumoniae*, le diamètre mesuré est de 14 mm aux concentrations 1 mM, 0.75 mM et 0.50 mM, puis diminue à 10 mm lorsque la concentration testée est 0.25 mM.

Pour *Serratia liquefaciens*, le diamètre est de 15 mm aux concentrations 1 mM et 0.75 mM, puis diminue à 14 mm à 0.50 mM et 13 mm lorsque la concentration est de 0.25 mM.

Le tableau 09 regroupe l'étude statistique décrivant l'effet de chacune des quatre concentrations de nanoparticules d'argent testées sur l'ensemble des souches bactériennes. Le résultat de cette étude montre, en moyenne, une zone d'inhibition de 14.37 mm induite sous l'effet de la concentration maximale de nanoparticules (1 mM). Cette valeur diminue graduellement en fonction de la concentration de nanoparticule. Elle est de 13.75 mm pour la concentration 0.75 mM, 12.87 mm pour celle de 0.50 mM et enfin 11.12 mm lorsque les souches sont testées avec 0.25 mM de nanoparticules d'argent.



**Figure 16 :** Illustrations de l'effet des disques imbibés de différentes concentrations d'AgNps

1 : 1mM ; 2 : 0.75mM ; 3 : 0.50mM ; 4 : 0.25 mM

### 2.3 Effets combinés de l'association ATB-AgNps :

Dans cette étude, trois antibiotiques sélectionnés ont été testés vis-à-vis des huit (8) souches dont cinq (5) souches cliniques et trois (3) souches de référence. La mesure du diamètre des zones d'inhibition générées, après 24h d'incubation, par les différents ATB seul ainsi que par leur association avec 1 mM d'AgNps suivi d'une évaluation de l'agrandissement de ces diamètres nous donne les résultats consignés dans les **tableaux 10 et 11 et la figure 17**.

**Tableau 10 :** Effet des antibiotiques associés aux AgNps vis-à-vis des souches cliniques

| ATB | <i>E. coli</i> BLSE |    |      | <i>P. aeruginosa</i> |    |      | <i>S. aureus</i> SARM |    |      | <i>K. pneumoniae</i> |    |      | <i>S. liquefaciens</i> |    |      |
|-----|---------------------|----|------|----------------------|----|------|-----------------------|----|------|----------------------|----|------|------------------------|----|------|
|     | A                   | B  | C    | A                    | B  | C    | A                     | B  | C    | A                    | B  | C    | A                      | B  | C    |
| AMX | 6                   | 14 | 4,44 | 6                    | 14 | 4,44 | 6                     | 16 | 6,11 | 7                    | 13 | 2,45 | 6                      | 14 | 4,44 |
| GEN | 25                  | 25 | 0    | 22                   | 22 | 0    | 26                    | 28 | 0,16 | 24                   | 27 | 0,27 | 30                     | 31 | 0,07 |
| CZ  | 6                   | 12 | 3    | 6                    | 13 | 3,69 | 6                     | 17 | 7,03 | 6                    | 11 | 2,36 | 6                      | 14 | 4,44 |

**Tableau 11 :** Effet des antibiotiques associés aux AgNps vis-à-vis des souches de référence

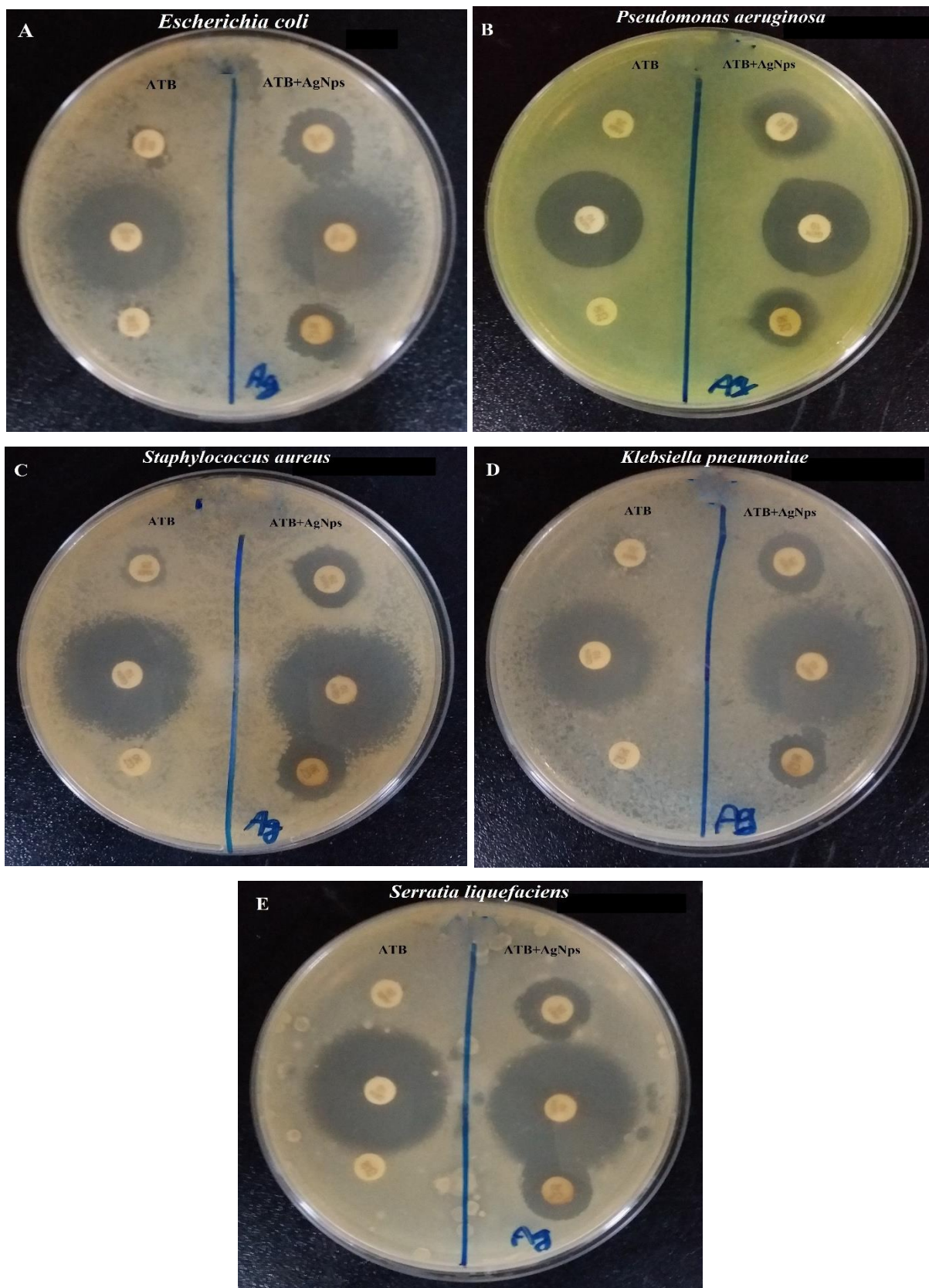
| ATB | <i>E. coli</i> ATCC 25922 |    |      | <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 |    |      | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 |    |      |
|-----|---------------------------|----|------|---------------------------------|----|------|-----------------------------|----|------|
|     | A                         | B  | C    | A                               | B  | C    | A                           | B  | C    |
| AMX | 10                        | 15 | 1,25 | 6                               | 11 | 2,36 | 8                           | 13 | 1,64 |
| GEN | 30                        | 31 | 0,07 | 22                              | 23 | 0,09 | 27                          | 29 | 0,15 |
| CZ  | 6                         | 14 | 4,44 | 6                               | 10 | 1,78 | 6                           | 13 | 3,69 |

