

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE**

**UNIVERSITÉ DE 8 MAI 1945 GUELMA
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET SCIENCES DE
LA TERRE ET DE L'UNIVERS
DÉPARTEMENT : ÉCOLOGIE ET GÉNIE DE L'ENVIRONNEMENT**



Mémoire de Master

Domaine : Science de la Nature et de la vie

Filière : Microbiologie-Ecologie

Spécialité/Option : Santé, eau et environnement/Microbiologie de l'environnement

Thème :

**Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques (AgNO_3 , ZnO , CuO)
vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*.**

Présenté par :

Belhaoues Farah

Maaizia Mabrouka

Devant le jury composé de :

Président : M^{me} Khallef Mesaouda (M.A.A. Université de Guelma)

Examinatrice : M^{me} Torche Asma (M.A.A. Université de Guelma)

Encadreur : M^{elle} Grara Nedjoud (M.C.A. Université de Guelma)

juin 2013

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier en premier lieu Dieu le tout puissant qui nous a donné le courage pour réaliser notre travail qui a été effectué au laboratoire de DDS

Nous remercions sincèrement Madame KALLEF M., Maître assistante A au département de biologie à l'Université de Guelma, pour nous avoir fait l'honneur d'accepté la présidence du Jury et de s'être donner la peine de juger ce travail de recherche. Qu'il trouve ici l'expression de nos vifs remerciements.

Nous remercions également Madame TOURCHE A., Maître assistante A à l'Université de Guelma, pour avoir accepté de faire partie de ce Jury. Qu'il trouve ici nos remerciements les plus chaleureux.

Nous exprimons nos profond remerciement à notre encadreur Madame GRARA N., Maître de conférences A à l'Université de Guelma pour nous avoir fait l'honneur d'accepté de diriger ce travail, pour ses précieux conseils, son enseignement et sa gentillesse qu'on a pu apprécier pendant notre parcours. Veuillez trouver ici le témoignage de nos plus profond respect et de nos plus vive reconnaissances.

Nous exprimons aussi notre remerciement à Monsieur KEBIECHE H., et Monsieur DJERADI A., et les responsables de laboratoire de biologie de nos avoir fait bénéficier de sa précieuse aide, ses encouragement, ses conseils et ses bonnes humeurs.

*Nous adressons également notre remerciement, à tous nos enseignants, qui m'ont donnée les bases de la science
Merci aussi à tous nos collègues et nos amis pour leurs encouragements et leurs soutiens permanents lors de ces années de travail. Nous leur exprimons nos profonde sympathie et leur souhaite beaucoup de bien.*

Table des matières

Table de matière	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Résumé	
Abstract	
Introduction générale.....	1
Chapitre I : Etat de l'art	
I- Généralité sur les nanoparticules.....	3
I-1-Définition des nanoparticules	3
I-2- Propriétés des nanoparticules.....	3
I-3- Origine des nanoparticules	4
I- 4- Application des nanoparticules.....	5
II-Les infections bactériennes.....	5
II -1- Les infections nosocomiales	5
II-2-Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales	7
III -Les bactéries pathogènes.....	7
III-1- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
III-2- <i>Staphylococcus aureus</i>	8
IV-Activité antibactériennes des nanoparticules	9
IV-1-Mécanisme de pénétration des nanoparticules	10
IV-2-Activité antibactériennes d'oxyde de Zinc	11
IV-3-Activité antibactériennes de nitrate d'argent	12
IV-3-1-Résistance des microorganismes aux ions Ag ⁺	13
IV-4-Activité antibactériennes d'oxyde de Cuivre	13
IV-4-1- Résistance des bactéries aux Cu ⁺²	14

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I - Matériel	15
I-1- Matériel biologiques	15
I-2- Matériel chimiques.....	15
II-Méthodes	16
II-1- Evaluation de l'activité des nanoparticules.....	16
II-1-1-Détermination des zones d'inhibition (Antibiogramme).....	16
II-1-2- Méthode de diffusion en milieu gélosé (par papier Buvard)	17
II-1-3-Méthode de diffusion en milieu gélosé (Antibiotique + nanoparticule).....	18
II-1-4- Méthode de diffusion en milieu gélosé (diffusion en puits).....	18
II-1-5-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	18
II-1-6-Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB).....	19

Chapitre III : Résultats et Discussion

Résultats.....	20
Discussion.....	40
Conclusion	
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des figures

01 : Les nanoparticules manufacturées (a), et non manufacturées (b)	4
02 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8
03 : Image MEB de <i>Staphylococcus aureus</i>	9
04 : Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries.....	10
05 : Site d'action des ions Ag ⁺ sur les cellules bactériennes.....	12
06: Concentration minimale inhibitrice.....	18
07 : Zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (ATB +ZnO).....	20
08 : Zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> (ATB +ZnO)	21
09: AntibioGramme de <i>S. aureus</i> [sans ZnO (a) et avec ZnO (b)]	21
10 : AntibioGramme de <i>P.aeruginosa</i> [sans ZnO (a) et avec ZnO (b)].....	22
11 : Zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (ATB +AgNO ₃).....	23
12 : Zones d'inhibition de <i>P .aeruginosa</i> (ATB +AgNO ₃).....	24
13 : AntibioGramme de <i>S. aureus</i> [sans AgNO ₃ (a)et avec AgNO ₃ (b)].....	24
14 : AntibioGramme de <i>P.aeruginosa</i> [sans AgNO ₃ (a) et avec AgNO ₃ (b)].....	25
15 : AntibioGramme de <i>P.aeruginosa</i> (a) et <i>S. aureus</i> avec CuO (b).....	25
16 : Zone d'inhibition de <i>P .aeruginosa</i> (a) et <i>S .aureus</i> avec ZnO (b) (diffusion en puits).....	26
17 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (a) et <i>P .aeruginosa</i> avec CuO (b) (diffusion en puits)	26
18 : Zones d'inhibition en (mm) de <i>P .aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i> (diffusion en puits).....	27
19 : Diamètres des Zones d'inhibition de <i>P .aeruginosa</i> (a) et <i>S .aureus</i> (b) avec AgNO ₃ (diffusion en puits).....	28
20: Diamètres des Zones d'inhibition de <i>P .aeruginosa</i> (a) et <i>S .aureus</i> (b) avec ZnO (par papier buvard).....	28
21 : Diamètres des Zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (a) et <i>P .aeruginosa</i> (b) avec CuO (par papier buvard).....	29
22 : Zones d'inhibition de <i>P .aeruginosa</i> et <i>S.aureus</i> (par papier buvard).....	30
23 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> (a) et <i>S .aureus</i> (b) avec AgNO ₃ (par papier buvard).....	30
24 : UFC de <i>S.aureus</i> en présence de différentes concentrations de ZnO en fonction du temps.	34

25 : UFC de <i>P.aeruginosa</i> en présence de différentes concentrations de ZnO en fonction du temps.....	35
26 : UFC de <i>S.aureus</i> en présence de différentes concentrations d'AgNO ₃ en fonction du temps	35
27 : UFC de <i>P.aeruginosa</i> en présence de différentes concentrations d'AgNO ₃ en fonction du temps.....	36
28 : UFC de <i>S.aureus</i> en présence de différentes concentrations de CuO en fonction du temps.	36
29 : UFC de <i>P.aeruginosa</i> en présence de différentes concentrations CuO en fonction du temps.....	37

Liste des tableaux

01 : les différents domaines d'applications des nanoparticules.....	5
02 : Liste des souches bactériennes utilisées.....	14
03 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition.....	15
04 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (ATB +ZnO).....	19
05 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> (ATB +ZnO)	20
06 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>S .aureus</i> (ATB +AgNO ₃).....	22
07:Diamètres des zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> (ATB +AgNO ₃).....	23
08 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> vis-à-vis d'AgNO ₃ (diffusion en puits).....	27
09 : Diamètres des zones d'inhibition de <i>P.aeruginosa</i> et <i>S. aureus</i> vis-à-vis d'AgNO ₃ (par papier buvard).....	29
10: les valeurs de CMI de ZnO vis-à-vis de (<i>S .aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i>)	31
11 : les valeurs de CMI de CuO vis-à-vis de (<i>S .aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i>).....	31
12 : les valeurs de CMI de AgNO ₃ vis-à-vis de (<i>S .aureus</i> , <i>P.aeruginosa</i>).....	31
13: Les valeurs de CMB des NPs (ZnO et CuO).....	31
14 : les valeurs de CMB (AgNO ₃).....	32
15: UFC/ ml de <i>S.aureus</i> en fonction de différentes concentrations de ZnO.....	32
16: UFC/ ml de <i>P.aeruginosa</i> en fonction de différentes concentrations de ZnO.....	33
17 : UFC/ml de <i>S.aureus</i> en fonction de différentes concentrations d'AgNO ₃	33
18: UFC/ml de <i>P.aeruginosa</i> en fonction de différentes concentrations d'AgNO ₃	33
19 : UFC/ml de <i>S.aureus</i> en fonction de différentes concentrations (CuO).....	34
20 : UFC/ml de <i>P.aeruginosa</i> en fonction de différentes concentrations (CuO).....	34
21 : Préparation de déférentes concentrations des nanoparticules	Annexe
22: Dénombrement de <i>S.aureus</i> (UFC) après 24 h	Annexe
23 :Dénombrement de <i>P.aeruginosa</i> (UFC) après 24 h	Annexe
24: Dénombrement de <i>S.aureus</i> (UFC) après 24 h.....	Annexe
25 : Détermination de CMB de <i>P.aeruginosa</i> vis-à-vis d'AgNO ₃	Annexe

Liste d'abréviation

% : pourcent

µg : Microgramme

µm : micromètre

° : Degré

°C : Degré Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

Afsset : Agence Française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail

Ag : Argent

AgNO₃ : nitrate d'argent

ATB : Antibiotique

ATCC: American Type of Culture Collection

C MB : concentration minimale bactéricide

C. albicans : *Candida albicans*

C: concentration

CMI : concentration minimale inhibitrice

CPP : comité de la prévention et de la précaution

CuO : Oxyde de cuivre

D.O : Doncité Optique

E. coli : *Escherichia coli*

ERO : espèces réactives d'oxygène

G⁻ : Gram negative

g : Gramm

G⁺ : Gram positive

h : heure

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

m : mètre

MEB : Microscopie électronique à balayage

MgO : Oxyde de magnésium

ml : Millilitre

Mmol : millimol

mn : minute

NCCLS: National committee for clinical laboratory standards; organisme American chargé de définir les normes de biologie Clinique

nm : nanomètre

NPs : Nanoparticules

O₂ : Oxygène

OMS : l'Organisation Mondiale de la Santé

P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*

PUF : particules ultrafines

ROS : espèces réactives d'oxygène

S. aureus : *Staphylococcus aureus*

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisia*

TiO₂ : dioxyde de titane

UFC : Unités bactériennes formant une colonie

UV : ultraviolet

ZI : zone d'inhibition

ZnO : Oxyde de zinc

Résumé

Résumé:

Dans cette étude nous sommes intéressés à l'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules nanométriques (AgNO_3 , ZnO et CuO) seul et en combinaison avec les antibiotiques sur deux micro-organismes à Gram différents, respectivement le *P. aeruginosa* (Gram négatif) et *S.aureus* (Gram positif), en raison de leur très large implication dans les phénomènes de contamination et d'infection rencontrés dans le domaine médical par la méthode de diffusion sur gélose, la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration minimale bactéricide (CMB). L'activité antibactérienne de certains antibiotiques testés sur les souches *S.aureus* et *P. aeruginosa* est augmentée avec un minimum de (1mm) et un maximum de (28mm) avec l' AgNO_3 sur les deux souches, une augmentation de (2mm et de 4mm) est observée avec le ZnO sur la souche *S.aureus*, la méthode de diffusion en puits et par papier buvard révèle que l'activité est dose-dépendante pour les deux souches *S.aureus* et *P. aeruginosa* avec l' AgNO_3 . La concentration minimale inhibitrice a été déterminée en utilisant sept concentrations des NPs (AgNO_3 , ZnO et CuO) : 512, 128, 64, 32, 16, 8, 0,0 $\mu\text{g/ml}$. Les valeurs de CMI (d' AgNO_3) pour *S.aureus* et *P. aeruginosa* sont respectivement 16 $\mu\text{g/ml}$ et 8 $\mu\text{g/ml}$, les valeurs de CMB (d' AgNO_3) pour *S.aureus* et *P. aeruginosa* sont respectivement 16 $\mu\text{g/ml}$ et 512 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats montrent que l' AgNO_3 exerce un effet bactéricide sur *S.aureus* et effet bactériostatique sur *P. aeruginosa*.

Mots clés : Nanoparticules, AgNO_3 , ZnO , CuO , activité antibactérienne, CMI, CMB, *S.aureus*, *P. aeruginosa*.

Abstract:

In this study we are interested in evaluating the antibacterial activity of nano-molecules (AgNO₃, ZnO and CuO) alone and in combination with antibiotics on two different microorganisms Gram, respectively *P. aeruginosa* (Gram negative) and *S. aureus* (Gram positive), because of their extensive involvement in the phenomena of contamination and infection encountered in the medical field by the agar diffusion method, determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC).

The antibacterial activity of certain antibiotics tested on *S. aureus* strains and *P. aeruginosa* is enhanced with a minimum of (1 mm) and maximum (28mm) with AgNO₃ in both strains an increase of (2 mm and 4 mm) was observed with the *S. aureus* strain on ZnO, the method of well diffusion and blotting paper reveals that the activity is dose-dependent for both *S. aureus* strains and *P.aeruginosa* with AgNO₃.

The minimum inhibitory concentration was determined using seven concentrations of NPs (AgNO₃, ZnO and CuO): 512, 128, 64, 32, 16, 8.0 mg / ml.

The MIC values (AgNO₃) for *S. aureus* and *P. aeruginosa* and 8µg/ml 16µg/ml respectively, the values of CMB (AgNO₃) for *S. aureus* and *P. aeruginosa* 16µg/ml and 512µg/ml, respectively.

The results up the AgNO₃ have a bactericidal effect on *S. aureus* and bacteriostatic effect on *P.aeruginosa*.

Keywords: Nanoparticles, AgNO₃, ZnO, CuO, antibacterial activity, CMI, CMB, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

Introduction générale

Introduction général:

Les nanotechnologies désignent la science qui consiste à concevoir, produire et exploiter des structures et des appareils ayant une ou plusieurs composantes d'environ 100 millièmes de millimètre (100 nanomètres) ou moins. Elles sont également utilisées dans les produits cosmétiques et les crèmes solaires, dans le textile, dans des revêtements, dans certaines technologies alimentaires et énergétiques, ainsi que dans certains produits médicaux et pharmaceutiques (**Angélique, 2008**).

Ces dernières années, une stratégie largement répandue pour prévenir la contamination microbienne a consisté à tuer les microorganismes (espèces pathogènes, flore d'altération) entrant directement en contact avec la surface réceptrice ou s'approchant d'elle. Les bactéries et les champignons sont connus pour être à l'origine de problèmes de santé publique dans divers domaines tels que l'industrie agro-alimentaire ou le domaine biomédical et chirurgical avec des pertes économiques non négligeables. La nécessité de lutter contre la colonisation des surfaces dans ces secteurs stratégiques justifie l'intérêt croissant pour le domaine de recherche dédié à l'amélioration de l'hygiène des surfaces (**Mtimet, 2011**).

L'utilisation massive d'agents antibiotiques, s'avèrent souvent inefficaces du fait de la résistance accrue des microorganismes sous forme de biofilms, et même néfastes pour l'environnement et la santé humaine (émergence de souches microbiennes multirésistantes) (**Saulou, 2009**).

Un intérêt croissant pour l'utilisation des inhibiteurs de résistances aux antibiotiques pour la combinaison thérapeutique, De nombreux éléments métalliques présentent une activité antimicrobienne sur les bactéries et sur les levures (**Mtimet, 2011**).

Un grand nombre de nanoparticules a un effet antibactérien sur différentes souches bactériennes. Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction de la nature et des caractéristiques des nanoparticules. Ainsi les nanoparticules métalliques d'Ag et de Cu présentent une forte activité bactéricide dès de faibles concentrations, ces effets antibactériens dépendent non seulement de la nature mais aussi des autres caractéristiques des nanoparticules comme la forme et la taille ou l'état d'agglomération (**Angélique, 2008**).

L'objectif de ce travail vise à étudier l'activité antibactérienne des NPs métalliques (ZnO, AgNO₃, CuO) sur trois souches bactériennes de Gram différents, *S.aureus* (G⁺) , *P.aeruginosa* (G), la raison réside principalement dans le fait que ces bactéries sont les principale responsables

des infections enregistrées en milieu hospitalier et sont optées comme indicateur standard, car ce sont les souches les plus agressives et dans certains car elles sont même extrêmement résistantes aux antibiotiques (**Thati et al ., 2010**).

Dans le présent travail, sera tout d'abord présenté un état de l'art donnant une vue générale sur tous qui concernent les nanoparticules et les bactéries les plus couramment étudiées car à l'origine de l'essentiel des infections bactériennes. Après avoir présenté les objectifs et la démarche retenue pour l'étude, matériel et méthodes utilisés seront décrits. Les résultats obtenus seront ensuite détaillés et discutés. Pour finir, une conclusion générale pour l'étude sera présentée.

Etat de l'art

I- Généralité sur les nanoparticules :

I-1-Définition des nanoparticules :

Le préfixe *nano* signifie un milliardième ($1\text{nm} = 10^{-9}\text{m}$). Donc, un nanomètre (nm) équivaut à un milliardième de mètre [1].

Le terme de « nanoparticule » est utilisé lorsque la particule a au moins une de ses dimensions inférieure à 100 nm, qui lui confère des propriétés uniques. Sous cette forme, la dispersion particulaire en solution serait grandement facilitée, résultant en une transparence du milieu. Par définition, les particules d'oxyde de métal de nano taille possèdent une grande zone de surface, plusieurs pores et des surfaces insaturées de cations et d'anions, Par ailleurs, la taille des particules d'oxyde de métal influence les caractéristiques antimicrobiennes des nanomatériaux (Angélique ,2008 ; Zhang et al ., 2010).

On distingue par exemple les nanoparticules organiques (constituées majoritairement de polymères), métalliques (ex : nanoparticules d'or ou d'argent), d'oxydes métalliques (ex : F_2O_3 , TiO_2).A titre de comparaison avec les structures organiques naturelles, les nanoparticules se situent principalement dans la gamme de taille correspondant aux protéines (Zeyons ,2008 ; Goutayer, 2008).

Les nanoparticules manufacturées, fournies par les industries de production ou les laboratoires de recherche qui travaillent pour ces industries (fullerènes, nanotubes de carbone, certains oxydes métalliques (titane, zinc, etc.). Une difficulté dans l'analyse des effets des nanoparticules manufacturées vient de leur instabilité (Angélique ,2008).

I-2- Propriétés des nanoparticules :

Elles correspondent au point de vue dimensionnel aux particules ultrafines (PUF), les principales propriétés des nanoparticules sont : optiques, électriques, catalytiques, thermiques, magnétiques, mécaniques ou encore biologiques. Certaines nanoparticules d'oxydes métalliques ont également la particularité d'absorber dans les UV (Zeyons, 2008).

I-3- Origine des nanoparticules :

On distingue trois types de nanoparticules en fonction de leur provenance :

-les nanoparticules d'origine naturelle :

Résultant essentiellement des phénomènes de nucléation et de condensation des gaz et vapeurs dans l'atmosphère (Angélique ,2008).

-les nanoparticules d'origine anthropogénique non-intentionnelle :

Issues des procédés chauds tels que le soudage ou encore de la combustion des moteurs, Réactions « gaz-solide » dans l'atmosphère : gaz naturels ou provenant des émissions anthropiques (Angélique ,2008 ; Carles, 2011).

-les nanoparticules d'origine anthropogénique intentionnelle ou nanoparticules manufacturées :

Tels que les métaux, semi-conducteurs, oxydes métalliques, carbone, polymères composites (Carles, 2011).



Figure 01 : Les nanoparticules manufacturées (a), et non manufacturées (b) (Carles, 2011).

I-4- Application des nanoparticules :

Les nanotechnologies présentent, grâce à leurs propriétés particulières, un large spectre d'applications (tableau 1) (Afsset, 2006).

Tableau 01 : les différents domaines d'applications des nanoparticules (Afsset, 2006).

Domaines	Applications
Secteur biomédical	muscles artificiels, transport de médicament, ce qui concerne les soins de santé, l'analyse d'ADN, des biopuces à haute densité, la biodétection de pathogènes, la détection des protéines, transport cellulaire,..... etc.
Environnement	agents de décontamination, les dendrimères peuvent piéger des ions métalliques par des techniques d'ultrafiltration de l'eau. Aliments et boissons : Réfrigérateurs antibactériens.
Santé et beauté	Habits autonettoyants, les Cosmétiques, les Filtre à air, les Crème solaire. Ex : -nanoparticules de dioxyde de titane ou d'oxyde de zinc peuvent être introduites dans des crèmes solaires car elles absorbent et réfléchissent les rayons ultraviolets mais sont transparentes à la lumière visible. -les nanoparticules deTiO ₂ , ZnO et CeO ₂ ; elles sont incorporées à des surfaces pour leur donner des qualités « autonettoyantes ».

II- Les infections bactériennes :

II -1- Les infections nosocomiales :

Les infections nosocomiales sont associées à un traitement en un hôpital ou un établissement de soins de santé. Une infection est considérée comme nosocomiale si elle apparaît après 48 heures suivant l'admission à l'hôpital ou dans les 30 jours suivant la sortie.

L'amélioration de l'hygiène et les programmes de lutte contre les infections se sont avérés très efficaces pour réduire les taux d'infections nosocomiales (**Singh et al., 2012**).

On distingue deux types d'infections nosocomiales qui relèvent des modes de transmission différents :

✓ *Les infections d'origine endogène :*

Dans ce type d'infections, c'est le malade qui s'infecte avec ses propres germes, à la faveur d'un acte invasif et/ou en raison d'une fragilité particulière (**Rossignol, 2007**).

✓ *Les infections d'origine exogène :*

Ces infections peuvent être : croisées, c'est-à-dire transmises d'un malade à un autre par les mains ou les instruments de travail du personnel médical ou paramédical, provoquées par les germes du personnel soignant, liées à la contamination de l'environnement hospitalier (eau, air, matériel, alimentation...) (**Rossignol, 2007**).

Un large éventail des bactéries, champignons et virus pathogènes sont responsables de tels infections. Beaucoup de ces microorganismes font également partie de la flore commensale qui coexiste dans un équilibre naturel avec le corps humain. Une méthode possible pour réduire l'apparition et la propagation des infections nosocomiales est l'utilisation des textiles antimicrobiens. En termes de transmission, les textiles jouent un rôle crucial dans la chaîne de transmission des micro-organismes pathogènes. Textiles de toutes les variétés sont considéré comme très compétent dans la réalisation des bactéries et servant de réservoir pour la transmission de l'infection. Les vêtements antimicrobiennes peuvent être également utiles pour les personnes qui viennent dans le contact avec les patients, comme les visiteurs, le personnel infirmier, médecins et autres travailleurs de la santé (**Singh et al., 2012**).

La technique des textiles antibactériens utilise un processus en une seule étape pour synthétiser des nanoparticules antibactériennes et imprégner à tissus par l'utilisation d'ondes ultrasonores. "Irradiation ultrasonique a été prouvé d'être un Procédé efficace de dépôt de nanoparticules sur la surface de différents substrats, y compris céramiques et polymères ». Ce procédé conduit à une surface lisse et couche de revêtement homogène et est capable de projeter des nanoparticules vers le tissu la surface à une vitesse très élevée (**Singh et al., 2012**).

La formation des nanoparticules modifie les propriétés de nombreux matériaux conventionnels. Par exemple, la zone de plus grande surface des nanoparticules peut résulter en un plus grand degré d'interaction avec les parois des cellules bactériennes. Parmi les matériaux inorganiques, les métaux et d'oxydes métalliques ont suscité beaucoup d'intérêt pour une utilisation en tant qu'agents antimicrobiens car de leur durabilité, de la sélectivité et de la résistance à la chaleur. Une des raisons pour lesquelles ces matériaux inorganiques ont attiré beaucoup d'attention, c'est leur capacité à résister à des conditions intensives de traitement. Ils ont une toxicité sélective aux bactéries (Singh et al., 2012).

II-2-Facteurs favorisant l'émergence des infections nosocomiales :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), plusieurs facteurs participent aujourd'hui à l'augmentation de l'incidence des infections nosocomiales : L'urbanisation croissante, la pollution, les modifications de l'environnement, l'évolution démographique amenant une proportion croissante de personnes âgées qui nécessitent des soins hospitaliers (Rossignol, 2007).

III -Les bactéries pathogènes :

III-1-*Pseudomonas aeruginosa* :

Pseudomonas aeruginosa est une bactérie Gram (-), aérobie ubiquiste considérée comme pathogène opportuniste. Sa résistance supérieure aux autres bactéries vis-à-vis de certains désinfectants peut conduire à sa présence lors d'infections en milieu hospitalier. Elle conduit à des surinfections graves (Prenom, 2001).

P. aeruginosa est capable d'infecter un large spectre d'hôte : humains, souris, plantes, insectes, nématodes, cette bactérie affecte particulièrement les personnes immunodéprimées, les grands brûlés et les patients en soins intensifs. A l'hôpital, elle est responsable de 16 % des infections pulmonaires, de 12% des infections du tractus urinaires, de 8% des infections touchant les grands brûlés et de 10% des infections du sang (bactériémie et/ou septicémie). Cette bactérie est également une des causes majeures de mortalité et de morbidité chez les personnes atteintes de mucoviscidose Ces patients développent une infection pulmonaire chronique qui conduit à une destruction des tissus pulmonaires par les toxines bactériennes. *P. aeruginosa* colonise les

poumons et s'installe rapidement sous forme de bio film, ce qui lui permet de résister aux défenses immunitaires de l'hôte et aux antibiotiques (Rossignol ,2007).

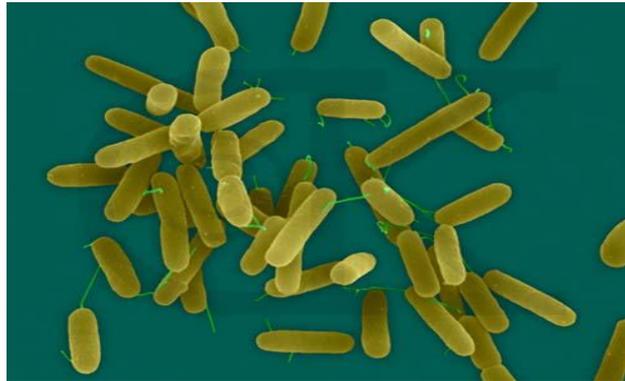


Figure 02 : *Pseudomonas aeruginosa* [2]

III-2-*Staphylococcus aureus* :

S. aureus est une cocci à Gram positif, c'est une bactérie pyogène et toxigène, responsable de nombreuses infections communautaires et nosocomiales qui représente donc un problème de santé publique important. Elle provoque de nombreuses infections dues à la multiplication de la bactérie et des infections toxiques liées à la diffusion de toxines spécifiques. Typiquement elle se présente sous forme de coques sphériques de diamètre 1 μm , et se trouve généralement dans les fosses nasales et sur la peau de personnes en bonne santé. Si elle pénètre dans le corps, elle peut causer des infections cutanées légères, telles que des furoncles ou des anthrax, ou des infections plus graves, comme des pneumonies ou des bactériémies (Mungkalasiri, 2009).

Les *Staphylococcus aureus* sont communément appelés staphylocoques dorés à cause des pigments caroténoïdes jaunes qu'ils produisent. Ils causent des infections chroniques graves. Ces infections peuvent aller de l'intoxication alimentaire sévère à la formation d'abcès disséminés sur tout le corps. Les staphylocoques peuvent donc causer des maladies dans presque tous les organes ou tissus du corps. Ils peuvent se répandre par les mains, le système respiratoire, la peau, etc. On trouve généralement les staphylococcies chez les personnes au système immunitaire affaibli (Mungkalasiri, 2009).

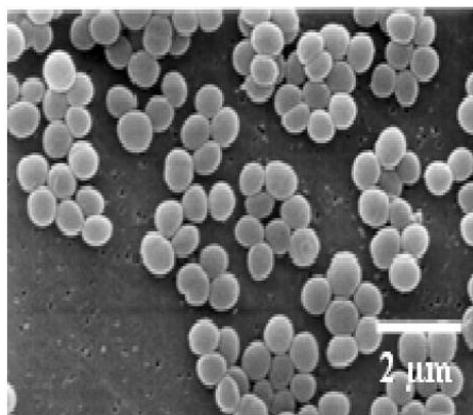


Figure 03 : Image MEB de *Staphylococcus aureus* (Mungkalasiri, 2009).

IV-Activité antibactériennes des nanoparticules :

Les agents antimicrobiens sont des composés naturels ou synthétiques qui inhibent la croissance microbienne, différentes classes d'agents antimicrobiens sont utilisés dans l'industrie, dont la plupart sont biocides. L'utilisation des nanoparticules inorganiques a avancé rapidement en raison de la quantité de travail fait vers la synthèse et la modification des particules pour des applications biomédicales. Beaucoup de métaux lourds et des oxydes de métaux, soit dans leur état libre, ou dans des composés à très faible concentrations, sont toxiques pour les micro-organismes (Singh *et al.* , 2012).

Ces matériaux inorganiques tuent les bactéries grâce à divers mécanismes, en se liant à une protéine intracellulaire et leur inactivation, la génération d'espèces réactives de l'oxygène et par dommages directs aux parois cellulaires. L'oxyde de zinc (ZnO), l'oxyde de cuivre (CuO), oxyde de magnésium (MgO), dioxyde de titane (TiO₂) et d'argent (Ag) sont quelques-uns des plus couramment utilisée comme des matériaux inorganiques antimicrobiens (Singh *et al.* , 2012).

IV-1-Mécanisme de pénétration des nanoparticules :

Le mécanisme de pénétration des nanoparticules reste à élucider. En effet l'interaction de particules physiques avec la paroi bactérienne n'a été que très peu étudiée et donc leur pénétration dans la paroi bactérienne peu observée. Plusieurs hypothèses peuvent cependant être formulées, la première serait un passage par des porines non spécifiques de la paroi, mais les plus grosses porines ayant un diamètre de 2 nm, cette explication semble peu probable, la deuxième hypothèse la plus probable est que les particules sont capables d'exercer une pression

mécanique sur la paroi, en raison d'une différence de concentration en osmolytes de part et d'autre de la membrane, et donc de traverser celle-ci en forçant un passage. Cependant, une mesure de l'osmolalité des suspensions de nanoparticules a été réalisée et montre qu'elle est très faible. Ainsi, les nanoparticules n'exercent aucune pression hyper osmotique et ne peuvent donc passer en force la membrane de cette manière, la troisième hypothèse serait qu'une particule en contact avec la membrane pourrait produire des ERO et ainsi provoquer des dommages membranaires. Des trous dans la membrane seraient formés et permettraient la pénétration des nanoparticules dans le périplasma ou le cytoplasme. Les auteurs suggèrent l'importance de la charge de la particule pour qu'elle puisse s'approcher de la paroi et libérer les ERO à son voisinage, les nanoparticules chargées positivement pénètrent dans la paroi bactérienne. Ainsi c'est peut-être la charge des particules, en complément ou en substitution de leur taille, qui conditionne la pénétration des nanoparticules. De plus cela conforte la troisième hypothèse de mécanisme de pénétration (Angélique, 2008).

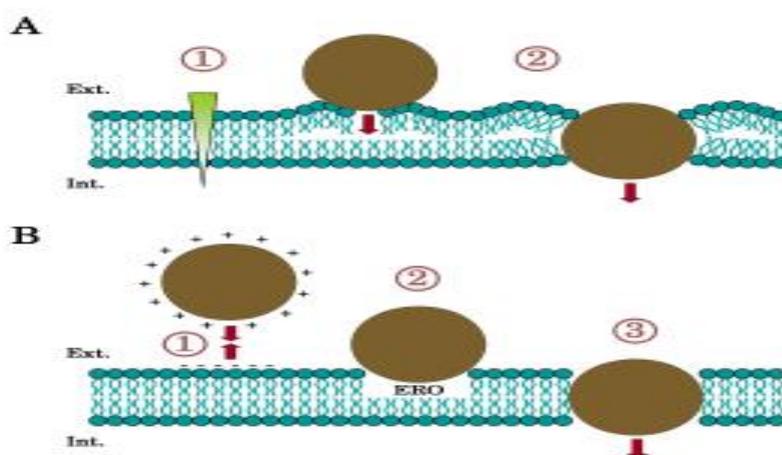


Figure 04 : Hypothèses concernant la pénétration des nanoparticules dans les bactéries (Angélique, 2008).

Hypothèse du passage mécanique (A) :

En imaginant une différence de concentration en nanoparticules exerçant une pression (1), les nanoparticules forcent le passage pour aller du compartiment le plus concentré au moins concentré. Hypothèse du passage par détérioration de la membrane externe (B) :

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

IV-2-Activité antibactériennes d'oxyde de Zinc :

Les avantages de l'utilisation de ces oxydes inorganiques de nanoparticules comme agents antimicrobiens sont leur plus grande efficacité sur les souches résistantes d'origine pathologique, moins de toxicité et résistants à la chaleur, la présence des espèces réactives d'oxygène (ROS) générés par les nanoparticules de ZnO est responsable de leur activité bactéricide, le comportement antibactérien de nanoparticules de ZnO pourrait être dû à des interactions chimiques entre le peroxyde d'hydrogène et les protéines membranaires, le peroxyde d'hydrogène produit pénètre dans la membrane cellulaire des bactéries et les tue, le peroxyde d'hydrogène est généré une fois par nanoparticules de ZnO, les nanoparticules restent en contact avec les bactéries mortes pour empêcher l'action des bactéries et en outre continuer à générer et de s'acquitter de peroxyde d'hydrogène au milieu (Karvani et al., 2011; Singh et al., 2012).