**Note :** (A) : Diamètre (en mm) de la zone d'inhibition de l'ATB.

(B) : Diamètre (en mm) de la zone d'inhibition de l'association ATB-AgNps.

(C) : Accroissement du diamètre de la zone d'inhibition =  $(B^2 - A^2) / A^2$

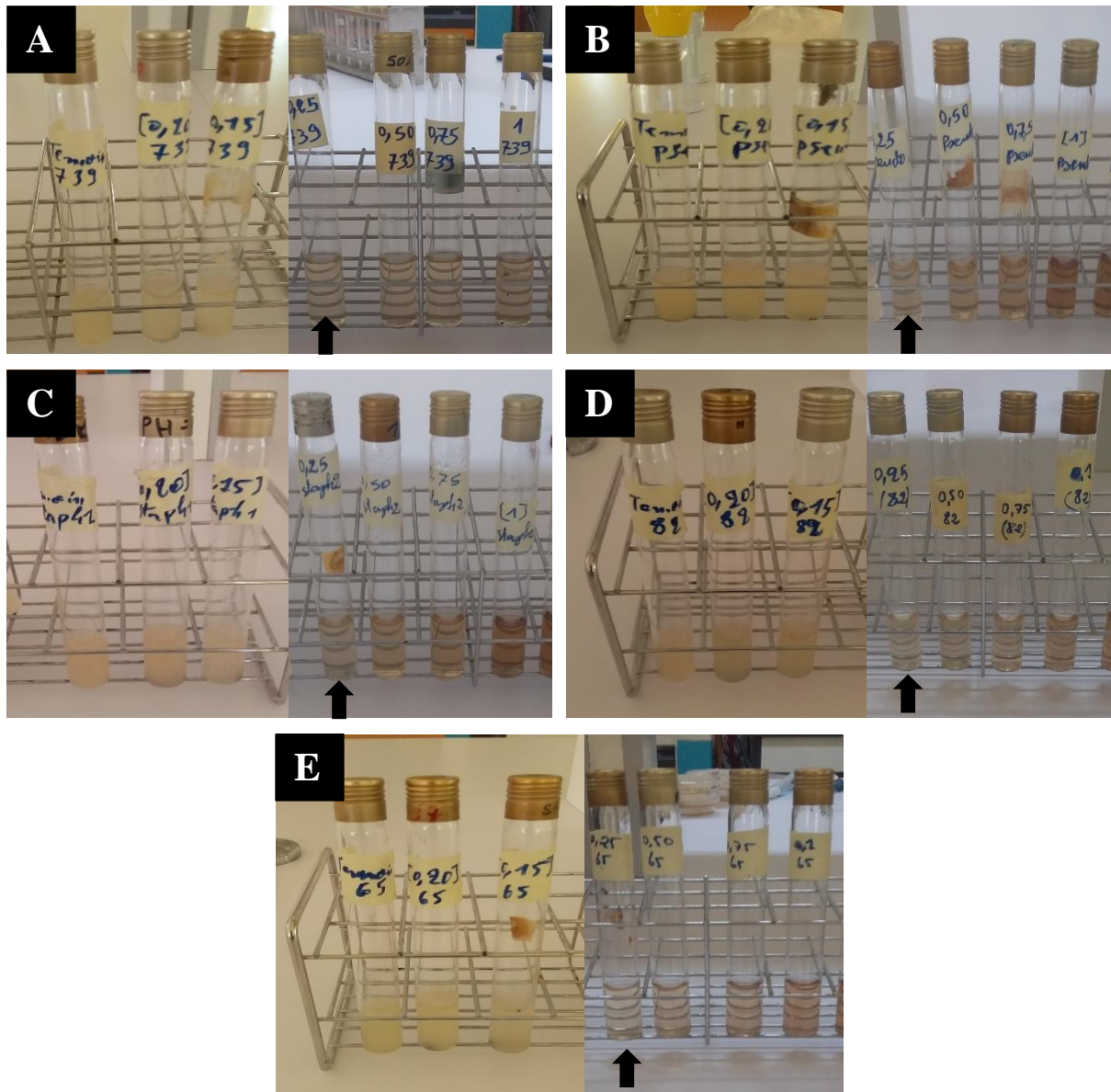
Parmi les trois antibiotiques testés, l'amoxicilline et la céfazoline ont montré une augmentation considérable de la zone d'inhibition lorsqu'ils sont associés aux AgNps et ce vis-à-vis de toutes les souches, aussi bien cliniques que les souches de référence. Par contre, la gentamicine, lorsqu'associé aux AgNps, a montré un accroissement plus faible, parfois inexistant, vis-à-vis des souches testées.



**Figure 17 :** Illustrations de l'effet combiné de l'association ATB-AgNps

## 2.4 Activité antibactérienne en milieu liquide :

Cette étape, réalisée sur bouillon MH en présence de différentes concentrations de nanoparticules en solution, nous a permis de déterminer nos seulement à l'œil nu (**Fig. 18**), mais aussi par la mesure de l'indice d'inhibition, la concentration minimale de AgNps qui inhibe la croissance bactérienne en milieu liquide. Les résultats de l'évaluation de l'indice d'inhibition, ayant facilité l'interprétation de cette étude, sont mentionnés dans le **Tableau 12**.