ZnO est un oxyde métallique semi-conducteur et donc, n'affiche pas une alcalinité de surface élevée en solution, mais tend plutôt vers la neutralité. Cette particularité de l'oxyde de zinc en fait un produit facile à utiliser, raison pour laquelle plusieurs travaux se concentrent sur cette poudre. En effet, il a été ramené que la surface de la particule génère du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et que possiblement, elle correspond au premier facteur pour inhiber la croissance bactérienne. Une distinction dans l'activité antimicrobienne de MgO, CaO et ZnO proviendrait entre autres des espèces réactives d'oxygène générées par la poudre en solution. Effectivement, chaque bactérie répond inégalement à un stress oxydatif dû à des différences dans la perméabilité de la membrane cellulaire, certaines souches microbiennes succombent aux dommages causés à la paroi membranaire par O_2 , d'autres, peu affectées par ce composé oxygéné actif, pourraient par contre manifester une plus grande sensibilité au H_2O_2 , comme c'est le cas pour *E. coli* (Zhang et al., 2010).

IV-3-Activité antibactériennes de nitrate d'argent :

L'action des ions Ag^+ sur les bactéries dépendent du genre et de l'espèce du microorganisme considéré, les ions Ag^+ interagissent avec de nombreux groupements chargés négativement contenus dans les molécules biologiques. Ces ions Ag^+ forment des liaisons avec les molécules biologiques contenant le groupement thiol ($-SH$), en particulier certains acides aminés tels que la

cystéine. D'autres études mentionnent l'interaction des cations Ag^+ avec les groupements amines des acides aminés et des peptides avec les fonctions amides des liaisons peptidiques et, en particulier, avec l'oxygène de la fonction carbonyle $\text{C}=\text{O}$. Il est à noter également l'interaction des ions Ag^+ avec les bases des molécules d'ADN et la formation de complexes Ag^+/ADN . Enfin, les ions Ag^+ se lient également aux groupements phosphates reliant les bases des molécules d'ADN. En revanche, les ions Ag^+ n'interagissent pas avec les acides aminés privés de la fonction chimique thiol tels que la glycine ainsi que les acides aminés constitués de ponts disulfure ou contenant du soufre sous forme $-\text{S}-$. La figure(05) répertorie les principaux sites d'action des ions Ag^+ sur les bactéries, et montrent clairement les multiples cibles de ces ions, expliquant leur activité antimicrobienne redoutable (Mtimet, 2012).

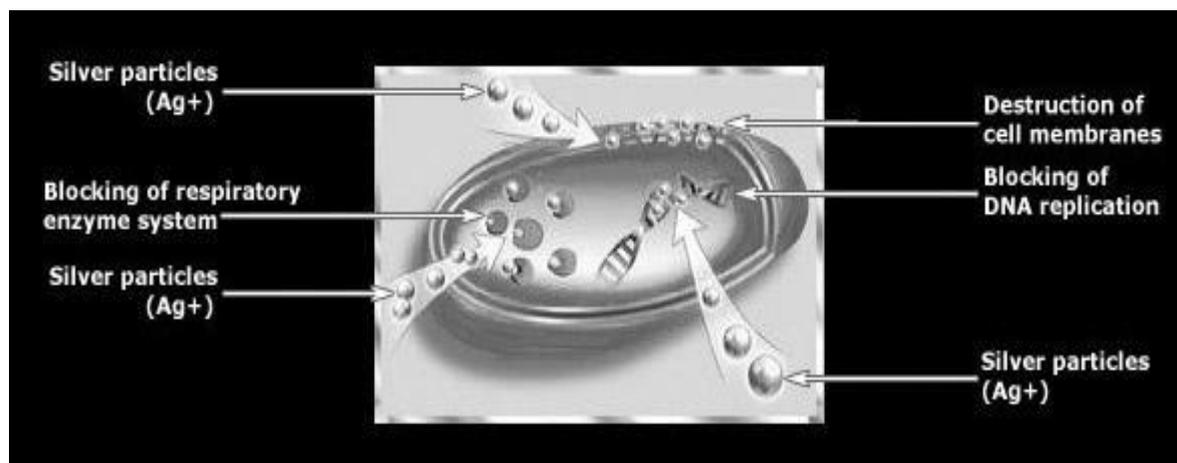


Figure 05 : Site d'action des ions Ag^+ sur les cellules bactériennes (Mtimet, 2012).

IV-3-1-Résistance des microorganismes aux ions Ag^+ :

Contrairement aux antibiotiques, les ions Ag^+ provoquent très rarement l'émergence de résistance de la part des bactéries ou des levures. Les cations métalliques agissent simultanément sur de nombreux sites de la cellule et lorsque la concentration en Ag^+ est suffisante, le microorganisme ne peut pas muter avant d'être tué. L'existence d'un phénomène de résistance pouvant être lié aux gènes présents dans le génome du microorganisme, les cultures répétées des levures *C. albicans* et *S. cerevisiae* en argent à des concentrations comprises entre 1 et 2 mol.L^{-1} , ces microorganismes mettent en place un système de résistance tel qu'ils peuvent alors se développer en présence de concentration en argent plus importantes (5 mmol.L^{-1}) et normalement létales. Ce phénomène de bioaccumulation a également été observé chez

Pseudomonas et *E. coli*, l'entrée des ions Ag^+ dans la cellule microbienne s'accompagne d'une excrétion de cations afin de conserver l'électro neutralité au sein de la cellule.

Une résistance aux ions Ag^+ a également été montrée que cette résistance aux ions Ag^+ est liée à la présence de plasmides, molécules d'ADN surnuméraires contenant neuf gènes de résistance à l'argent (Mtimet, 2012).

IV-4-Activité antibactériennes d'oxyde de Cuivre :

L'homme a exploité les propriétés naturellement antibactériennes du cuivre depuis les tous premiers âges. Il a été clairement démontré par de nombreuses études scientifiques menées depuis des décennies que le cuivre est capable d'éradiquer les bactéries les plus résistantes, les moisissures et les virus. Les ions cuivre (Cu^{+2}) pénètrent dans les bactéries selon les mêmes mécanismes que les ions argent et inhibent la respiration bactérienne tout en bloquant la multiplication en agissant sur l'ADN (Perreault, 2011).

IV-4-1- Résistance des bactéries aux Cu^{+2} :

Le mécanisme de résistance des bactéries au cuivre est dû aux plasmides et aux protéines, selon l'espèce bactérienne, la protéine à l'origine de cette résistance est différente, les ions Cu^{+2} pénètrent dans la bactérie et sont repoussés vers l'extérieur après l'organisation des plasmides dans le cytoplasme. Ces études ont été réalisées sur des bactéries planctoniques, mais dans notre environnement les bactéries vivent sous la forme de biofilms et dans ce cas les mécanismes de résistance peuvent être différents, *Pseudomonas aeruginosa* est résistante au cuivre sous forme planctonique et sous forme de biofilms (Perreault, 2011).

Matérielles et Méthodes

Notre étude expérimentale est effectuée au laboratoire de microbiologie de la DDS de la wilaya da Guelma.

I - Matériel :

I-1- Matériel biologiques :

Les souches bactériennes utilisées dans cette étude sont les suivantes (Tableau 2) :

- ✓ Deux souches cliniques : - *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylococcus aureus*

Tableau 02 : Liste des souches bactériennes utilisées.

Les souches	Origine de la souche
<i>P.aeruginosa</i>	Prélèvement : urinaire Sexe : garçon Age : 12 ans, le 19/02/2013
<i>S.aureus</i>	Prélèvement : vaginale Sexe : Femme Age : 42 ans, le 04/03/2013

I-2- Matériel chimiques :

Les matériaux chimiques utilisés sont des nanoparticules métalliques (ZnO, AgNO₃, CuO), ces molécules nanométriques sont synthétisées par la méthode de Co-précipitation (Bouloudenine, 2006).

Les différentes dilutions des molécules à tester sont préparées à partir de la poudre diluée dans de l'acétone à (0,2 %), et représentent les concentrations suivantes : 0, 8, 16, 32, 64, 128, 256,512 µg/ml, elles sont préparées à partir d'une solution mère (6000 µg/ml).

II-Méthodes :

II-1- Evaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules :

La sensibilité aux molécules nanométriques à été étudiée par la méthode de diffusion en milieu solide qui permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis

des antibiotiques, des molécules nanométriques et association antibiotique - nanoparticule (ZnO, AgNO₃, CuO).

II-1-1-Détermination des zones d'inhibition (Antibiogramme) :

Principe :

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité des bactéries aux antibiotiques, les antibiotiques utilisés dans cette étude ont été choisis selon leur spectre d'activité qui s'étend vers les espèces étudiées (Tableau 4) (Rahal et al., 2008).

Tableau 03 : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition (Rahal et al., 2008).

Antibiotique	Code	Charge de disque	Diamètre des zones d'inhibition (en mm)	famille												
Cefotaxime	CTX ₃₀	30µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">15</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	15		21	R		I	S		S	-----			Céphalosporines
15		21														
R		I														
S		S														

Ceftazidime	CAZ ₃₀	30µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">22</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">29</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	22		29	R		I	S		S	-----			B- Lactamines
22		29														
R		I														
S		S														

Chloramphénicol	C ₃₀	30µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	12		18	R		I	S		S	-----			Phénicoles
12		18														
R		I														
S		S														

Lincomycine	L	15 µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">17</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">21</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	17		21	R		I	S		S	-----			Macrolides
17		21														
R		I														
S		S														

Metronidazole	MTR	50 µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">16</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	4		16	R		I	S		S	-----			Imidazoles
4		16														
R		I														
S		S														

Oxacilline	OX	5 µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">20</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	20		20	R		I	S		S	-----			B- Lactamines
20		20														
R		I														
S		S														

Pristinamycin	PT ₁₅	15 µg	<table style="margin-left: auto; margin-right: auto; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">12</td> <td style="width: 20px;"></td> <td style="text-align: center;">18</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">R</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">I</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S</td> <td style="text-align: center;"> </td> <td style="text-align: center;">S</td> </tr> <tr> <td colspan="3" style="text-align: center;">-----</td> </tr> </table>	12		18	R		I	S		S	-----			Macrolides
12		18														
R		I														
S		S														

•préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement on prépare une suspension bactérienne dans l'eau physiologique stérile (0,9%), son opacité doit être équivalente à une D.O de 0,08 à 0,10 lue à 625nm.

•L'ensemencement :

- l'ensemencement se fait par la méthode de Kirby-Baur, par écouvillonnage (appelée méthode NCCLS) (National comitée for clinical laboratory standards).

-Plonger un écouvillon stérile dans une suspension bactérienne et laisser s'imbiber.

-le sortir du tube en l'essorant doucement de la paroi.

-Ensemencer la boîte de Muller-Hinton dans l'épaisseur de la gélose est de (4mm), en frottant l'écouvillon sur sa surface et en tournant la boîte 3fois de 60° afin d'assurer une bonne distribution de l'inoculum.

-laisser sécher les boîtes pendant 15 à 20 mn.

•Application des disques :

Les disques ont été appliqués à l'aide d'un distributeur (6 antibiotiques par boîte) ou d'une pince bactériologique stérile, (une fois appliquée le disque ne doit pas être déplacé).

•Incubation :

-Incuber les boîtes à l'étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures.

•Lecture :

Pour chaque souche et pour chaque antibiotique :

-Mesurer avec précision en (mm) le diamètre de la zone d'inhibition

II-1-2- Méthode de diffusion en milieu gélosé (par papier Buvard) :**Technique :**

Les disques de papier Buvard ont été découpés avec diamètre égal à 6 mm, puis stérilisés dans une boîte en verre, ils sont ensuite imprégnés des différentes concentrations des molécules à tester (0, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512µg/ml) pour (ZnO, AgNO₃, CuO).

Des disques de papier buvard, imprégnés des différentes concentrations de molécule à tester, sont déposés à la surface d'un milieu gélosé, préalablement ensemencé avec une culture pure de la souche à étudier. Dès l'application des disques, les molécules à tester diffusent de manière

uniforme. Après incubation (24h à 37°C), les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture [3].

II-1-3-Méthode de diffusion en milieu gélosé (Antibiotique + nanoparticule) :

Technique :

Sur chaque disque d'ATB on dépose 0,1ml de la solution mère (6000µg/ml) de la molécule à tester, après incubation (24h à 37°C), les disques s'entourent de zones d'inhibition circulaires correspondant à une absence de culture.

II-1-4- Méthode de diffusion en milieu gélosé (diffusion en puits) :

La méthode utilisée est celle de diffusion en puits sur gélose telle que décrite par Berghe et Vlietinck (1991).

Technique :

Le milieu Gélose Mueller Hinton est coulé sur boîte de pétri à une épaisseur de 8 mm, après inoculation par écouvillonnage d'une dilution du microorganisme à tester réalisée suivant une échelle de Mac Ferland, des puits de 6 mm de diamètre sont réalisés de manière concentrique sur les milieux puis, met 0.1ml de chaque concentration dans chaque puits au centre. Après une pré-diffusion de 45 minutes à température ambiante, les souches sont incubées à 37°C, pendant 24 heures au terme desquelles les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse [4].

II-1-5-Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) :

Principe :

- C'est la plus faible concentration de la molécule à tester qui inhibe toute croissance visible d'une souche bactérienne après 18h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique et l'approche la plus utilisée pour évaluer *in vitro* l'activité bactériostatique d'une nouvelle molécule à activité antibactérienne (Carryn, 2013).

Technique :

Grace à la méthode de dilution, on peut déterminer la valeur de la CMI. Cette méthode peut être appliquée en gélose et en bouillon.

Dans la méthode de dilution en bouillon, on prépare une série de tubes de bouillon (habituellement du milieu Mueller-Hinton) contenant des différentes concentrations des nanoparticules à tester et on l'inocule avec une population standard de la souche à testé.

La concentration la plus faible de NPs inhibant la croissance après 18 à 24 heures d'incubation est la CMI (**Prescott et al ., 2010**).

-Parallèlement à la CMI, on réalise un dénombrement sur gélose nutritif des bactéries pour chaque concentration après (16, 18, 24,72h).

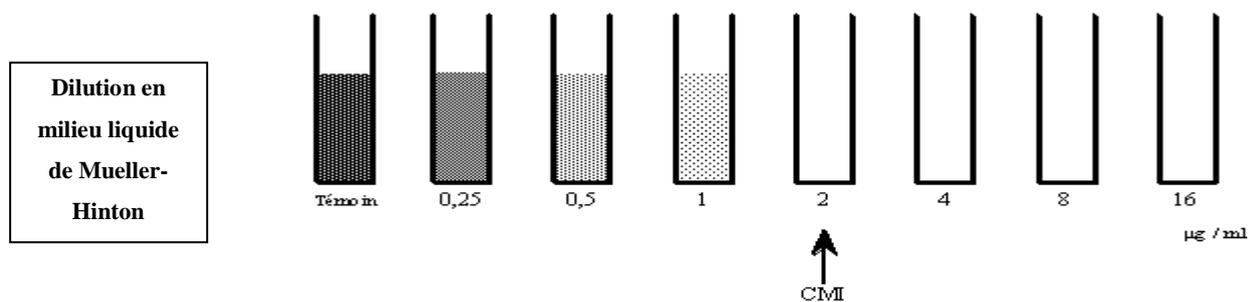


Figure 06: Concentration minimale inhibitrice (Carryn, 2013)

II-1-6-Détermination de la concentration minimale bactéricide(CMB) :

Principe

C'est la plus faible concentration de la molécule à tester capable de tuer les bactéries après 24 h d'incubation dans un milieu de croissance spécifique.

On détermine la CMB en transférant un échantillon des tubes ne présentant pas de croissance dans un milieu frais dépourvu des molécules à tester (**Carryn, 2013; Prescott et al ., 2010**).

Technique :

- Dilution en milieu liquide de Mueller-Hinton
- Lecture de la CMI à 24 h et dénombrement bactérien dans l'inoculum de départ
- Repiquage des tubes sans croissance visible
- Dénombrement bactérien après 24 h et comparaison avec l'inoculum de départ

I- Résultats :

Dans cette partie, nous allons présenter les résultats obtenus dans notre travail relatifs aux paramètres mesurés.

I-1- Détermination de l'activité antibactérienne des nanoparticules:**I- 1-1- Activité antibactérienne d'oxyde de Zinc (ZnO):**

Après incubation à 37C° pendant 24h, nous avons observés et mesurés le diamètre des zones d'inhibition autour des disques d'ATB et autour des disques (ATB + ZnO)[les diamètres des zones d'inhibition des ATB et (ATB + ZnO) pour les deux souches (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) sont représentés dans les tableaux (4,5) et les figures (7,8), nous avons observés une augmentation des diamètres des zones d'inhibition des ATB (Pt15 avec 2mm) et (Ox1 avec 4mm) avec le ZnO pour *S.aureus* et aucune augmentation des diamètres des zones d'inhibition est observés avec les différents (ATB + ZnO) pour *P.aeruginosa*.

Tableau 04 : Diamètres des zones d'inhibition de *S.aureus* (ATB +ZnO).

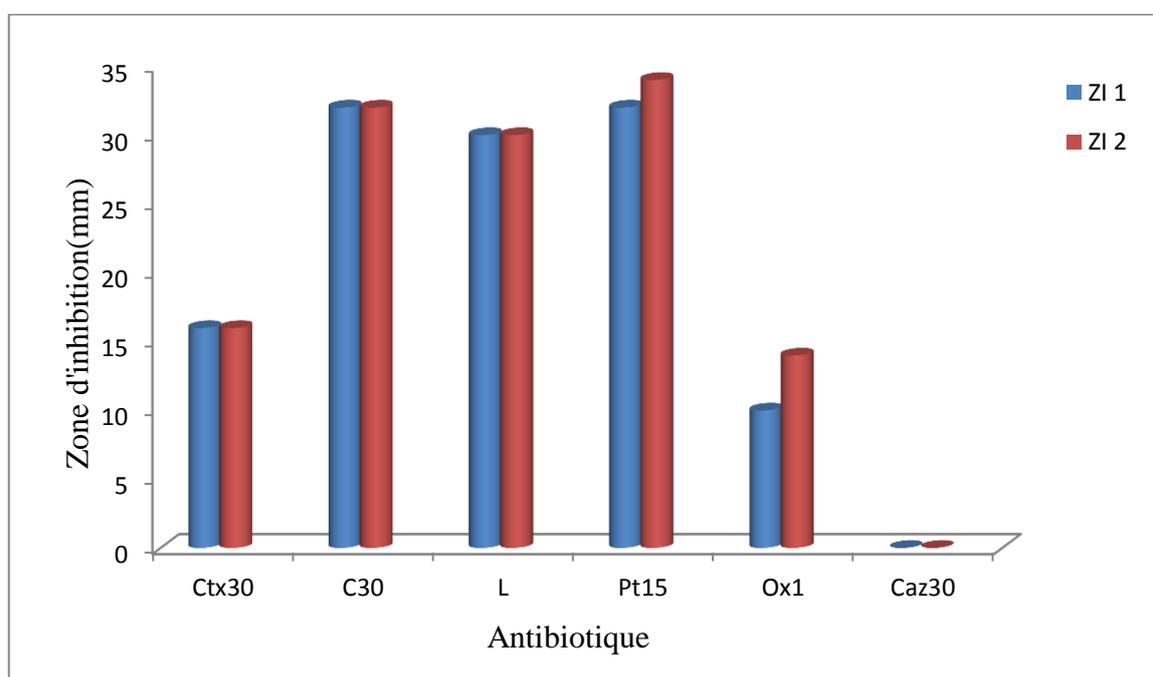
Antibiotiques	ZI 1 (mm)	ZI 2 (mm)	Augmentation ZI (mm)
Ctx30	16	16	00
C30	32	32	00
L	30	30	00
Pt15	32	34	02
Ox1	10	14	04
Caz30	0	0	00

[ZI 1 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB +ZnO).]

Tableau 05 : Diamètres des zones d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB +ZnO).

Antibiotiques	ZI 1(mm)	ZI 2(mm)	Augmentation ZI (mm)
Ctx30	38	38	00
C30	36	36	00
L	15	15	00
Pt15	12	12	00
Ox1	00	00	00
Caz30	00	00	00
Mtr	00	00	00

[ZI 1 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa*(ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB +ZnO).]

Figure 07 : Zones d'inhibition de *S. aureus* (ATB +ZnO).

[ZI 1 : zone d'inhibition de *S. aureus* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *S. aureus* (ATB +ZnO).]

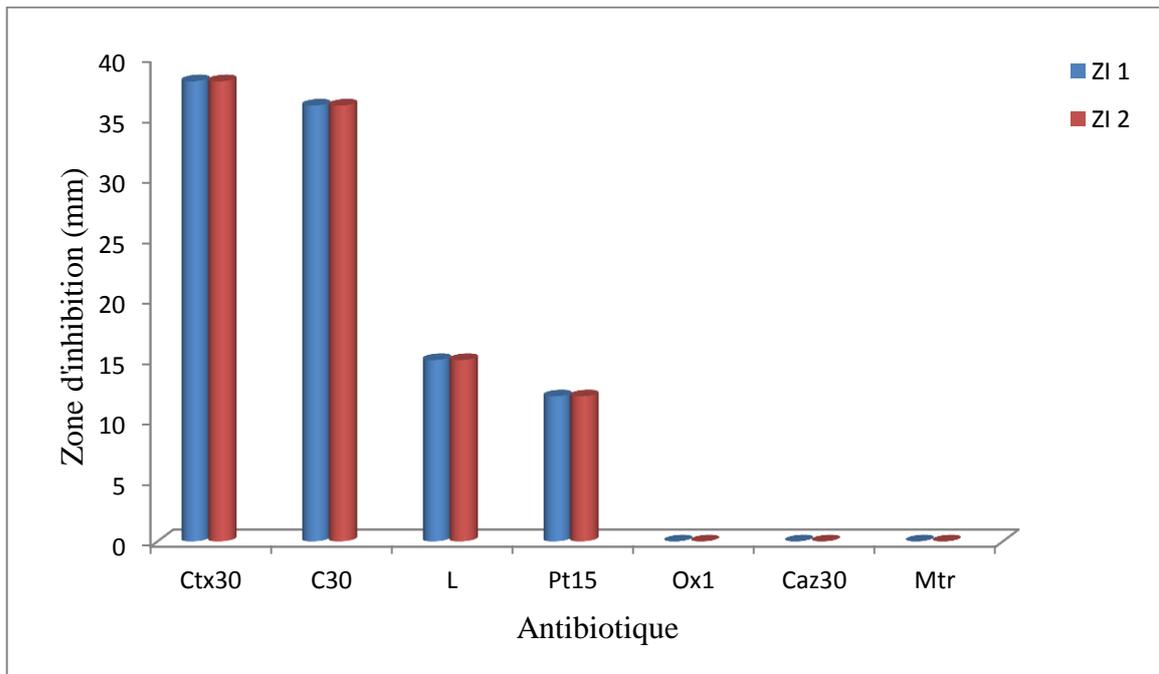


Figure 08 : Zones d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB +ZnO).

[ZI 1 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB +ZnO).]



(a)

(b)

Figure 09: Antibiogramme de *S. aureus* [(sans ZnO (a) et avec ZnO (b))].

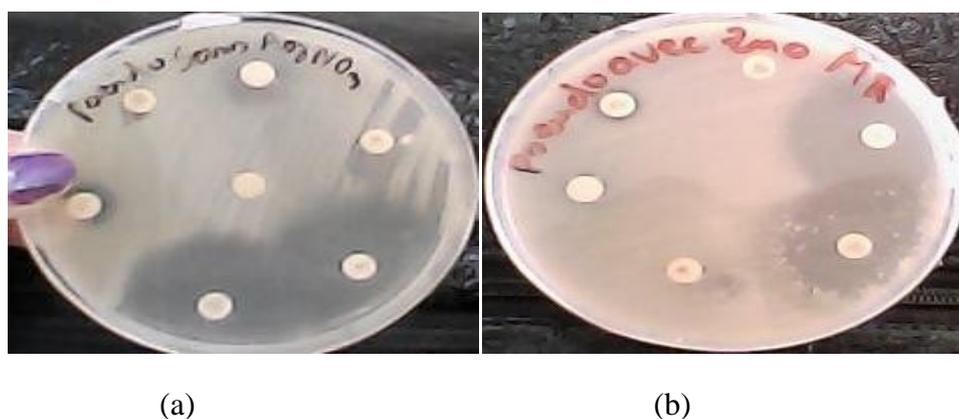


Figure 10 : Antibiogramme de *P.aeruginosa* [(sans ZnO (a) et avec ZnO (b))].

I-1- 2- Activité antibactérienne d'AgNO₃:

Les diamètres des zones d'inhibition des ATB et (ATB+AgNO₃) pour les deux souches testées sont représentés dans les Tableaux (6, 7) et les figures (11, 12).

Après incubation à 37C° pendant 24h , nous constatons une augmentation des zones d'inhibition avec Pt15, L, CTX (2mm), OX (8mm), CAZ 30 (22mm) et Mtr (28 mm) pour *S.aureus* , Une augmentation des diamètres des zones d'inhibition est observée avec C30 (1 mm), L (6mm), Pt15 (28mm), OX (18mm), CAZ 30 (30 mm), et Mtr (28 mm) pour *P.aeruginosa*.

Tableau 06 : Diamètres des zones d'inhibition de *S.aureus* (ATB +AgNO₃).

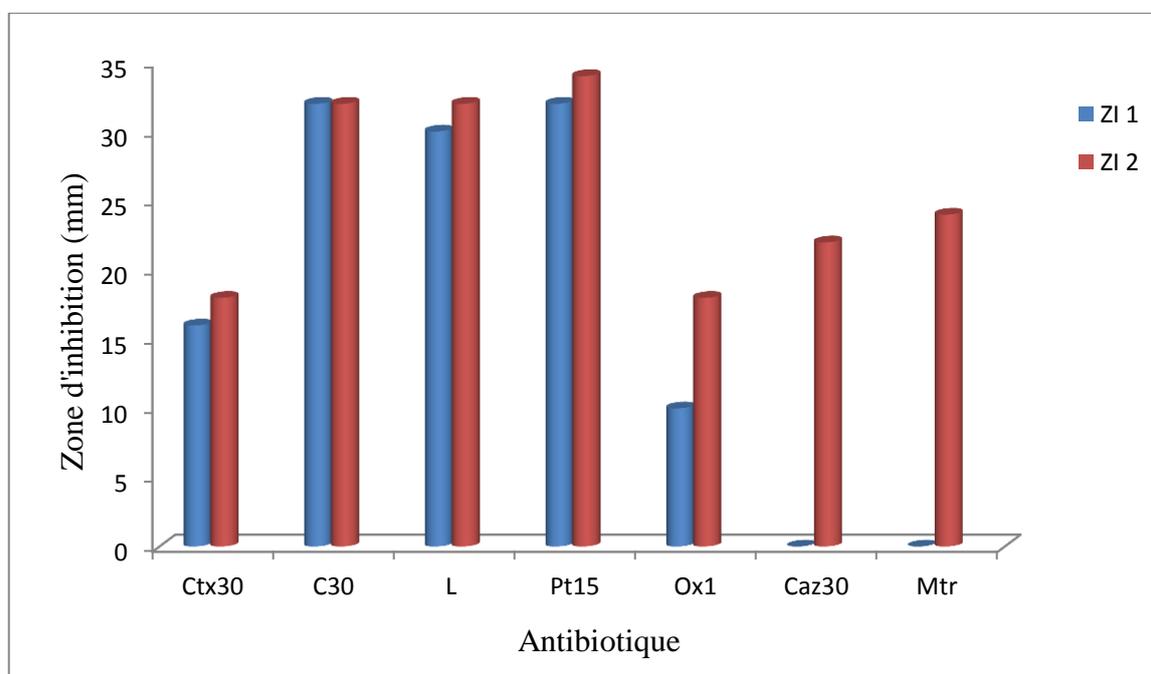
Antibiotiques	ZI 1	ZI 2	Augmentation ZI (mm)
Ctx30	16	18	02
C30	32	32	0
L	30	32	02
Pt15	32	34	02
Ox1	10	18	08
Caz30	0	22	22
Mtr	0	28	28

[ZI 1 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB +AgNO₃)].

Tableau 07: Diamètres des zones d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB + AgNO₃).

Antibiotiques	ZI 1(mm)	ZI 2 (mm)	Augmentation ZI (mm)
Ctx30	38	38	00
C30	36	37	01
L	15	21	06
Pt15	12	20	08
Ox1	00	18	18
Caz30	00	24	24
Mtr	00	28	28

[ZI 1 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (ATB + AgNO₃)].

Figure 11 : Zones d'inhibition de *S.aureus* (ATB + AgNO₃).

[ZI 1 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB), ZI 2 : zone d'inhibition de *S.aureus* (ATB + AgNO₃)].

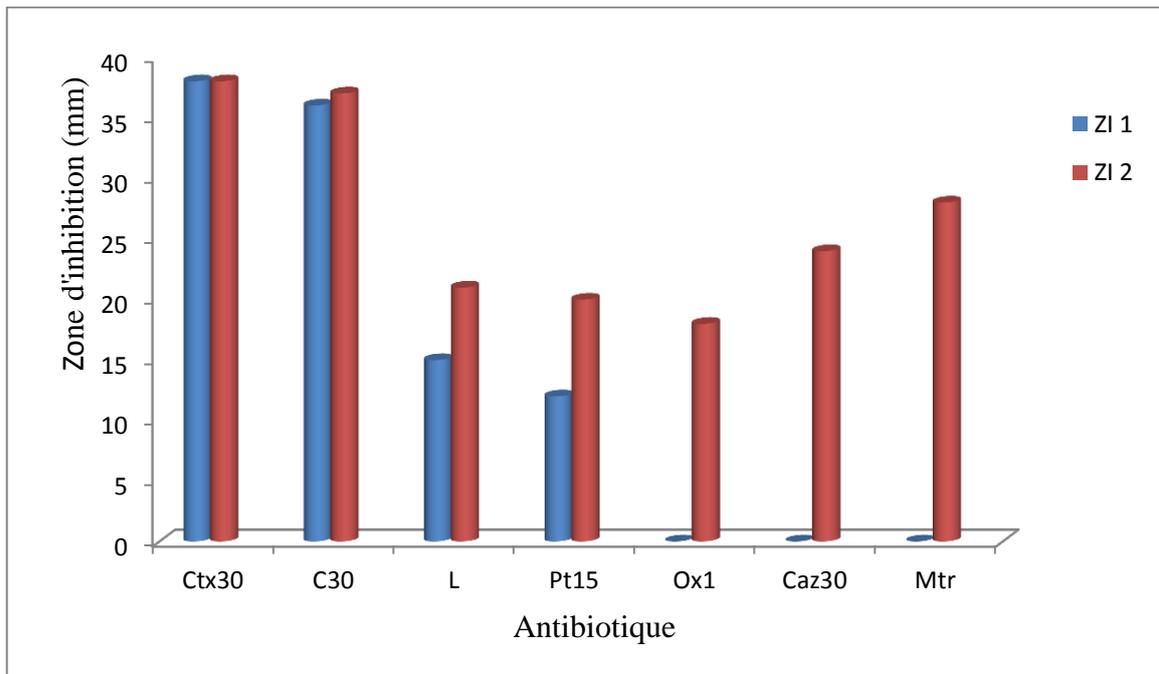


Figure 12 : Zones d'inhibition de *P. aeruginosa* (ATB + AgNO₃).

[ZI 01 : Zone d'inhibition de *P. aeruginosa* (ATB), ZI 02 : Zone d'inhibition de *P. aeruginosa* (ATB+AgNO₃)].

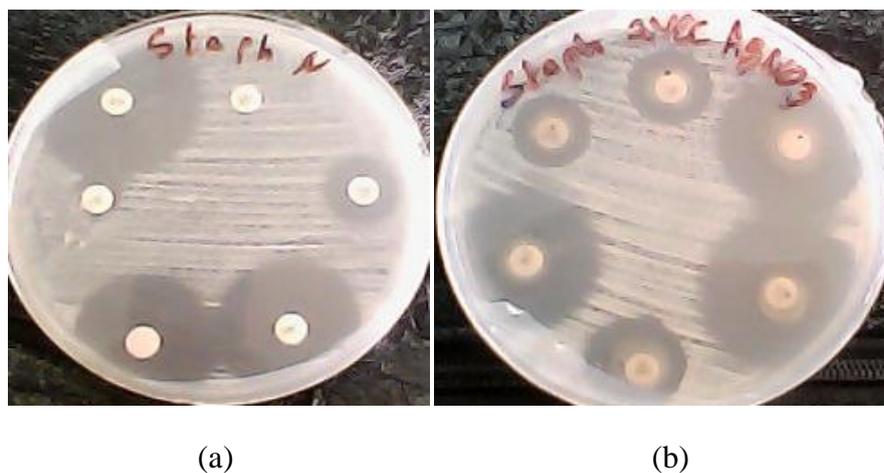


Figure 13 : Antibiogramme de *S. aureus* [sans AgNO₃(a)et avec AgNO₃(b)].



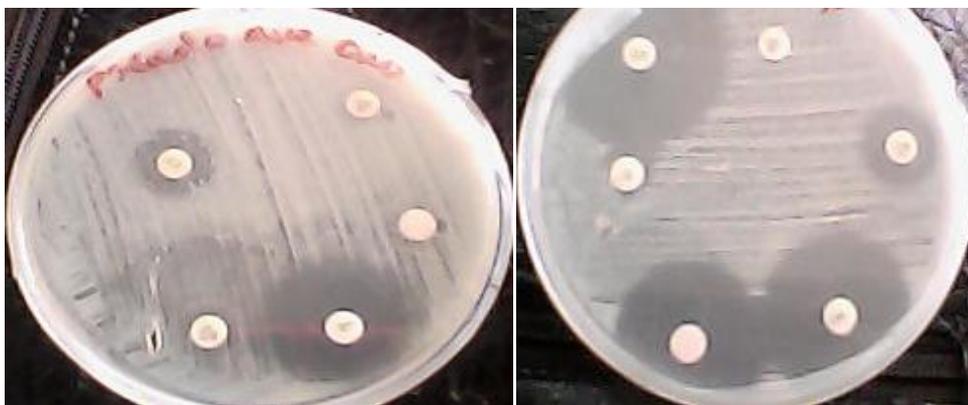
(a)

(b)

Figure 14 : Antibiogramme de *P.aeruginosa* [sans AgNO_3 (a) et avec AgNO_3 (b)].