**Figure 18** : Illustrations de la CMI des différentes souches testées en milieu liquide

**A** : *E. coli* ; **B** : *P. aeruginosa* ; **C** : *S. aureus* ; **D** : *K. pneumoniae* ; **E** : *S. liquefaciens*.

**Tableau 12 :** Indice d'inhibition des différentes concentrations de nanoparticules d'argent

| Concentrations<br>Souches | Concentrations |         |         |         |         |         |
|---------------------------|----------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|                           | 1 mM           | 0,75 mM | 0,50 mM | 0,25 mM | 0,20 mM | 0,15 mM |
| <i>E. coli BLSE</i>       | 1,25           | 1,22    | 1,14    | 1,11    | 0,24    | 0       |
| <i>E. coli ATCC</i>       | 1,26           | 1,23    | 1,09    | 1,05    | 0,74    | 0,32    |
| <i>P. aeruginosa</i>      | 1,09           | 1,06    | 1,02    | 1       | 0,08    | 0,03    |
| <i>P. ATCC</i>            | 1,2            | 1,15    | 1,16    | 1,12    | 0,05    | 0,03    |
| <i>S. aureus</i>          | 1,22           | 1,2     | 1,15    | 1,07    | 0,43    | 0,39    |
| <i>S. ATCC</i>            | 1,25           | 1,23    | 1,13    | 1,01    | 0,05    | 0,04    |
| <i>K. pneumoniae</i>      | 1,21           | 1,16    | 1,08    | 1,08    | 0,18    | 0,18    |
| <i>S. liquefaciens</i>    | 1,21           | 1,16    | 1,11    | 1,03    | 0,54    | 0,15    |

La figure 18 montre que la concentration minimale des AgNps qui inhibe la croissance bactérienne en milieu liquide (indiquée par la flèche noire) est 0.25 mM, aussi bien pour les souches clinique pathogènes que pour les souches de référence testées. Cette observation est confirmée par les résultats du tableau 12 qui résume les indices d'inhibition de chacune des concentrations. En effet après 24h d'incubation des différentes souches bactérienne en présence de concentrations 0.15 mM et 0.20 mM, le milieu est apparu trouble et les indices d'inhibition évalués varient autour de 0 montrant une absence d'inhibition de la croissance bactérienne.

Par ailleurs, à partir de la concentration 0.25 mM jusqu'à 1 mM, les observations montrent une absence de poussée bactérienne se traduisant, soit une par une inhibition totale de croissance (II = 1), soit par une lyse cellulaire (II > 1).

## Discussion :

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

Au cours de cette étude, nous avons évalué, *in vitro*, l'efficacité antimicrobienne des AgNps vis-à-vis de 5 souches bactériennes pathogènes multi-résistantes représentatives des principaux genres bactériens isolés de l'environnement hospitalier dont une bactérie Gram positif (SARM), une bactérie Gram négatif non entérobactérie *P. aeruginosa* et des bactéries Gram négatif entérobactéries à savoir *E. coli* BLSE, *K. pneumoniae* BLSE, *S. liquefaciens* BLSE, en comparaison à des souches de référence correspondantes comme la *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, la *P. aeruginosa* ATCC 27853 et la *E. coli* ATCC 25922.

De prime abord, nous avons réalisé un antibiogramme de chaque souche bactérienne afin de déterminer les ATB auxquels elles montrent une sensibilité ou une résistance. Les résultats du **tableau 6** montrent une résistance des souches *E. coli*, *K. pneumoniae* et *S. liquefaciens* à trois ATBs de la famille des  $\beta$ -lactamines : l'amoxiclav, la céfazoline (céphalosporine de 1<sup>ère</sup> génération), la ceftazidime (céphalosporine de 3<sup>ème</sup> génération). Il s'agit donc d'une multi-résistance acquise car ces souches sont naturellement sensibles à ces ATBs, à l'exception de la souche *S. liquefaciens* qui montre parfois une certaine résistance naturelle à l'amoxiclav (Joffin et Leyral, 2003). Bien qu'il existe d'autres tests complémentaires, ces observations laissent déjà penser à une possible production de l'enzyme  $\beta$ -lactamase par ces trois souches bactériennes, d'où leur identification comme productrice de la  $\beta$ -lactamase à spectre élargi (ou étendu) par le personnel du laboratoire de microbiologie de l'hôpital Ibn Zohr. Par ailleurs, le **tableau 7** montre une résistance acquise des souches *P. aeruginosa* à l'amoxiclav, ce qui n'est pas le cas pour la ceftazidime vis-à-vis de la quelle elles sont naturellement résistante. La résistance de la souche de référence *S. aureus* ATCC 25923, indépendamment de celle de *S. aureus* SARM (**Tab. 8**), à la kanamycine (aminoside) et la pénicilline G ( $\beta$ -lactamine) semble être une résistance acquise pendant la durée de conservation, car *S. aureus* est naturellement sensible à ces ATBs.

Après la synthèse des nanoparticules et avant d'entamer les études sur l'activité antimicrobienne, nous avons réalisé un essai de caractérisation des AgNps. La **figure 14** montre que l'eau distillée, utilisée comme contrôle négatif, et la solution de citrate trisodique n'ont aucun effet inhibiteur de la croissance bactérienne. Par contre la solution de nitrate d'argent présente une certaine activité inhibitrice de la croissance bactérienne qui est amplifiée lorsqu'elle est appliquée à l'échelle nanométrique (AgNps). Ce résultat est en concordance avec celui de **Li et al., 2011**. En effet à la suite de leur étude sur l'activité antibactérienne des AgNps sur les *S. aureus*, les auteurs affirmèrent que les effets antimicrobiens de l'argent sont augmentés par son application sous forme de nanoparticules. Il est connu que l'activité antimicrobienne élevée des AgNps par rapport aux sels d'argent est due à la très grande surface spécifique des AgNps, qui garantit un bon contact de l'argent avec les microorganismes (**Rai et al., 2009**). D'autre part, certaines études ont aussi montré que les AgNps conservent plus longtemps leur efficacité bactéricide, faisant ainsi ressortir les usages potentiels de cette technologie pour des applications antimicrobiennes de longue durée (**Damm et al., 2007 ; Zeng et al., 2007**). Nous pouvons dire également que l'application des AgNps semble beaucoup moins coûteuse car elle ne nécessite que l'utilisation d'une petite quantité d'AgNO<sub>3</sub> pour un volume final plus considérable de nanoparticules d'argent.