I-1- 3- Activité antibactérienne d'oxyde de cuivre (CuO):

Absence d'augmentation des zones d'inhibition avec l'oxyde de cuivre autour des disques d'antibiotiques.



(a)

(b)

Figure 15 : Antibiogramme de *P.aeruginosa* (a) et *S. aureus* avec CuO (b).

I- 2-Détermination de l'activité antibactérienne des NPs (diffusion en puits) :

Après incubation à 37C° pendant 24h, nous avons observées pour les deux souches testées, des zones d'inhibition autour des puits de différentes concentrations d' AgNO_3 (Tableau 8, Figure 18)

Nous avons constatés que le diamètre de la zone d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration d' AgNO_3 (0-16) pour *S. aureus* et (0-18) pour *P.aeruginosa*, (dose-dépendante).

Aucune zone d'inhibition n'est observée avec cette technique pour les deux molécules (ZnO, CuO) Tableau (16), Figure (17).



(a)

(b)

Figure 16 : Zone d'inhibition de *P. aeruginosa* (a) et *S. aureus* avec ZnO (b) (diffusion en puits).



(a)

(b)

Figure 17 : Diamètres des zones d'inhibition de *S. aureus* (a) et *P. aeruginosa* avec CuO (b) (diffusion en puits).

Tableau 08 : Diamètres des zones d'inhibition de *P.aeruginosa* et *S. aureus* vis-à-vis d'AgNO₃ (diffusion en puits).

concentration (µg/ ml)	ZI 1 (mm)	ZI 2 (mm)
512	18	16
256	16	14
128	14	12
64	14	12
32	12	10
16	11	9
8	10	0
0	0	0

[ZI 01 : Zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (+AgNO₃), ZI 02 : Zone d'inhibition de *S.aureus* (+AgNO₃)].

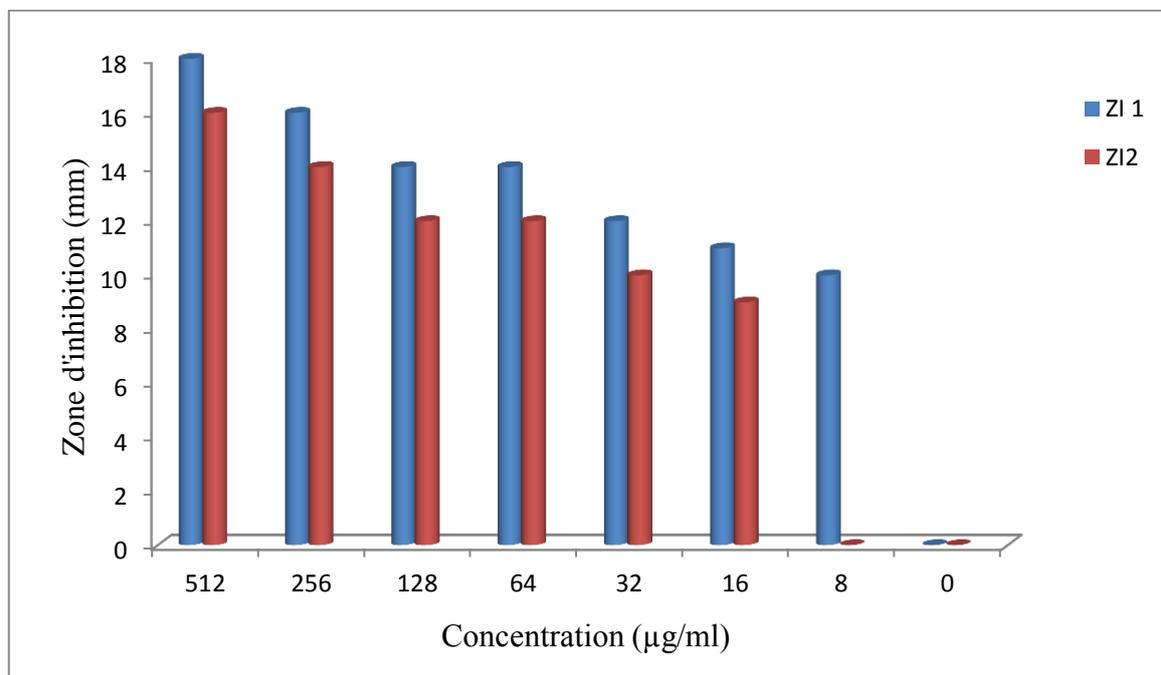


Figure 18 : Zones d'inhibition de *P.aeruginosa* et *S.aureus* (diffusion en puits).

[ZI 01 : Zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (+AgNO₃), ZI 02 : Zone d'inhibition de *S.aureus* (+AgNO₃)].



(a)

(b)

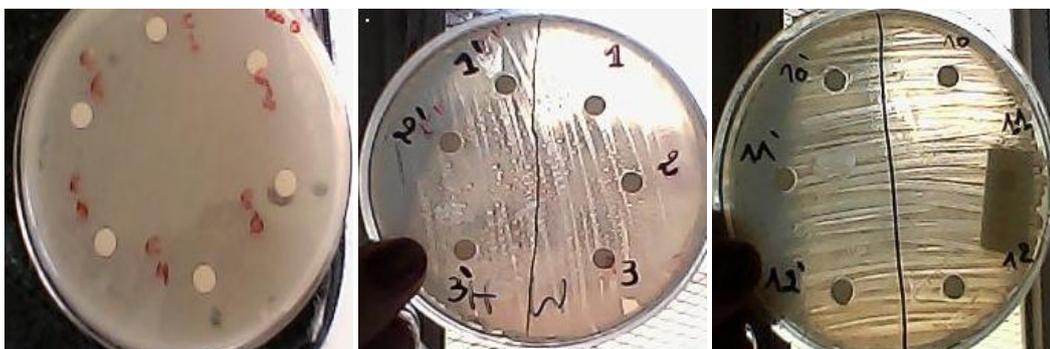
Figure 19 : Diamètres des Zones d'inhibition de *P. aeruginosa* (a) et *S. aureus* (b) avec AgNO_3 (diffusion en puits).

I- 3- Détermination d'activités antibactériennes des NPs (par papier buvard) :

Après incubation à 37°C pendant 24h, nous avons observées pour les deux souches testées, des zones d'inhibition autour des disques imbibés de différentes concentrations d' AgNO_3 (Tableau 9, figure 22).

Nous avons constatés que le diamètre de la zones d'inhibition augmente avec l'augmentation de la concentration d' AgNO_3 , il est de (0-26mm) pour *S. aureus* et de (0-16 mm) pour *P. aeruginosa* (dose-dépendante).

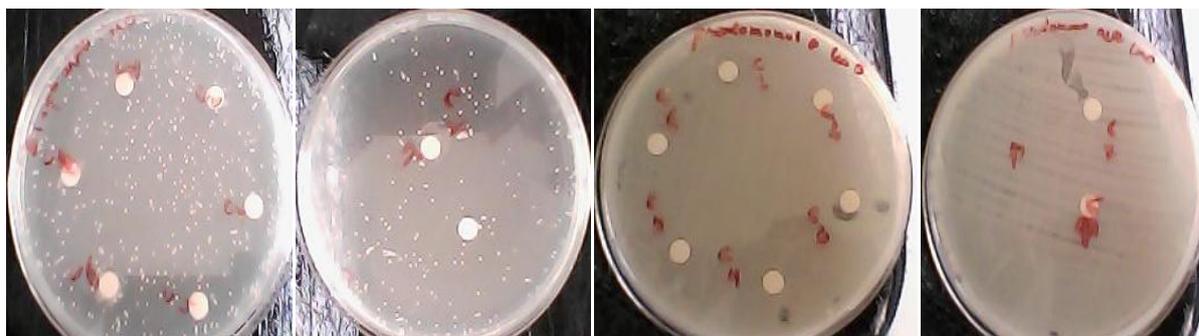
Aucune zone d'inhibition n'est observée avec cette technique pour les deux molécules (ZnO , CuO) (figure 20,21).



(a)

(b)

Figure 20: Diamètres des Zones d'inhibition de *P. aeruginosa* (a) et *S. aureus* (b) avec ZnO (par papier buvard).



(a)

(b)

Figure 21 : Diamètres des Zones d'inhibition de *S. aureus* (a) et *P. aeruginosa* (b) avec CuO (par papier buvard).

Tableau 09 : Diamètres des zones d'inhibition de *P. aeruginosa* et *S. aureus* vis-à-vis d'AgNO₃ (par papier buvard).

concentration (µg/ ml)	ZI 1 (mm)	ZI 2 (mm)
512	16	26
256	14	25
128	14	24
64	14	20
32	14	18
16	13	16
8	0	12
0	0	0

[ZI 01 : Zone d'inhibition de *P. aeruginosa* (+AgNO₃), ZI 02 : Zone d'inhibition de *S. aureus* (+AgNO₃)].

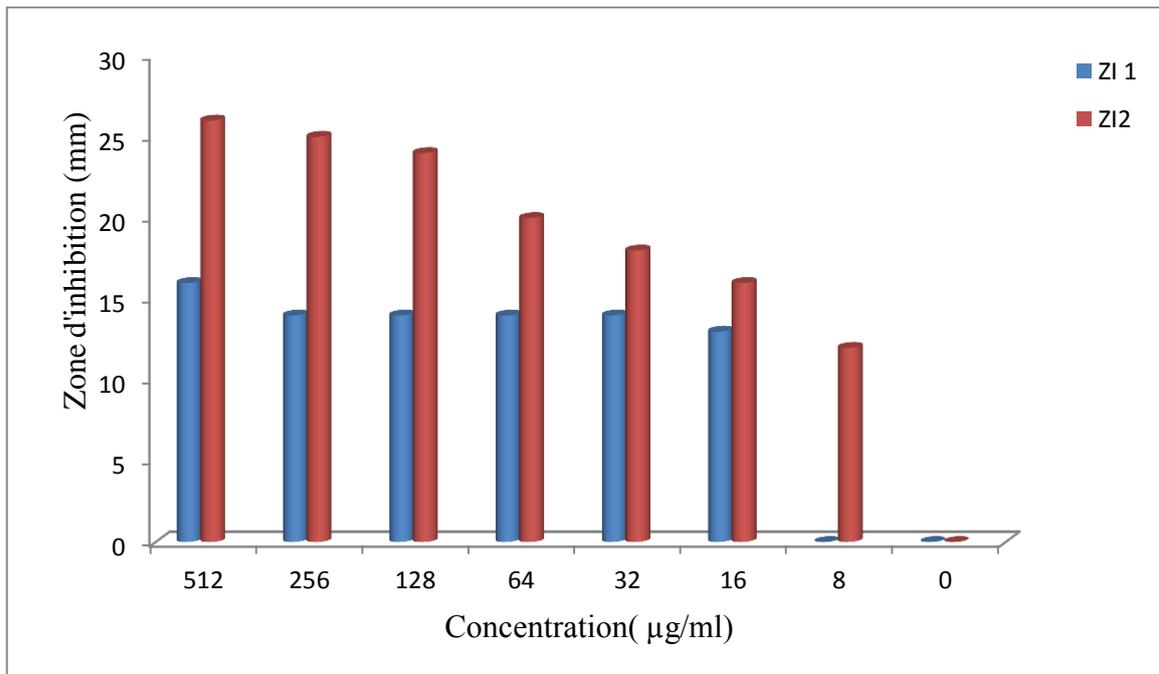


Figure 22 : Zones d'inhibition de *P.aeruginosa* et *S.aureus* (par papier buvard).

[ZI 01 : Zone d'inhibition de *P.aeruginosa* (+AgNO₃), ZI 02 : Zone d'inhibition de *S.aureus* (+AgNO₃)].

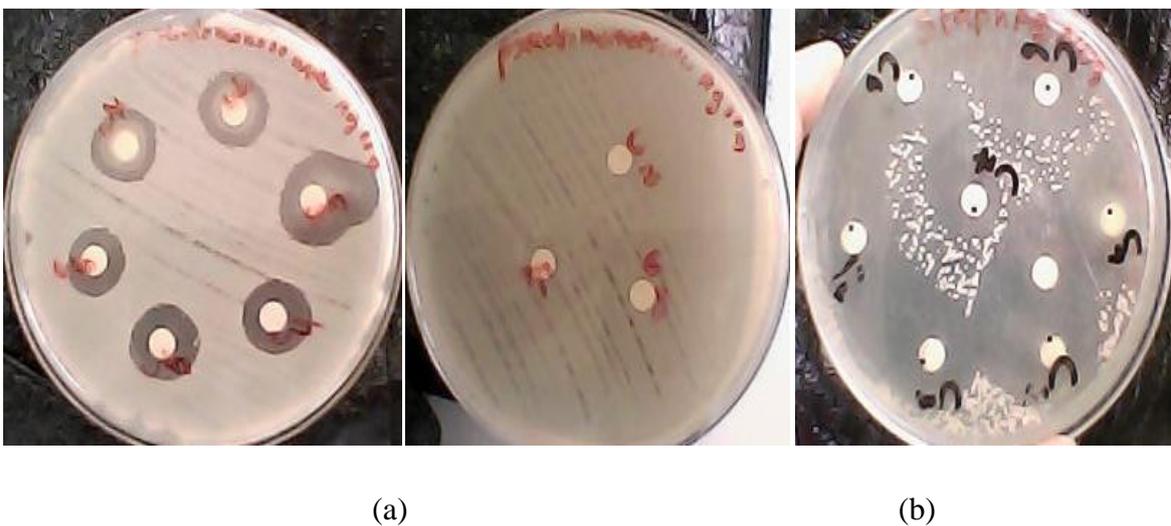


Figure 23 : Diamètres des zones d'inhibition de *P.aeruginosa* (a) et *S.aureus* (b) avec AgNO₃ (par papier buvard).

I-4- Détermination de la concentration minimale inhibitrice des NPs (ZnO, AgNO₃, CuO) :

L'évaluation de l'activité antibactérienne des NPs (ZnO, AgNO₃, CuO) a été réalisée par la méthode de dilution en milieu liquide.

Les résultats obtenus montrent que l'AgNO₃ possède une activité antibactérienne vis-à-vis des souches testées avec CMI faible de 8 à 16 µg/ml, elle est de 8 µg/ml pour *P.aeruginosa* et 16 µg/ml pour *S.aureus* (Tableau 12).

Une absence de la CMI est observée pour le CuO et le ZnO vis-à-vis des souches testées (Tableau 10,11).

Tableau 10 : les valeurs de CMI de ZnO vis-à-vis de (*S.aureus*, *P.aeruginosa*).

Souches	CMI (µg/ml)
<i>P.aeruginosa</i>	Absence
<i>S.aureus</i>	Absence

Tableau 11 : les valeurs de CMI de CuO vis-à-vis de (*S.aureus*, *P.aeruginosa*).

Souches	CMI (µg/ml)
<i>P.aeruginosa</i>	Absence
<i>S.aureus</i>	Absence

Tableau 12 : les valeurs de CMI d'AgNO₃ vis-à-vis de (*S.aureus*, *P.aeruginosa*).

Souches	CMI (µg/ml)
<i>P.aeruginosa</i>	08
<i>S.aureus</i>	16

I-5- Détermination de la concentration minimale bactéricide des NPs (ZnO, AgNO₃, CuO) :

La comparaison des dénombrements bactériens effectués après incubation en présence d'AgNO₃ a permis de déterminer un nombre inférieur à 10²UFC/ml dans toutes les boîtes ce qui correspond à un nombre inférieur à 0,01% du nombre initial des bactéries (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) avec CMB=16 µg/ml pour *S.aureus* et de 512 µg/ml pour *P.aeruginosa* (Tableau 14), et l'absence de la CMB des nanoparticules de CuO et ZnO (Tableau 13).

Tableau 13: les valeurs de CMB des NPs (ZnO et CuO).

Souches	C MB (µg/ml)
<i>P.aeruginosa</i>	absence
<i>S.aureus</i>	absence

Tableau 14 : les valeurs de CMB (AgNO_3).

Souches	C MB ($\mu\text{g/ml}$)
<i>P.aeruginosa</i>	512
<i>S.aureus</i>	16

I- 6- Résultats de dénombrement de *S.aureus* et *P.aeruginosa* en présence de différentes concentrations des NPs:

Les courbes de croissance offrent des données quantitatives permettant une analyse fiable de l'effet d'une substance donnée (ZnO , AgNO_3 , CuO) sur les souches étudiées (*S.aureus* et *P.aeruginosa*).

les tableaux (15, 16, 17, 18) et Les figures (24, 25, 26, 27) mettent en évidence l'évolution de la croissance des bactéries (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) en fonction du temps et en présence de différentes concentrations des NPs métalliques, nous remarquons que chez les témoins, le nombre des unités formant une colonie reste constante avec le temps. En revanche, chez les traités par les différentes concentrations des NPs métalliques (AgNO_3 et ZnO), nous constatons une diminution de la croissance d'une façon dose-dépendante par rapport aux témoins. Une forte diminution des unités formant une colonie est observées avec les souches bactériennes (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) en présence d' AgNO_3 avec une légère diminution est observé en présence de ZnO .

➤ Dénombrement de *S.aureus* et *P.aeruginosa* en de différentes concentrations des NPs:

Tableau 15: UFC/ ml de *S.aureus* en fonction de différentes concentrations de ZnO .

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	UFC/ml (après 16 h)	UFC /ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC /ml (après 72h)
512	5×10^3	5×10^3	5×10^3	5×10^3
256	55×10^2	55×10^2	55×10^2	55×10^2
128	10^4	10^4	10^4	10^4
64	15×10^3	15×10^3	15×10^3	15×10^3
32	18×10^3	18×10^3	18×10^3	18×10^3
16	19×10^3	19×10^3	19×10^3	19×10^3
8	21×10^3	21×10^3	21×10^3	21×10^3
0	29×10^3	29×10^3	29×10^3	29×10^3

Tableau 16: UFC/ ml de *P.aeruginosa* en fonction de différentes concentrations de ZnO.

Concentration (µg/ml)	UFC/ml (après 16 h)	UFC /ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC /ml (après 72h)
512	4190	4190	4190	4190
256	52×10^2	52×10^2	52×10^2	52×10^2
128	87×10^2	87×10^2	87×10^2	87×10^2
64	101×10^2	101×10^2	101×10^2	101×10^2
32	14×10^3	14×10^3	14×10^3	14×10^3
16	19×10^3	19×10^3	19×10^3	19×10^3
8	21×10^3	21×10^3	21×10^3	21×10^3
0	81×10^3	81×10^3	81×10^3	81×10^3

➤ **Dénombrement de *S.aureus* et *P.aeruginosa* en fonction de différentes concentrations d'AgNO₃ :**

Tableau 17 : UFC/ml de *S.aureus* en fonction de différentes concentrations d'AgNO₃.

Concentration (µg/ml)	UFC /ml (après 16 h)	UFC/ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC /ml (après 72h)
512	4×10^2	360	270	190
256	2160	2×10^3	14×10^2	1350
128	35×10^2	3160	2850	2160
64	5090	5090	5090	5090
32	116×10^2	116×10^2	116×10^2	116×10^2
16	12×10^3	12×10^3	12×10^3	12×10^3
8	15×10^3	15×10^3	15×10^3	15×10^3
0	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2

Tableau 18: UFC/ml de *P.aeruginosa* en fonction de différentes concentrations d'AgNO₃.

Concentration (µg/ml)	UFC/ml (après 16 h)	UFC/ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC/ml (après 72h)
512	00	00	00	00
256	00	00	00	00
128	00	00	00	00
64	00	00	00	00
32	1930	190	19×10^2	1830
16	21×10^2	2030	2×10^3	1950
8	73×10^2	7290	7290	7110
0	81×10^3	81×10^3	81×10^3	81×10^3

➤ Dénombrement de *S.aureus* et *P.aeruginosa* en fonction de différentes concentrations de (CuO):

Tableau 19 : UFC/ml de *S.aureus* en fonction de différentes concentrations (CuO).

Concentration (µg/ml)	UFC/ml (après 16 h)	UFC/ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC/ml (après 72h)
512	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
256	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
128	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
64	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
32	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
16	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
8	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2
0	529×10^2	529×10^2	529×10^2	529×10^2

Tableau 20 : UFC/ml de *P.aeruginosa* en fonction de différentes concentrations (CuO).

Concentration (µg/ml)	UFC/ml (après 16 h)	UFC/ml (après 18 h)	UFC /ml (après 24 h)	UFC/ml (après 72h)
512	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
256	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
128	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
64	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
32	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
16	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
8	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4
0	8×10^4	8×10^4	8×10^4	8×10^4

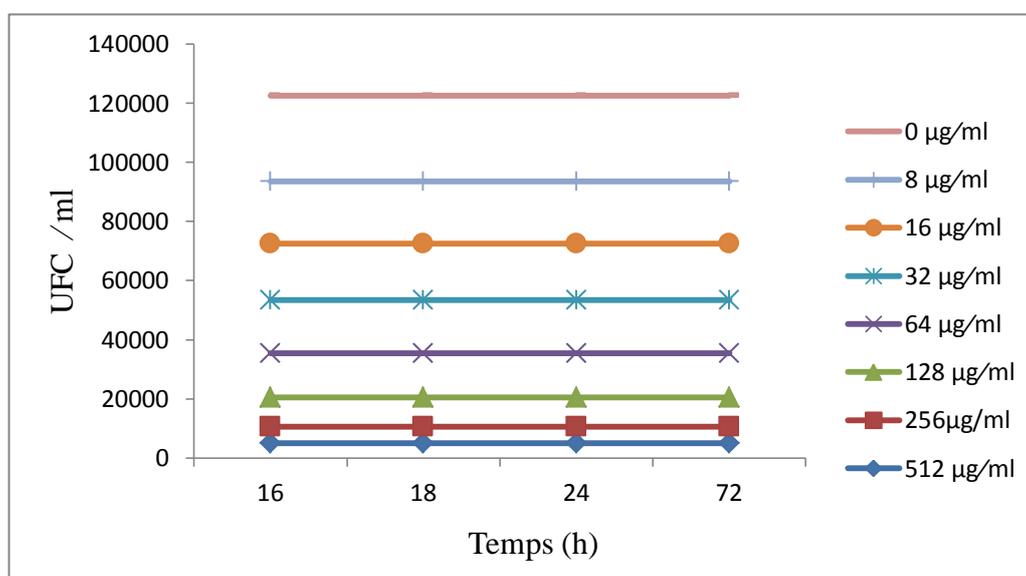


Figure 24 : UFC de *S.aureus* en présence de différentes concentrations de ZnO en fonction du temps.

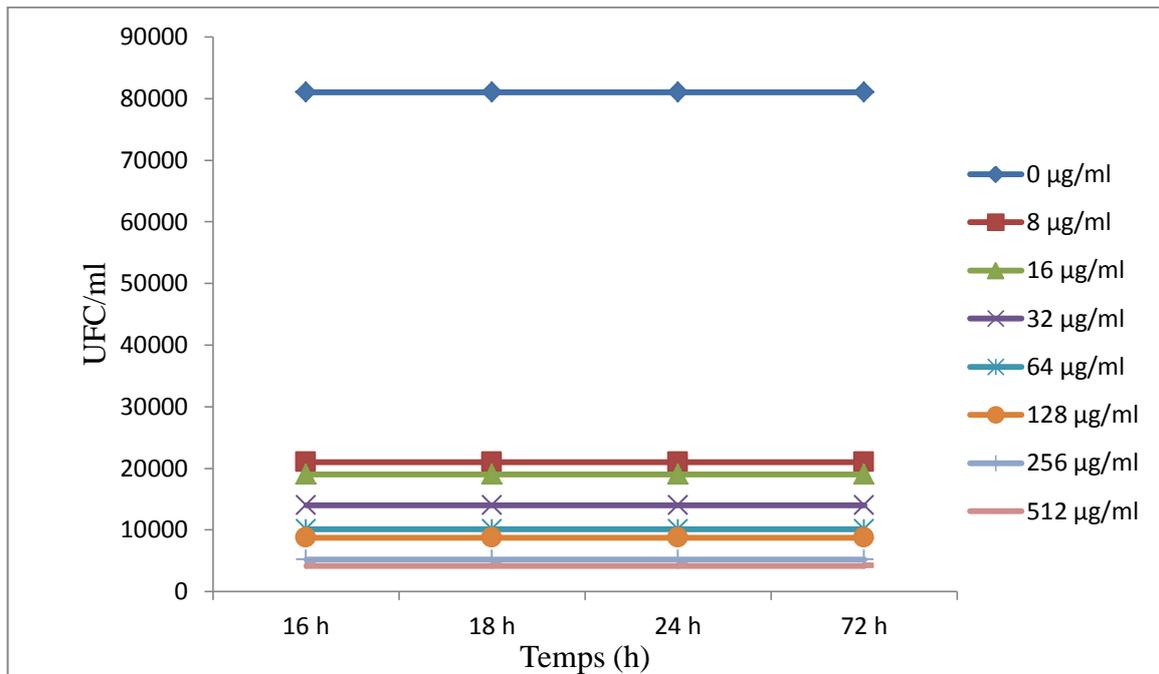


Figure 25 : UFC de *P.aeruginosa* en présence de différentes concentrations de ZnO en fonction du temps.

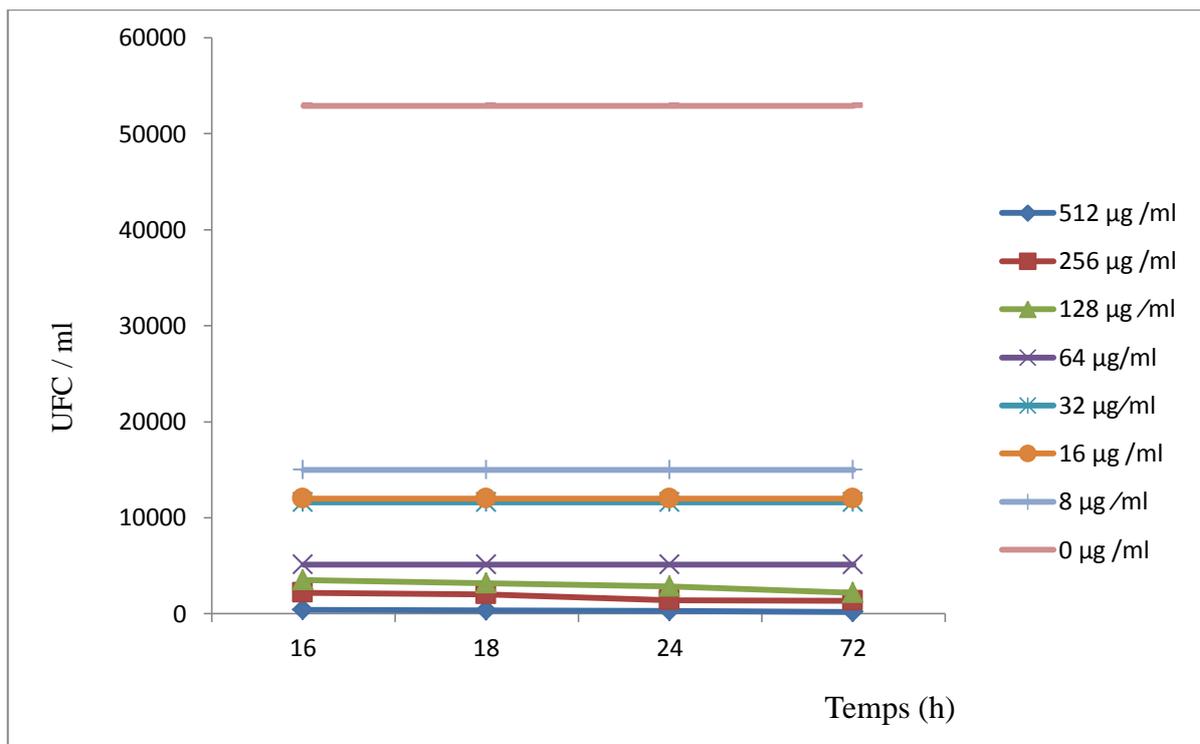


Figure 26 : UFC de *S.aureus* en présence de différentes concentrations d'AgNO₃ en fonction du temps.

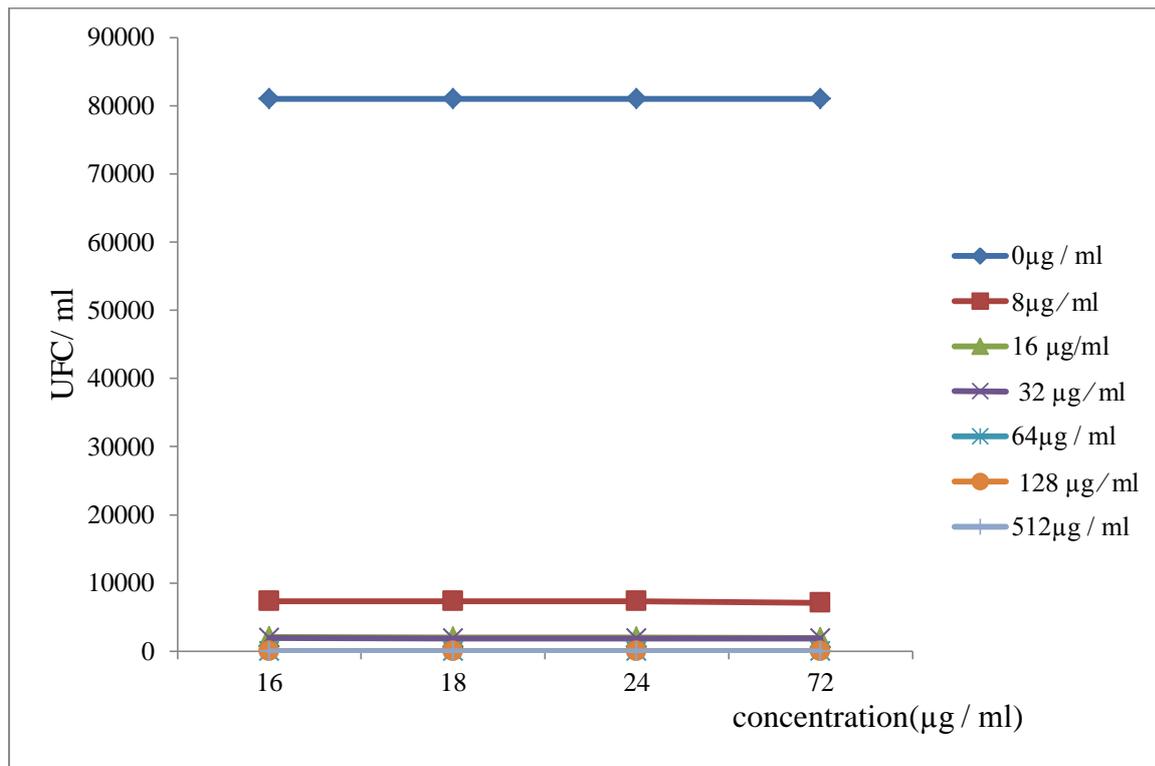


Figure 27 : UFC de *P.aeruginosa* en présence de différentes concentrations d' $AgNO_3$ en fonction du temps.

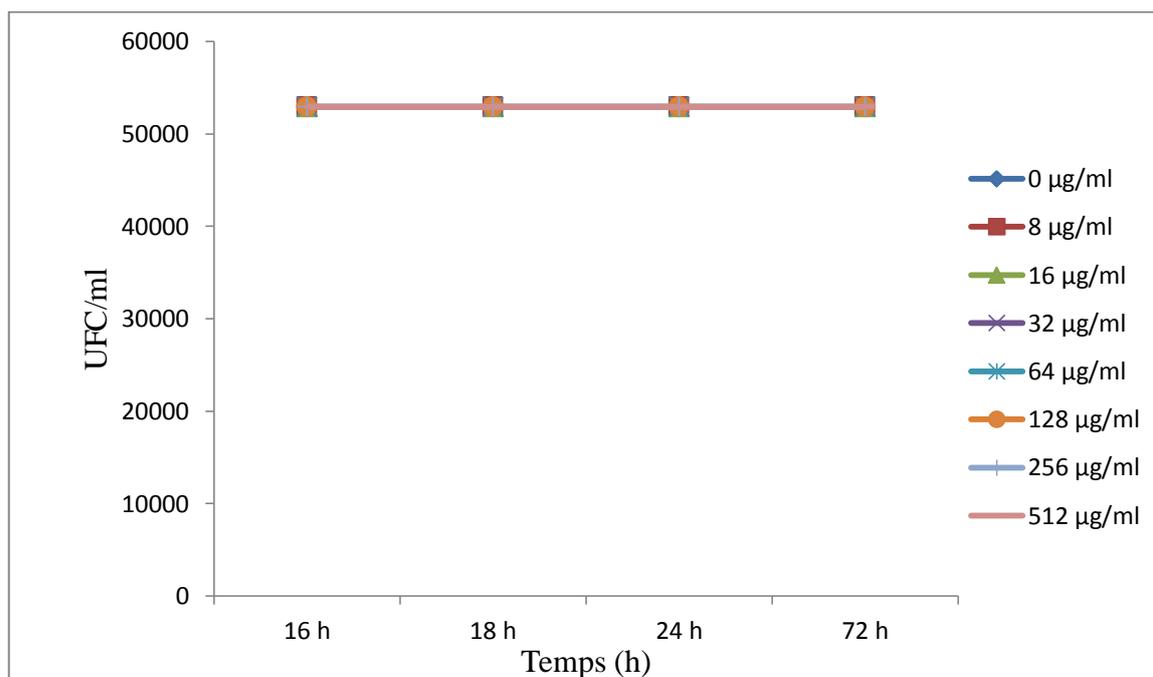


Figure 28 : UFC de *S.aureus* en présence de différentes concentrations de CuO en fonction du temps.