Afin d'étudier l'effet antibactérien des AgNps, nous avons procédé par l'application d'un certain nombre de méthodes. La première consistait à déterminer l'effet inhibiteur de concentrations d'AgNps par diffusion sur milieu gélosé préalablementensemencé. La **figure 15**, qui résume les résultats de cet essai, montre que le diamètre d'inhibition le plus large mesuré sur la surface de la gélose est de 15 mm. Ce seuil est atteint notamment avec les souches *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae* et *S. liquefaciens* en des concentrations distinctes et est reparti de la manière suivante : 4 fois (50%) avec la concentration 1 mM, 3 fois (3.75%) avec la concentration 0.75 mM et une fois (12.5%) avec la concentration 0.50 mM. Ainsi, on peut dire que l'effet antibactérien des AgNps est dose dépendant ; ce qui signifie que plus la concentration d'AgNps est élevée en solution, plus leur activité antibactérienne est maximale. Ce résultat est en accord avec celui de **Rajeshkumar et Malarkodi, 2014**. Ces derniers affirmèrent que le seuil d'inhibition maximale de la croissance bactérienne est atteint avec la plus forte concentration d'AgNps testée.

En outre, d'autres études (**Kim et al., 2007 ; Shrivastava et al., 2009**) ont montré que les AgNps exercent une activité antibactérienne plus élevée contre *E. coli* que *S. aureus*. Les



auteurs ont affirmé que ce résultat est probablement dû à la différence de structure de la paroi cellulaire entre les bactéries Gram positif et Gram négatif. La paroi cellulaire d'une bactérie Gram positif est composée d'une couche épaisse de peptidoglycane, constituée de chaînes polysaccharidiques linéaires réticulé par de courts peptides, formant ainsi une structure plus rigide conduisant à une pénétration difficile des AgNps contrairement aux bactéries Gram négatif, où la paroi cellulaire possède une couche plus mince de peptidoglycane. Nos résultats sont en contradiction avec cette affirmation car nous avons pu remarquer que l'activité antibactérienne des AgNps est proportionnelle entre les différentes souches testées, qu'elles soient sensibles ou pathogènes, à Gram positif ou à Gram négatif. Nous pensons toutefois que cela est probablement lié à la taille et/ou la morphologie des AgNps qui sont des facteurs déterminant dans leur pénétration à travers la paroi bactérienne, et par conséquent, dans l'exercice de l'activité antibactérienne. Les plus petits AgNps, ayant une plus grande surface pour l'interaction avec les bactéries, ont une activité antibactérienne efficace par rapport au plus grand AgNps (**Choi et al., 2013**). Bien que nous n'ayons pas pu observer les nanoparticules synthétisés afin de caractériser leur morphologie et déterminer leur taille réelle, à cause notamment d'un manque de microscope électronique en notre possession, nous estimons que les AgNps dont nous disposons sont probablement de taille plus petite par rapport à celles utilisées lors de ces études précédentes. En effet les petites nanoparticules ont un rapport surface / volume plus élevé et peuvent pénétrer plus facilement dans les surfaces biologiques (**Morones et al., 2005 ; Panacek et al., 2006**). Ce qui rend plus facile leur pénétration à travers n'importe quel type de paroi bactérienne.

En second lieu, nous avons appliqué la solution de nanoparticules de concentration 1 mM sur trois antibiotiques (amoxicilline, gentamicine et céfazoline) afin de déterminer leur activité synergique vis-à-vis des différentes souches bactériennes. Les résultats obtenus (**Tab. 10 et 11**) ont confirmé que toutes les bactéries, qui étaient normalement résistantes à deux des trois ATBs (AMX et CZ), se sont avérées sensibles à ces antibiotiques en présence d'AgNps avec un accroissement assez significatif de la zone d'inhibition allant de 1.25 à 7.03 (3.6 en moyenne). Par ailleurs, l'association des AgNps avec la gentamicine n'a montrée qu'un effet minime dans notre allant de 0 à 0.27 (0.1 en moyenne). Nous pensons que cela est dû au fait que toutes les souches testées étaient déjà sensible à cet ATB. Le résultat de cet essai est confirmé dans plusieurs études (**Birla et al., 2008 ; Singh et al., 2013 ; Naqvi et al., 2013**). En effet **Naqvi et al. 2013** ont étudié l'activité combinée des AgNps avec la ciprofloxacine, imipénème, gentamycine, triméthoprime et vancomycine

contre les BMR comme *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* et *Bacillus spp.* Les résultats de l'étude ont montré un accroissement de 0,2 à 7.02 (en moyenne 2,8) de la zone d'inhibition générée par l'action des antibiotiques en association avec les AgNps. La plus grande activité a été exercée par AgNps+ciprofloxacine, suivi par AgNps+imipenem, tandis que l'activité la plus faible a été démontrée par AgNps+vancomycine. L'étude a également révélé que les AgNps étaient des agents antimicrobiens plus puissants contre les BMR par rapport aux antibiotiques usuels. Dans une autre étude sur l'inhibition de la croissance du SARM, **Saeb et al., 2014** ont confirmé l'activité accrue des AgNps associés à la vancomycine (avec une zone d'inhibition de 12,26 mm) contre le SARM, par rapport à l'activité indépendante des AgNps (9,66 mm) et de la vancomycine (8,76 mm).

**Gopinath et al., 2015** ont proposé un mécanisme expliquant l'effet synergique entre l'ampicilline (AMP) et les AgNps contre des bactéries productrices de  $\beta$ -lactamases résistantes à l'ampicilline. Après traitement des souches résistantes avec le complexe AgNps-AMP, ils constatèrent que les AgNps ont provoqué la destruction de la paroi cellulaire, suivie par fuite du contenu intracellulaire ayant entraîné la mort des agents pathogènes. D'autre part, l'ampicilline peut pénétrer dans la cellule à travers la paroi cellulaire endommagée par l'effet des AgNps et provoque une inhibition irréparable de l'enzyme transpeptidase, entraînant l'arrêt final de la synthèse de la paroi cellulaire. Cette action en deux temps du complexe AgNps-AMP représente clairement les possibilités de traiter plus efficacement les infections bactériennes causées par les BMR résistant à l'AMP qu'avec l'ampicilline seule.

Un mécanisme similaire a été décrit pour le complexe amoxicilline-AgNps, dans lequel l'inhibition de la croissance des BMR a été attribuée à des modifications structurelles apportées à la surface des AgNps en raison de la formation d'un environnement complet des molécules d'amoxicilline. La liaison des groupes hydroxyles et amides de la molécule d'amoxicilline à une nanoparticule d'argent par chélation a pour résultat d'empêcher la décondensation de l'ADN, suivi d'une dégradation de l'ADN (**Fayaz et al., 2009**). De plus, **Duran et al., 2010** ont affirmé que la liaison des AgNps aux ponts disulfures des sites de liaison de l'amoxicilline serait le mécanisme responsable de l'activité synergique du complexe AMX-AgNps.

Au terme de cette étude, nous avons déterminé l'activité antibactérienne des AgNps en milieu liquide (bouillon MH) afin d'évaluer la concentration minimale inhibitrice des

souches. Les résultats (**Fig. 18 et Tab. 12**) ont montré que les AgNps exerçaient une activité antibactérienne se traduisant, dans la plupart des cas, par une lyse cellulaire avec toutes les concentrations  $\geq 0.25$  mM (concentration minimale inhibitrice). Nous pouvons donc en déduire que l'activité antibactérienne des AgNps se manifeste par un effet bactéricide élevé. Cette forte activité bactéricide est certainement due aux cations d'argent libérés par les AgNps qui agissent comme des réservoirs à l'agent bactéricide  $\text{Ag}^+$ . De grands changements dans la structure de la membrane des bactéries, résultant de leur interaction avec les cations d'argent, entraînent une augmentation de la perméabilité membranaire des bactéries (**Sondi et Salopek-Sondi, 2004**).

L'activité bactéricide des AgNps peut être associée à de multiples mécanismes. Premièrement, les AgNps peuvent agir directement en pénétrant dans les cellules microbiennes. Deuxièmement, les cellules microbiennes peuvent être affectées par les ions  $\text{Ag}^+$ . Ces ions inhibent les enzymes de la chaîne respiratoire, par leurs effets sur la phosphorylation oxydative, et interrompent le transport transmembranaire des électrons (**Rajeshkumar et Malarkodi, 2014**). Par ailleurs, certains chercheurs estiment que la charge positive des ions  $\text{Ag}^+$  joue un rôle principale dans l'attraction électrostatique entre la membrane cellulaire du micro-organisme chargée négativement et les nanoparticules chargées positivement, ce qui détermine l'effet des AgNps sur la membrane cellulaire (**Kim et al., 2007**). Cependant, ces données ne sont pas suffisantes pour expliquer le mécanisme de l'activité antimicrobienne des AgNps (**Shurygina et al., 2016**).

Ainsi, de nombreux chercheurs pensent que les AgNps peuvent interagir directement avec la membrane cellulaire, entraînant des effets toxiques (**Khan et al., 2011 ; McShan et al., 2014**). Cependant, le mécanisme d'interaction entre les composants des membranes bactériennes et les AgNps n'est toujours pas clair. **Danilczuk et al., 2006** estiment que l'activité antimicrobienne est causée par des radicaux libres générés à la surface des AgNps. **Grigor'eva et al., 2013** ont constaté que les AgNps étaient adsorbées sur la membrane externe des bactéries Gram négatif (*Salmonella Typhimurium*) et sur la paroi cellulaire des bactéries Gram positif (*S. aureus*). Elles peuvent pénétrer et s'accumuler dans les cellules bactériennes sans agrégation et endommager le cytoplasme ou interagir avec l'ADN (**Rai et al., 2009**). Dans le même temps, **Lara et al., 2010** ont suggéré un mécanisme d'action bactéricide différent des AgNps. Ils croient que les AgNps inhibent la synthèse des composants de la paroi cellulaire, la synthèse des protéines étant médiée par la sous-unité 30S du ribosome, ainsi que la synthèse des acides nucléiques.

# **Conclusion et perspectives**

## Conclusion et perspectives :

Les études antérieures ont montré que l'antibiothérapie chez l'homme s'avère de plus en plus inefficace pour lutter contre des infections liées à des germes ayant acquis une ou plusieurs résistances aux antibiotiques.

L'objectif visé par cette étude était de démontrer l'efficacité des nanoparticules d'argent contre les bactéries multi-résistantes ainsi que l'effet synergique de leur association avec les antibiotiques.

Les résultats de notre étude sont concluants et encourageants car ils prouvent que les nanoparticules d'argent exercent une forte activité bactéricide envers différentes bactéries à Gram positif et négatif aussi bien sur une surface solide que dans un milieu liquide. Ce qui confirme que les AgNps se révèlent être des agents antibactériens efficaces, quels que soient les mécanismes de résistance aux médicaments qui existent dans les microorganismes pathogènes humains, et pourraient constituer un candidat potentiel en tant qu'agents bactéricides à large spectre et efficaces.

De plus, leur combinaison avec les antibiotiques usuels conduit un accroissement significatif de l'efficacité de ces derniers face aux BMR, ce qui est d'autant plus meilleur et plus enclin à être traduit en d'importantes options thérapeutiques et cliniques à l'avenir. Par ailleurs, ces associations nécessitent des essais approfondis sur des animaux avant de pouvoir être testées contre les infections humaines. Nous sommes convaincus que ces effets synergiques des ATB avec les AgNps peuvent ouvrir de nouvelles perspectives dans le traitement des pathogènes multi-résistants rencontrés en milieu hospitalier.

Cependant bien que les résultats soient satisfaisants, cette étude présente quelques limites et nécessite plus d'approfondissement afin d'atteindre l'objectif final, à savoir, la possibilité d'une application médicale, voire pharmaceutique des nanoparticules d'argent. Ainsi pour les études futures, nous suggérons comme perspectives :

- Plus de moyens nécessaires à la caractérisation des nanoparticules afin déterminer la taille idéale de nanoparticules d'argent applicable à grande échelle ;
- Une évaluation de leur activité mutagène qui pourra s'avérer utile pour d'éventuelles recherches scientifiques ;
- Et enfin une évaluation d'options possibles nécessaires à leur administration *in vivo*.