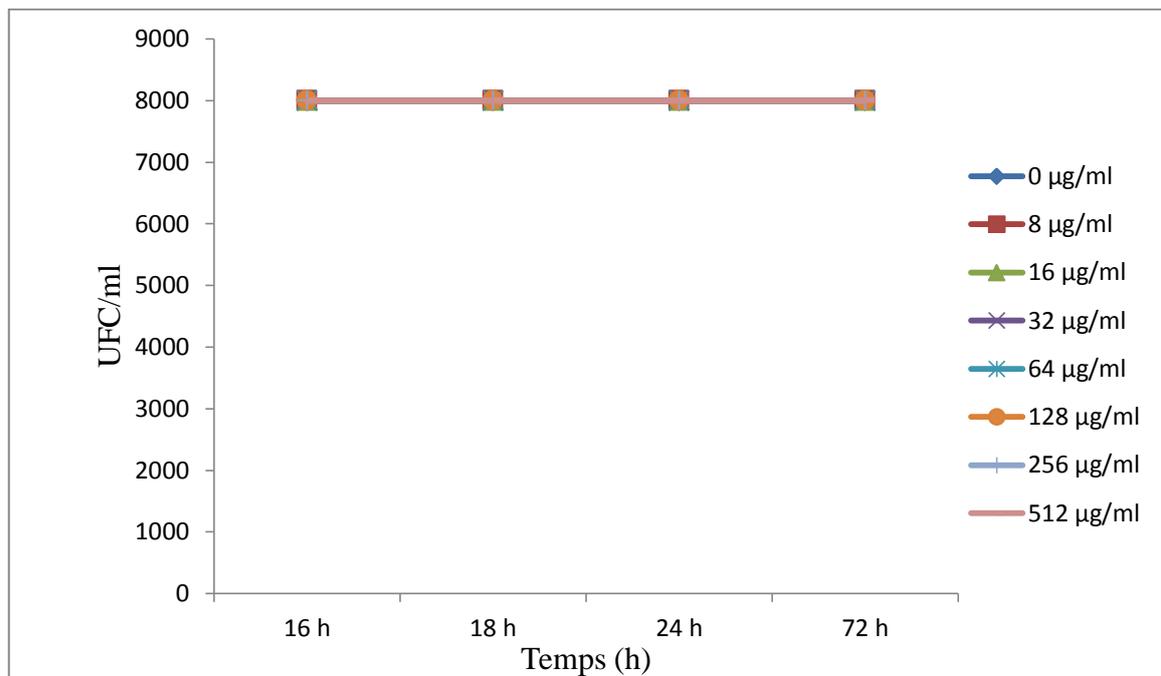


Figure 29 : UFC de *P.aeruginosa* en présence de différentes concentrations CuO en fonction du temps.

II-Discussion :

L'activité antibactérienne de certains éléments métalliques comme l'argent, le zinc, le cuivre...etc, est connue depuis l'époque romaine. Le rôle thérapeutique du Zinc a été établi dans plusieurs maladies dans ces dernières années .De plus l'oxyde de zinc de taille nanométrique offre des propriétés intéressantes pour entrer dans le domaine clinique (Mungkalasiri, 2009 ; Thati et al ., 2010).

Dans cette étude, nous sommes fixés pour but de mettre en évidence l'activité antibactérienne des nanoparticules métalliques nouvellement synthétisé (AgNO_3 , ZnO et CuO) sur deux souches bactériennes (*S.aureus* et *P.aeruginosa*).

Notre choix s'est porté sur deux micro-organismes à Gram différents, respectivement le *P. aeruginosa* (Gram négatif) et *S.aureus* (Gram positif), en raison de leur très large implication dans les phénomènes de contamination et d'infection rencontrées dans le domaine médical. A titre d'exemple, *P. aeruginosa*, quant à elle, est impliqué dans des infections au niveau des lentilles de contact et est le principal pathogène rencontré dans les bronchites chroniques chez les patients atteints de mucoviscidose et vue leurs fortes résistances envers les agents antibactériens (Bouloudenine, 2006 ;Rossignol , 2007) ; l'évaluation de l'activité antibactérienne des NPs métalliques est évaluée en utilisant la méthode de diffusion en gélose .Nous avons opté, dans un premier temps, pour un test d'évaluation de l'effet synergétique des NPs (AgNO_3 , ZnO et CuO) sur les propriétés antibactériennes de différents antibiotiques testés.

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la zone d'inhibitions autour des disques d'Oxacilline (4mm) , Pristinamycin (2mm) sur *S.aureus* avec ZnO , une augmentation de la zone d'inhibitions autour des disques (Ctx30, C30, L ,Pt15) (2mm), Ox1(8mm) , Caz30 (22mm), Mtr (28mm) sur *S.aureus* avec AgNO_3 , C30 (01mm) ,L(6mm) ,Pt15(8mm) Ox1(18 mm),Caz30 (24mm) Mtr (28mm) sur *P.aeruginosa* avec AgNO_3 et aucune augmentation des diamètres des zones d'inhibition est observée avec le CuO .

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Thati et al ., 2010) qui ont mis en évidence une augmentation de la taille des zones d'inhibition en présence du ZnO - ATB, la taille est différente d'un ATB à un autre des ATB de la famille des B-Lactamines, des céphalosporines, des macrolides...etc.

L'activité antibactérienne des NPs métalliques est évaluée aussi en utilisant la méthode de diffusion en gélose (Diffusion en puits et par papier buvard) (**karvanie et al ., 2011**).

Nos résultats ont mis en évidence une augmentation de la zone d'inhibitions avec l'augmentation de la concentration des NPs d'AgNO₃ avec la diffusion en puits et par papier buvard, le diamètre de la zone d'inhibition varie selon la souche bactérienne, elle est de (0-18 mm) pour *S.aureus*, (0-16 mm) pour *P.aeruginosa* avec la méthode de diffusion en puits, de (0-16mm) pour *S.aureus* ,de (0-26mm) pour *P.aeruginosa* avec la méthode de diffusion (par papier buvard)

Nos résultats sont en accord avec ceux de (**karvanie et al ., 2011**) qui ont mis en évidence que l'augmentation de la zone d'inhibition en présence d'oxyde de Zinc est dose –dépendante par la diffusion en puits et par papier buvard et en fonction de la souche bactérienne (*S.aureus* et *E.coli*).

Ceci est en accord aussi avec les travaux de (**Mervuyu et al ., 2011**) qui ont mis en évidence une augmentation de la taille des zones d'inhibition autour des disques (ATB-ZnO) vis-à-vis des souches bactériennes (*E.coli* et *Bacillus subtilis*) avec différentes ATB (Gentamicine ,Tétracycline ,Vancomycine, Acide nalidixique....etc.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) est l'indicateur le plus utilisé pour évaluer la sensibilité d'une bactérie à un agent antibactérien (**Mungkalasiri, 2009**), nos résultats ont mis en évidence que la CMI d'AgNO₃ est de 8µg/ml pour *S.aureus* et 16µg/ml pour *P.aeruginosa* avec une Absence de la CMI avec le CuO et le ZnO.

Nos résultats sont en accord avec ceux (**Mtimet, 2011**) qui a relevé des valeurs de CMI variant entre 6,75 µg d'Ag/ml et 54 µg d'Ag/ml pour des nanoparticules d'argent avec les souches (*P. aeruginosa*, *E. faecalis*).

La CMB est de 16µg/ml pour *S.aureus* et 512µg/ml pour *P.aeruginosa*, le rapport CMB/CMI est de 1 pour *S.aureus* et supérieur à 4 pour *P.aeruginosa* ce qui explique que l'AgNO₃ est bactéricide pour *S.aureus* et bactériostatique pour AgNO₃. Ces résultats sont en accord avec les travaux de (**karvanie et al ., 2011**).

L'effet antibactérien de l'argent sur les deux souches modèle est expliqué par la libération des ions Ag⁺, ces ions Ag⁺ interagissent fortement avec les groupements thiols des enzymes vitales en les désactivant (**Morones et al ., 2005**).

Feng et *al.*, (2000) ont aussi montré que l'ADN des bactéries perdait l'information de reproduction quand les bactéries (*E. coli.* et *S. aureus*) étaient exposées aux ions argent. D'autres travaux ont montré que les ions argent interagissaient avec les protéines (groupe de sulphydryl) également avec les composantes internes des bactéries comme l'acide nucléique (Mungkalasiri, 2009).

D'un autre côté, les interactions entre les ions Ag⁺ et les groupements chargés négativement présents sur les parois bactériennes provoquent des dommages structurels majeurs, notamment des trous. Ceci augmente la perméabilité membranaire et facilite la sortie des constituants cellulaires, ainsi que la pénétration des ions Ag⁺ dans la cellule. L'ensemble de ces phénomènes conduit à la mort de la bactérie (Mtimet, 2011).

L'évaluation des effets cytotoxiques d'une NPs métalliques peut être réalisés en utilisant différents paramètres, parmi les quels la croissance cellulaire (unités formant des colonies) qui reflète chez les microorganismes l'état du métabolisme de la cellule (Perez et *al.* , 2002).

Nous avons opté ce test de cytotoxicité rapide permettant de classer la toxicité de ces molécules (nanoparticules métalliques) testée par le biais de l'évolution de la courbe de dénombrement des souches bactériennes (mesure de la croissance).

Nos résultats ont mis en évidence une diminution de la croissance des souches bactériennes en présences des NPs métalliques (une forte inhibition avec AgNO₃). Une effet cytotoxique sur la viabilité cellulaire est observé sur les souches bactériennes avec (*S.aureus* et *P.aeruginosa*), cette toxicité se manifeste en premier lieu par une inhibition de la croissance cellulaire des souches (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) et une légère inhibition est observées avec (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) en présences de (ZnO). Ceci nous amène à confirmer l'influx des xénobiotique à l'intérieure des cellules, malgré la présence de la membrane cellulaire qui constitue une barrière contre l'entrée massive des xénobiotique mais qui reste perméable (Beamout et Cassier, 1998).

Nos résultats sont en accord avec les travaux de (Angélique, 2008) qui a mit en évidence qu'un effet cytotoxique à été observé chez la bactérie *E. coli* MG1655 et a été relié à une pénétration des NPs métalliques (à base de TiO₂) à travers la paroi bactérienne.

Nos résultats sont accord aussi avec les travaux de (Sondi et Salopek-Sondi, 2004) qui ont mis en évidence qu'une perturbation de la membrane est à l'origine de la toxicité. En effet, il a

été montré que les nanoparticules d'Ag adhèrent à la paroi, ce qui provoquerait la formation des puits et perméabiliserait la membrane, entraînant ainsi une expulsion du cytosol de la bactérie.

De même, d'après (Tsao et al., 2002), les carboxy fullerènes et des dérivés cationiques de fullerènes s'intégreraient à la paroi ce qui provoquerait une déstabilisation de la membrane et donc des fonctions cellulaires comme cela a été montré pour la chaîne respiratoire présente dans la membrane (Mashino et al., 1999, 2003).

D'autres travaux confortent nos résultats, notamment ceux de Fang et al., (2007) qui ont mis en évidence un changement de la composition lipidique de la membrane en présence de fullerènes, ce qui est la preuve d'une déstabilisation et/ou d'une adaptation des bactéries. Dans le cas d'une déstabilisation, cela pourrait être dû à la formation d'espèces réactives de l'oxygène qui entraîneraient par exemple une peroxydation des lipides de la membrane (Angélique, 2008). En raison de leur réactivité de surface, les nanoparticules sont capables d'induire la production d'espèce réactive de l'oxygène (ERO) et de provoquer un stress oxydant pour la cellule (Foucaud et al., 2007; Garza et al., 2008; Long et al., 2006).

Portant du principe que tout type de stress chimique provoque des dommages oxydatifs, engendrant un stress oxydant affecte considérablement la cellule et son fonctionnement. Lors d'un stress oxydant, les ERO non détoxifiés par le système antioxydant vont oxyder les macromolécules, telles les lipides, protéines, sucres et acides nucléiques, désorganisant leurs structures chimiques et altérant leurs fonctions biologiques (Igor, 2011).

D'autres travaux confortent nos résultats, notamment ceux de (karavani and Chehrizi, 2011) qui ont mis en évidence une diminution des unités formant colonies de (*S.aureus* et *E.coli*) en présence de différentes concentrations de ZnO.

Aucun effet cytotoxique n'est observé avec le (CuO) sur les deux souches bactériennes (*S.aureus* et *P.aeruginosa*), ce qui est expliqué par le mécanisme de résistance des bactéries au cuivre, ce mécanisme est due aux plasmides et aux protéines, selon l'espèce de bactérie, la protéine à l'origine de cette résistance est différente. Dans ce cas, les ions Cu^{2+} pénètrent dans la bactérie et sont repoussés vers l'extérieur après l'organisation des plasmides dans le cytoplasme (Mungkalasiri, 2009).

Nos résultats sont en accord avec ceux de Gail et al., (2003) qui ont mis en évidence la capacité de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* au cuivre sous forme de biofilms.

conclusion

Conclusion

Ce travail a pour but d'enrichir les connaissances sur les activité antibactériennes des nanoparticule métallique (AgNO_3 , ZnO et CuO) sur deux souches bactérienne à Gram différents, respectivement le *P. aeruginosa* (Gram négatif) et *S.aureus* (Gram positif), en raison de leur très large implication dans les phénomènes de contamination et d'infection rencontrées dans le domaine médical .

L'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules nanométriques (AgNO_3 , ZnO et CuO) seul et en combinaison avec les antibiotiques sur les deux micro-organismes modèles (*S.aureus* et *P.aeruginosa*) est évalué par la méthode de diffusion sur gélose (en puits et sur papier buvard), la détermination de la CMI et de la CBM.

Cette étude montre l'intérêt des deux espèces modèles pour l'évaluation de l'activité antibactérienne des molécules nanométriques (AgNO_3 , ZnO et CuO) :

- ✓ Il apparait clairement que l' AgNO_3 entraine une augmentation de l'activité antibactérienne des ATB sur les deux souches avec une légère augmentation avec le ZnO sur la souche *S.aureus*.
- ✓ La méthode de diffusion en puits et par papier buvard révèle que l'activité est dose-dépendante pou les deux souches *S.aureus* et *P. aeruginosa* avec l' AgNO_3 .
- ✓ Les valeurs de CMI (d' AgNO_3) pour *S.aureus* et *P. aeruginosa* sont respectivement $16\mu\text{g/ml}$ et $8\mu\text{g/ml}$, les valeurs de CMB (d' AgNO_3) pour *S.aureus* et *P. aeruginosa* sont respectivement $16\mu\text{g/ml}$ et $512\mu\text{g/ml}$.
- ✓ Les résultats monte que l' AgNO_3 exerce un effet bactéricide sur *S.aureus* et un effet bactériostatique sur *P. aeruginosa*.

De plus, il serait très important d'évaluer l'effet de ces molécules (AgNO_3) sur la cinétique de croissance et le développement de biofilms.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques :

-A-

Afsset,(2006) :Les nanomatériaux :effets sur la santé de l'homme et l'environnement.p :14 - 17.

Angélique, S. D., 2008. Effets biologiques des nanoparticules manufacturées : influence de leur caractéristique. Thèse de Doctorat, Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), France .p : 7-24.

Alid., Lacroix , C., Thuault , D., Bourgeois ,C. M. et Simard ,R. E. (2009) :

Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis subsp. lactis* by *diacetylactis* UL720.Vol.41, no9. p: 832-841.

-B-

Beaumont, A., et Cassier P., (1998) : Travaux pratique de Biologie Animale, Zoologie, Embryologie et Histologie. 2^{ème} cycle. Capes. Agrégation. Ed. Dunod. p: 123-143.

Bouloudenine, M., (2006) : Elaborisation et caractérisation de semi-conducteurs magnétiques dilués de type $Zn_{1-x}Co_xO$ par voies chimiques. Thèse de Doctorat en Physique des Semi-conducteurs, Univ. Badji Mokhtar de Annaba .p : 186.

-C-

Carryn, (2013) : Résistance aux antibiotiques Rôle du laboratoire de bactériologie .p : 5.

Carles, C ., (2011) : Nanotechnologies et Nanoparticules : Leurs effets sur la santé .p :1 ,7-8.

-F-

Feng, Q.L., Wu J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O., (2000):A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. J Biomed Mater Res. 2000; 52(4).p: 662-8 .

Foucaud, L., Wilson, M.R., Brown, D.M., Stone, V., (2007) :Measurement of reactive species production by nanoparticles prepared in biologically relevant media. *Toxicol Lett.* 174 (1-3).p:1–9.

-G-

Garza, K. M., Soto, K. F., and Murr, L. E., (2008) : Cytotoxicity and reactive oxygen species generation from aggregated carbon and carbonaceous nanoparticulate materials. *Int J Nanomedicine* 3(1) .p : 83–94.

Gail ,M.Teitzel and Matthew, R.Parsek, (2003): Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69.p:2313-2320.

-I-

Igor Pujaltè., (2011) : Étude *in vitro* de la toxicité de nanoparticules métalliques (TiO₂, ZnO, CdS) sur la cible rénale. Thèse Doctorat, Université Bordeaux Segalen. p : 58-96.

-K-

Karvani Z.E., Pegah C., (2011): Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on gram - positive and gram-negative bacteria. Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Iran.p: 1369 .

-L-

Long, T. C., Saleh, N., Tilton, R. D., Lowry, G. V., and Veronesi, B., (2006) :Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2) : implications for nanoparticle neurotoxicity. *Environ Sci Technol*,40(14) .p : 4346–4352 .