Nous espérons, à travers ce travail, avoir contribué à la recherche thérapeutique.

# Références bibliographiques

## Références bibliographiques

**Ahmed S., Ahmad M., Swami B.L., et al., (2016).** A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *J AdvRes.*, 7:17–28.

**Andrieux - Ledier A., (2012).** Elaboration de nanoparticules d'argent par réduction de sels métallo-organiques : contrôle de taille, stabilité, organisation et propriétés physiques. Thèse de doctorat en Chimie-physique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, France, 165p.

**Andujar P., Lanone S., Brochard P., Boczkowski J., (2009).** Effets respiratoires des nanoparticules manufacturées. INSERM, Unité 955, Créteil, F-94000, France, 39p.

**Banerjee M., Mallick S., Paul A., Chattopadhyay A., Ghosh S.S., (2010).** Heightened reactive oxygen species generation in the antimicrobial activity of a three component iodinated chitosan-silver nanoparticle composite. *Langmuir*; 26:5901-8.

**Birla S.S., Tiwari V.V., Gade A.K., Ingle A.P., Yadav A.P., Rai M.K., (2008).** Fabrication of silver nanoparticles by *Phoma glomerata* and its combined effect against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Lett Appl Microbiol.*; 48(2009):173-179. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02510.x

**Bouvier-Slekovec C., (2013).** Prévention et maîtrise des infections nosocomiales selon trois approches appliquées à différents niveaux d'action. Thèse de doctorat en Santé publique et épidémiologie. Université de Franche-Comté, France, 224p.

**Bovenkamp G.L., Zenzen U., Krishna K.S., Hormes J., Prange A., (2013).** X-Ray Absorption Near-Edge Structure (XANES) Spectroscopy Study of the Interaction of Silver Ions with *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Am Soc Microbiol.*; 79(20):6385-6390. doi:10.1128/AEM.01688-13.

**Butler K.S., Peeler D.J., Casey B.J., Dair B.J., Elespuru R.K., (2015).** Silver nanoparticles: correlating nanoparticle size and cellular uptake with genotoxicity. *Mutagenesis*, 30:577-591. doi:10.1093/mutage/gev020.

**Cavassin E.D., de Figueiredo L.F.P., Otoch J.P., et al., (2015).** Comparison of methods to detect the in vitro activity of silver nanoparticles (AgNP) against multidrug resistant bacteria. *J Nanobiotechnology*; 13(1):1-16. doi:10.1186/s12951-015-0120-6.

**Chaibi A., Ababouch L.H., Busta F.F., (1996).** Inhibition of Bacterial Spores and Vegetative Cells by Glycerides. *J Food Prot.*; 59(7):716-722.

**Choi J., Park J., Khil M., Gwon H., (2013).** Characterization and Antimicrobial Property of Poly (Acrylic Acid) Nanogel Containing Silver Particle Prepared by Electron Beam. *Int J Mol Sci.*; 14:11011-11023. doi:10.3390/ijms140611011

**Choi O., Hu Z., (2008).** Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environ. Sci. Technol.*, 42: 4583–4588.

**Chudobova D., Nejdil L., Gumulec J., Krystofova O., (2013).** Complexes of Silver ( I ) Ions and Silver Phosphate Nanoparticles with Hyaluronic Acid and / or Chitosan as Promising Antimicrobial Agents for Vascular Grafts. *Int J Mol Sci.*; 14:13592-13614. doi:10.3390/ijms140713592.

**Coustès T., (2016).** Loi d'avenir agricole, réglementation du médicament vétérinaire et lutte contre l'antibiorésistance. Thèse de doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil, France, 106p.

**Dali A. A., (2015).** Infection nosocomiale à bactéries multirésistantes (BMR) en réanimation adulte l'EHUO profil épidémiologique, facteurs de risque et facteurs pronostics. Thèse de doctorat en sciences médicales. Université Oran 1, Algérie, 214p

**Damm C., Munsted H., Rosch A., (2007).** Long-term antimicrobial polyamide6/silver nanocomposites. *Journal of Materials Science*; 42:60-67.

**Danilczuk M., Lund A., Sadlo J., Yamada H., Michalik J., (2006).** Conduction electron spin resonance of small silver particles. *Spectrochim Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.*; 63:189-91.

**Debabza M., (2015).** Emergence en milieu hospitalier des bacilles Gram négatifs multirésistants aux antibiotiques : étude bactériologique et moléculaire. Thèse de doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Badji Mokhtar-Annaba, Algérie, 259p.

**Deredjian A., (2010).** Les métaux lourds dans les écosystèmes anthropisés : une pression favorisant la sélection de pathogènes opportunistes résistants à des antibiotiques ?. Thèse de doctorat en Sciences agricoles. Université Claude Bernard - Lyon I, France, 335p.



**Duran N., Marcato P.D., De Conti R., Alves O.L., Costa F.T.M., Brocchi M., (2010).** Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J Braz. Chem. Soc.*; 21:949-59.

**El-faham A., Elzatahry A.A., Al-Othman Z.A., Elsayed E.A., (2014).** Facile method for the synthesis of silver nanoparticles using 3-hydrazino-isatin derivatives in aqueous methanol and their antibacterial activity. *Int J Nanomedicine*; 9:1167-1174.

**Ema M., Okuda H., Gamo M., et al. (2017).** A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reprod Toxicol*, 67:149–164.

**Fayaz A.M., Balaji K., Girilal M., Yadav R., Kalaichelvan P.T., Venketesan R., (2009).** Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Nanomedicine*; 6(1):1039.

**Gopinath P.M., Narchonai G., Dhanasekaran D., Ranjani A., Thajuddin N., (2015).** Mycosynthesis, characterization and antibacterial properties of AgNPs against multidrug resistant (MDR) bacterial pathogens of female infertility cases. *Asian J. Pharma. Sci.*; 10:138-45.

**Grigor'eva A., Saranina I., Tikunova N., Safonov A., Timoshenko N., Rebrov A., et al., (2013).** Fine mechanisms of the interaction of silver nanoparticles with the cells of *Salmonella Typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *BioMetals*; 26:479-88.

**Guerin-Fauble V., (2010).** Les mécanismes de résistance des bactéries aux antibiotiques. *In: Journées Nationales GTV*, Lille, p. 93–101.

**Hervé-Bazin B., (2007).** Les nanoparticules : Un enjeu majeur pour la santé au travail. EDP Sciences. France, 704p. ISBN: 978-2-86883-995-4

**Joffin J.N. et Leyral G., (2003).** Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine. 3<sup>ème</sup> édition. Bordeaux. 320p. ISBN: 2-86617-387-2.

**Katva S., Das S., Singh M.H., Jyoti A., Kaushik S., (2018).** Antibacterial Synergy of Silver Nanoparticles with Gentamicin and Chloramphenicol against *Enterococcus faecalis*. *Pharmacogn Mag.*; 13(4):S828–S833. doi:10.4103/pm.pm\_120\_17.

**Khan S.S., Mukherjee A., Chandrasekaran N., (2011).** Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. *Coll Surf B Biointerfaces*; 87:129-38.

- Kim J.S., Kuk E., Yu N., et al., (2007).** Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine*; 3:95-101. doi:10.1016/j.nano.2006.12.001
- Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J., (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*; 8: 423-435.
- Lara H.H., Ayala-Nunez N.V., Turrent L.C.I., Padilla C.R., (2010).** Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.*; 26:615-21.
- Li, W.R.; Xie, X.B.; Shi, Q.S.; Duan, S.S.; Ouyang, Y.S.; Chen, Y.B., (2011).** Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *Biometals*, 24, 135–141.
- Li R., Chen J., Cesario T.C., Wang X., Yuan J.S., Rentzepis P.M., (2016).** Synergistic reaction of silver nitrate, silver nanoparticles, and methylene blue against bacteria. *PNAS*; 113(48):13612–13617. doi:10.1073/pnas.1611193113.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., et al., (2012).** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
- Mainardi J.L., Shlaes D.M., Goering R.V., Shlaes J.H., Acar J.F., Goldstein F.W., (1995).** Decreased teicoplanin susceptibility of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Infect. Dis.*; 171 : 1646-50.
- Mathur P., Jha S., Ramteke S., Jain N.K., (2018).** Pharmaceutical aspects of silver nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*; 46(S1):S115-S126. doi:10.1080/21691401.2017.1414825
- McShan D., Ray P.C., Yu H., (2014).** Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal*; 22(1):116-27.
- Mishra V., Sharma R., Jasuja N.D., (2014).** A Review on Green Synthesis of Nanoparticles and Evaluation of Antimicrobial Activity. *International Journal of Green and herbal chemistry*. Vol.3, No.1, 081-094. E-ISSN: 2278-3229.
- Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Holt K., Kouri J.B., Ramírez J.T., Yacaman M.J., (2005).** The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*; 16(10):2346–2353.

- Mtimet I., (2012).** Elaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent. Thèse de doctorat en Chimie Macromoléculaire. INSA de Rouen, France, 157p.
- Muller A., (2017).** Bon usage des antibiotiques : résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé. Médicaments. Thèse de doctorat en Sciences de la vie et de la santé. Université Bourgogne Franche-Comté, France, 194p.
- Murthy R.M., (2001).** Implementation of Strategies to Control Antimicrobial Resistance. *Chest.*;119(2):405S-411S. doi:10.1378/chest.119.2
- Mutschler A., (2017).** Nouveaux concepts de revêtements antimicrobiens à base de peptides naturels et polypeptides appliqués aux dispositifs médicaux. Thèse de doctorat en Chimie-Physique. Université de Strasbourg, France, 205p.
- Naqvi H.S.Z., Kiran U., Ali M.I., et al., (2013).** Combined efficacy of biologically synthesized silver nanoparticles and different antibiotics against multidrug-resistant bacteria. *Int J Nanomedicine*; 8:3187-3195.
- Neal A. L., (2008).** What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17(5):362–371.
- Neely A.N., Holder I.A., (1999).** Antimicrobial resistance. *Burns* 25, 17–24.
- Normark B.H., Normark S., (2002).** Evolution and spread of antibiotic resistance (Review Article). *J Intern Med*; 252: 91–106.
- Padget M., (2016).** Antibiotic resistance among children in low-income countries - Investigating community antibiotic consumption. Human health and pathology. Université Paris-Saclay, France, 175p.
- Panacek A., Kvittek L., Pucek R., Kolar M., Vecerova R., Pizurova N., et al., (2006).** Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J Phys Chem B*; 110(33):16248-53.
- Perreault F., (2012).** Toxicité des nanoparticules métalliques chez différents modèles biologiques. Thèse de doctorat en sciences de l'environnement. Université du Québec à Montréal, Canada, 225p.

- Pillai Z.S., Kamat P.V., (2004).** What Factors Control the Size and Shape of Silver Nanoparticles in the Citrate Ion Reduction Method? *J Phys Chem B.*; 108:945-951. doi:10.1021/jp037018r
- Prabhu S., Poulouse E.K., (2012).** Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications and toxicity effects. *Int Nano Lett*; 2:32.
- Prasad R., (2016).** *Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology.* Springer International publishing, Switzerland, P: 141-149. ISBN: 978-3-319-422990-8
- Rafique M., Sadaf I., Rafique M.S., et al., (2016).** A review on green synthesis of silver nanoparticles and their applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.*, 45:1–20.
- Rai M., Kon K., Gade A., et al., (2016).** Antibiotic Resistance: Can Nanoparticles Tackle the Problem? Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-803642-6.00006-X
- Rai M.K., Yadav A.P., Gade A.K., (2009).** Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.*; 27(1):7682.
- Rajeshkumar S., Malarkodi C., (2014).** In Vitro Antibacterial Activity and Mechanism of Silver Nanoparticles against Foodborne Pathogens. *Bioinorg Chem Appl.*:10. doi:10.1155/2014/581890.
- Rybak M.J., (2004).** Bacterial resistance to antimicrobial agents: An update. *Pharmacotherapy*; 24(12 pt 2):203S-215S. doi:10.4314/zvj.v29i1.5323
- Saeb A.T.M., Alshammari A.S., Al-Brahim H., Al-Rubeaan K.A., (2014).** Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci. World J.* 2014: Article ID 704708, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/704708>.
- Schwaber M.J., Navon-Venezia S., Kaye K.S., Ben-Ami R., Schwartz D., Carmeli Y., (2006).** Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1257–1262.
- Sedira S., (2014).** 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. Université de Constantine1, Algérie, 112p.
- Shrivastava S., Bera T., Singh S.K., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D., (2009).** Characterization of antiplatelet properties of silver nanoparticles. *ACS Nano*; 3:1357–1364.