-M-

Mashino, T., Okuda, K., Hirota, T., Hirobe, M., Nagano, T., and Mochizuki, M., (1999) : Inhibition of e. coli growth by fullerene derivatives and inhibition mechanism. *Bioorg Med Chem Lett* 9(20) .p : 2959–2962.

Références bibliographiques

Masson, (1999). Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles : Argent. – 4e édition. Paris .p:144-145.

Meruvu, H .,Vangalapati , M ., Chaitanya , C.S ., Rao Bammidi , S .,(2011.):Synthesis and characterization of Zinc oxide nanoparticules and its antimicrobial activity against *Bacillus Subtilis* and *Escherichia Coli* .*Rasayan J.Chem.*p:217-222 .

Morones J.R., Elechiguerra J.L., Camacho A., Kouri J.B., Holt K., Yacaman M.J., Ramirez J.T., (2005):The Bactericidal Effect of Silver Nanoparticles. *Nanotechnology*; 16(10).p:2346-2353.

Mtimet, M.I ., (2011) : Élaboration de surfaces biocides contenant des nanoparticules d'argent. Docteur de l'INSA de Rouen .p : 12-14.

Mungkalasiri ,J.,(2009) : Élaboration par dli-mocvd de dépôts nano composites tio2-m (m = ag, Cu) et propriétés antibactériennes de ces surfaces solides. Doctorat de l'université de Toulouse .p :14.

-P-

Pérez Rama, M., Herrero, L.C et Torres, E., (2002): Class III Mellatothioneins in Reponse of Cadmium Toxicity in Microalga *Tetraselmis suecica* (kylin) Butch. *EnvironmentalToxicology et Chemistry, Marine*20(9).p : 2061-2066.

Prenom ,P., (2001) : Antibioresistance des souches bactériennes d'origine esquine : étude bibliographique et exemple de l'hôpital vétérinaire de st-hyacinthe .Université de Toulouse. p:73.

Prescott, Harley, Klein, Wiley, Sherwood, Woolverton .,(2010):Microbiologie 3^{eme} édition.p:840 .

-R-

Rahal, K., Benslimani, A ., Belouni, R .,Bouheraoua, M.,(2008):Standardisation de l'antibiogramme 5^{em} édition .p :12-13.

Références bibliographiques

Rossignol, G., (2007) : Contribution à l'étude de facteurs de virulence d'une souche hospitalière de *Pseudomonas fluorescens* : Activité hémolytique et variation phénotypique. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Rouen .p :4-7.

-S-

Singh, G.D., Joyce E. M., Beddow J. B., Mason T .J., 2012. Evaluation of antibacterial activity of ZnO nanoparticles coated sonochemically onto textile fabrics. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*.p:107-113.

Sondi, I. et 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 Sc*, 275(1).p: 177–182.

Saulou , C.,2009.Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma Thèse de doctoratde l'université de Toulouse. p 137 .

-T-

Thati ,V.,Roy , A.S., Ambika Prasad, M.V.N ., Shivannavar ,C. T., Gaddad ,S.M.,(2010): nanostructured zinc oxide enhances the activity of antibiotics against staphylococcus aureus .*Biosci Tech*.p:64 .

Tsao, N., Luh, T.Y., Chou, C.K., Chang, T.Y., Wu, J.J., Liu, C.C., and Lei, H.Y.,(2002) : In vitro action of carboxyfullerene. *J AntimicrobChemother*49(4).p :641–649.

-Z-

Zeyons, O., (2008) : Etudes des interactions physicochimiques et biologiques entre des nanoparticules manufacturées et des bactéries de l'environnement. Thèse de doctorat de l'université Paris VI - Pierre et Marie Curie. p: 23-24.

Références bibliographiques

Zhang ,L. , Jiang ,Y.,Ding Y.,Daskalakis, N .,Jeuken, L.,Povey,M .,O'neilLA.,York, D., (2010): Mechanistic Investigation into Antibacterial Behaviour of Suspensions of ZnO Nanoparticles Against E. Coli. Springer Netherlands. p: 2336-2337.

Biblionet:

[1]: <http://www.irsst.qc.ca/media/documents/pubirsst/r-455.pdf> (consulté le 03/03/2013)

[2]: <http://www.pseudomonas.com/images/paeruginosa.jpg>. (consulté le 23/04/2013)

[3]: <http://www.grandir.sidation.org /ressources / neusletter /grandirinf 06 /page .htm> (consulté le 06/04/2013)

[4]: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/immu2.htm> (consulté le 27/05/2013)

Annexes

Tableau 01 : Préparation de différentes concentrations des nanoparticules :

Solution mère de nanoparticules	Solution mère (ml)	Eau distillée (ml)	Concentration en tubes ($\mu\text{g/ml}$)
6000 $\mu\text{g/ml}$	8,53	1,47	512
512 $\mu\text{g/ml}$ Changer de pipette	2 1 0,5 0,5	2 3 3,5 7,5	256 128 64 32
32 $\mu\text{g/ml}$ Changer de pipette	2 1	2 3	16 8
0	0	2	0



(a)



(b)

Figure 01: CMI de *S. aureus* (a) et *P. aeruginosa* (b) vis-à-vis de ZnO.

(a)



(b)

Figure 02 : CMI de *S. aureus* (a) et *P. aeruginosa* (b) vis-à-vis d'AgNO₃.



(a)

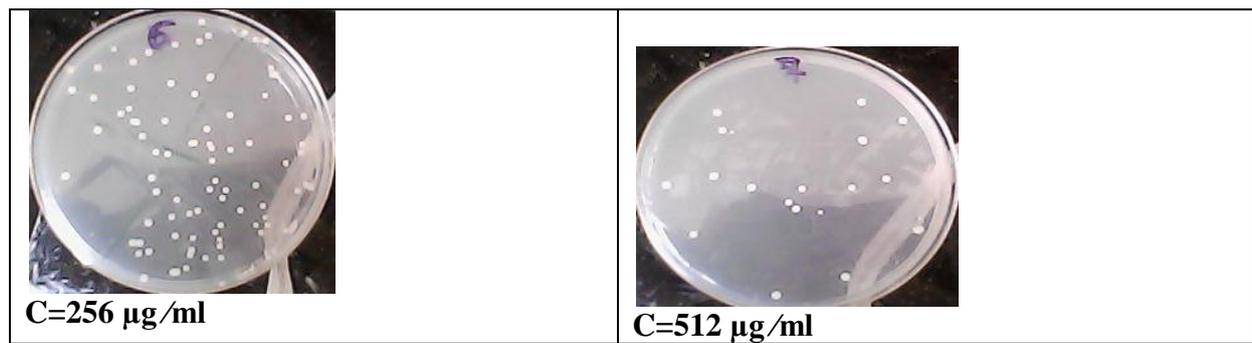
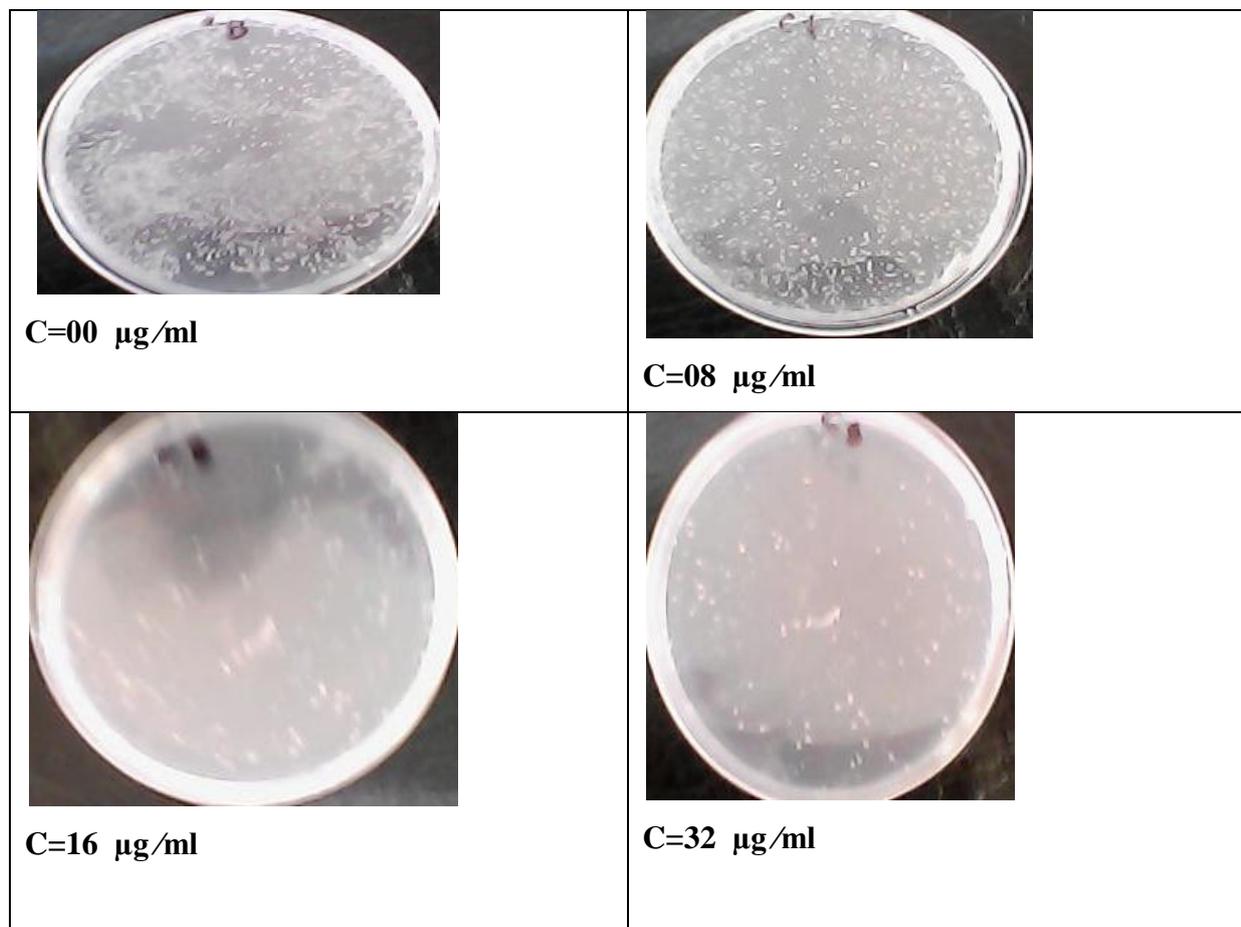
(b)

Figure 03: CMI de *S. aureus* (a) et *P. aeruginosa* (b) vis-à-vis de CuO.

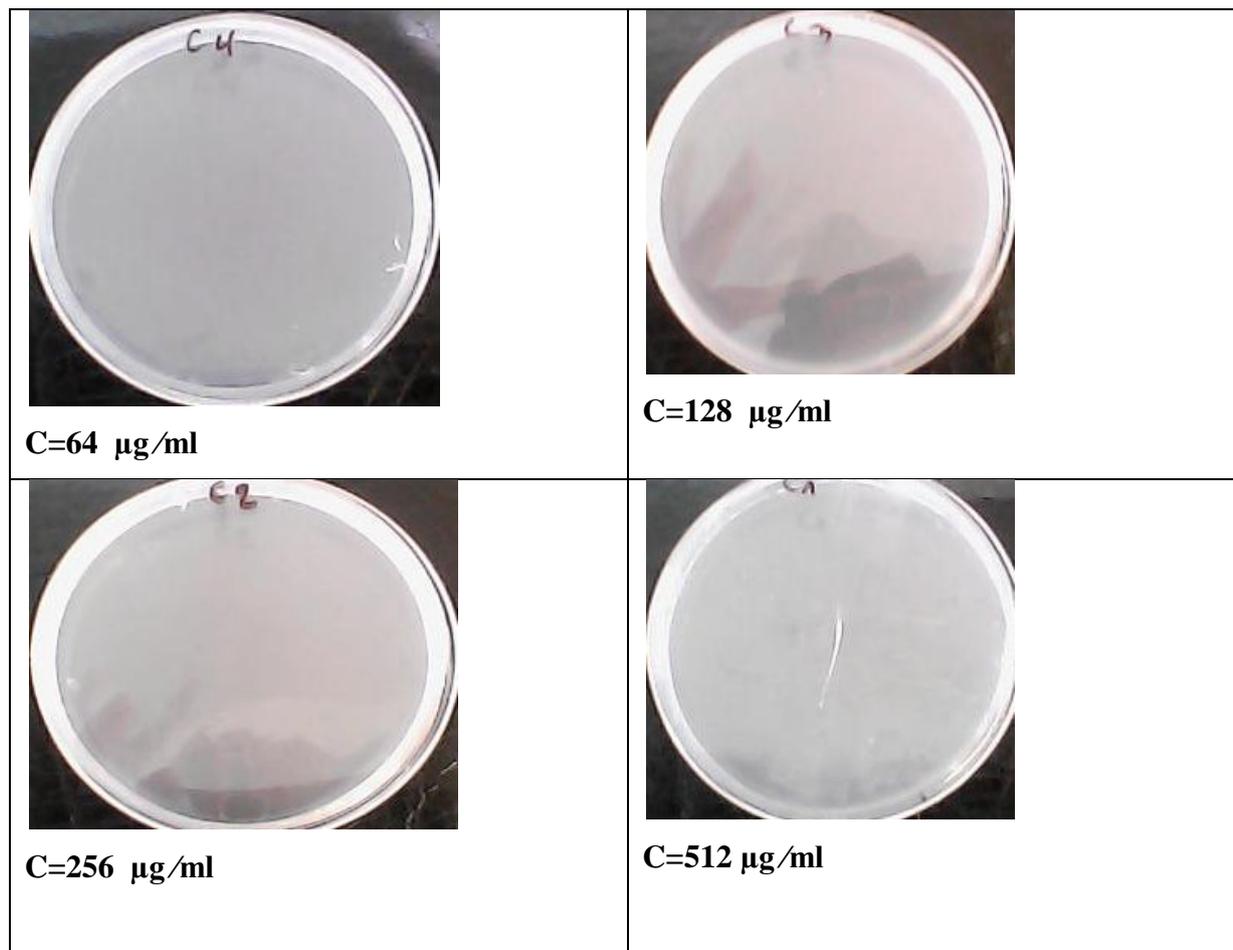
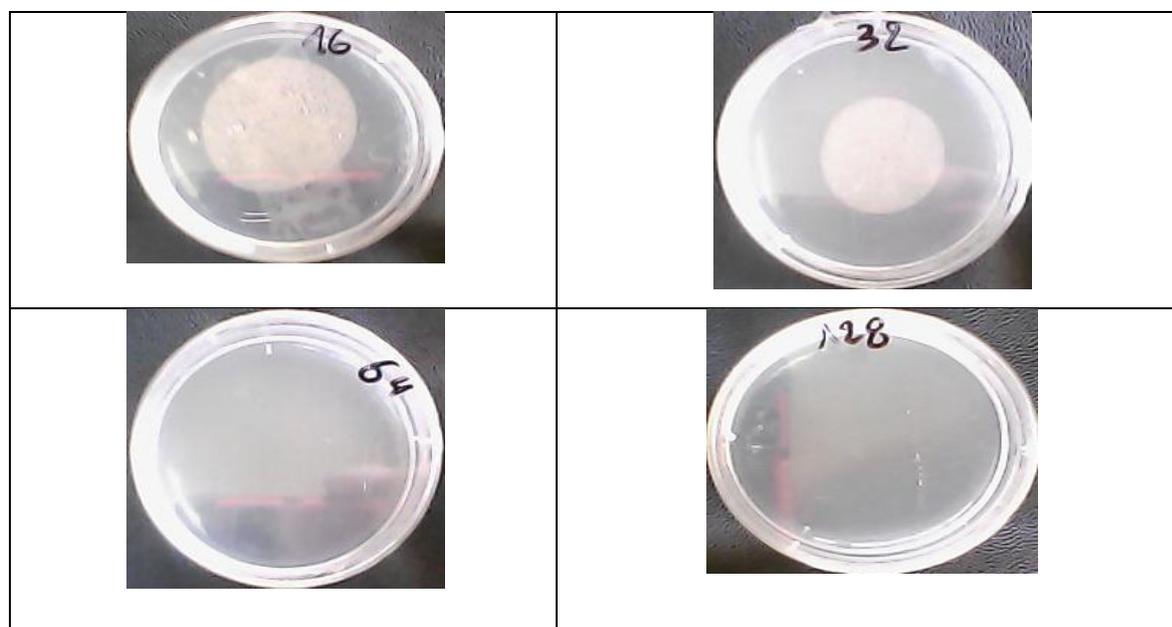
Tableau 02: Dénombrement de *S. aureus* (UFC) après 24 h

 C=00 µg/ml	 C=08 µg/ml
 C=16µg/ml	 C=32 µg/ml
 C=64 µg/ml	 C=128 µg/ml

La suite de tableau 02

Tableau 03: Dénombrement de *P.aeruginosa* (UFC) après 24 h

La suite de tableau 03

Tableau 04: détermination de CMB de *S. aureus* vis-à-vis l'AgNO₃.

La suite de tableau 03



Tableau 05 : détermination de CMB de *P.aeruginosa* vis-à-vis l'AgNO₃.