**Shurygina I.A., Shurygin M.G., Sukhov B.G., (2016).** Chapter 8. Nanobiocomposites of Metals as Antimicrobial Agents. Vol 56. Elsevier Inc.; doi:10.1016/B978-0-12-803642-6.00008-3

**Simon-Deckers A., (2008).** Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leurs caractéristiques. Thèse de doctorat en Toxicologie humaine et environnementale. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), France, 281p.

**Simonsen G.S., Tapsall J.W., Allegranzi B., Talbot E.A., Lazzari S., (2004).** The antimicrobial resistance containment and surveillance approach – a public health tool. *Bulletin of World Health Organization*; 82:928-34.

**Singh R., Wagh P., Wadhvani S., et al., (2013).** Synthesis, optimization, and characterization of silver nanoparticles from *Acinetobacter calcoaceticus* and their enhanced antibacterial activity when combined with antibiotics. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8:4277-4290.

**Soleimani M., Habibi-pirkoochi M., (2017).** Biosynthesis of silver nanoparticles using *Chlorella vulgaris* and evaluation of the antibacterial efficacy against *Staphylococcus aureus*. *Avicenna J Med Biotech*. 9(3):120-125.

**Sondi I., Salopek-Sondi B., (2004).** Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *J Colloid Interface Sci*; 275:177-82.

**Suwan T., Khongkhunthian S., Sirithunyalug J., Okonogi S., (2018).** Effect of rice variety and reaction parameters on synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles. *Drug Discov Ther.*, 12(5):267-274. doi:10.5582/ddt.2018.01058.

**Tippayawat P., Phromviyo N., Boueroy P., Chompoosor A., (2016).** Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. *PeerJ*.; 4:1-15. doi:10.7717/peerj.2589

**Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J.A., (1951).** Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11: 55-59

**Wakshlak R.B., Pedahzur R., Avnir D., (2015).** Antibacterial activity of silver-killed bacteria: the “zombies” effect. *Sci Rep.*; 5:1-5. doi:10.1038/srep09555.

**Wigginton N.S., de Titta A., Piccapietra F., Dobias J., Nesatyy V.J., Suter M.J.F., et al., (2010).** Binding of silver nanoparticles to bacterial proteins depends on surface modifications and inhibits enzymatic activity. *Environ Sci Technol*; 44:2163-8.

**Yamashita S.K., Louie M., Simor A.E., Rachlis A., (2000).** Microbiological surveillance and parenteral antibiotic use in a critical care unit; 11(2):107-111.

**Yang W., Shen C., Ji Q., An H., (2009).** Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA. *Nanotechnology*; 20(085102):7. doi:10.1088/0957-4484/20/8/085102

**Zahar J.R., (2012).** Epidémiologie et conséquences des infections nosocomiales en réanimation : Impact et conséquences de la résistance bactérienne en réanimation. Thèse de doctorat en Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, France, 124p.

**Zeng F., Hou C., Wu S., Tong Z., and Yu S. (2007).** Silver nanoparticles directly formed on natural macroporous matrix and their antimicrobial activities. *Nanotechnology*; 18

**Znazen A., Ayadi S., Mnif B., Zouari M., Mezghani S., Mahjoubi F., (2006).** Résistance de streptococcus pneumoniae aux antibiotiques en Tunis : étude multicentrique, Laboratoire de Microbiologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax. Laboratoire de Microbiologie, Hôpital d'enfant, Tunis. Laboratoire de Microbiologie, CHU Charles Nicolle, Tunis.

**Zeyons O., (2008).** Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat en Physicochimie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, France, 330p.

### Sites web

[1] **World Health Organization (2014).** Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Disponible sur :

<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>

(Consulté le 20/05/2019)

[2] **Louise G. (2002). Université de Laval.** Projets interdisciplinaires : science, technologie, environnement, société (PISTES). La résistance bactérienne aux antibiotiques [En ligne]. Disponible sur : [https://www.pistes.fse.ulaval.ca/sae/?onglet=ressources&no\\_version=2055](https://www.pistes.fse.ulaval.ca/sae/?onglet=ressources&no_version=2055)

(Consulté le 11/05/19)

[3] **Vincent J. (2001)**. Bactéries multirésistantes dans les hôpitaux français : bilan en 2000 et perspectives de surveillance nationale dans le cadre du Réseau d'Alerte d'Investigation et de Surveillance des Infections Nosocomiales (RAISIN) [En ligne]. Disponible sur :

[http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/snmi/bilan\\_bmr\\_2000\\_raisin.pdf](http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2003/snmi/bilan_bmr_2000_raisin.pdf)

(Consulté le 20/05/19)

[4] **Chamard V., (2013)**. Les nanomédicaments, alliés de la médecine de demain ? [En ligne] <https://www.lepointveterinaire.fr/publications/la-semaine-veterinaire/archives/n-1534/les-nanomedicaments-allies-de-la-medecine-de-demain.html> (Consulté le 01/04/2019)

*Annexe*



**Annexe 1 : Synthèse de nanoparticules d'argent**

- Dilution de 1000mg/l d'AgNO<sub>3</sub> en 1mM d'AgNO<sub>3</sub> :

**10ml** de 1000mg/l d'AgNO<sub>3</sub>.....**59ml** d'eau distillée

- Réduction d'AgNO<sub>3</sub> en nanoparticules d'argent :

**5ml** de trisodium citrate.....**50ml** de 1mM d'AgNO<sub>3</sub>

**Annexe 2 : Les installations et appareils utilisés lors des analyses.**

| <b>Appareils</b>             | <b>Modèle</b>      | <b>Pays de fabrication</b> |
|------------------------------|--------------------|----------------------------|
| Agitateur -plaque chauffante | VELP scientifica   | Italie                     |
| Autoclave                    | SYQ-DSX-280B       | Corée                      |
| Bain Marie                   | Memmert            | Allemagne                  |
| Chambre d'incubation         | Edmund Bühler GmbH | Allemagne                  |
| Distillateur                 | G.F.L              | Allemagne                  |
| Etuve                        | Ncuell             | Allemagne                  |
| Hotte                        | Shin Saeng         | Corée                      |
| Microscope                   | Zeiss              |                            |
| Spectrophotomètre            | SECOMAM            | France                     |

**Annexe 3 : Illustration des antibiogrammes de l'antibiogramme des différentes**