

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

Université A.MIRA – Bejaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE

Spécialité : Biotechnologie Microbienne

N° :.....

Soutenu le : 14/07/2022

Mémoire de fin de Cycle

En vue de l'obtention du diplôme

ACTIVITÉS ANTIMICROBIENNES DE NANOPARTICULES MÉTALLIQUES PRODUITES PAR DES SOUCHES D'ACTINOBACTÉRIES

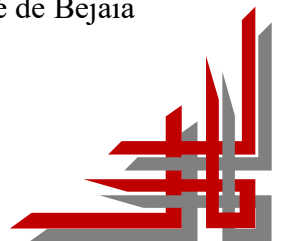
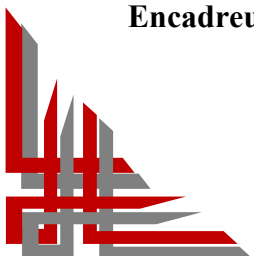
PRESENTE PAR :HAMIMID BAYA

SELLAM AISSA

Devant le jury composé de :

	Nom et Prénom	Grade	Etablissement
Président	Mr. KECHA Mouloud	Professeur	Université de Bejaia
Examinatrice	Mme. BOUCHERBA Nawel	Professeur	Université de Bejaia
Encadreure	Mme. DJINNI Ibtissem	MCA	Université de Bejaia

Année universitaire 2021/2022



Remerciements

Tout au long de ce cycle universitaire après de gros efforts et de Persévérance de la part de tous ceux qui nous ont accompagné, aidé, encouragé et encadré, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et remerciements à :

Nous remercions, tout d'abord, Dieu de nous avoir accordé la santé et le courage pour mener à terme ce travail

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu voir le jour sans l'aide et l'encadrement de M^{me} DJINJI, on la remercie pour la qualité de son encadrement exceptionnel, pour sa patience, sa rigueur, les encouragements et les conseils qu'elle nous a prodigué

Nos remerciements s'adressent aux membres du jury : M^r KECHA et M^{me} BOUCHERBA d'avoir bien voulu prendre le temps d'évaluer et de juger ce travail

Nous tenons aussi à remercier M^{me} YANAS, M^{me} SOUFI et M^{me} BRADAI pour leur participation à la réalisation de ce travail

Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire de génie biologique, mycologie laboratoire de recherche de microbiologie appliquée (LMA) ainsi le laboratoire de génie des procédés pour nous avoir permis d'effectuer les différents tests afin de réaliser ce travail.

Dédicaces

J'adresse mes sincères remerciements à :

❖ Mes parents

❖ Mes frères Abdel Ghani et Walid

❖ Mon amie Khaled

Je tiens à remercier Mme Moualek qui m'a aidé afin de réaliser ce mémoire.

A tous ceux qui m'ont aidé, soutenu et encouragé tout au long de la réalisation de ce mémoire.

AISSA

Dédicaces

*** Je dédie ce travail à tous ceux qui ont cru en moi et qui m'ont donné la force de continuer.*

*** À ma chère mère, qui a toujours été présente et qui a su se dévouer pour l'accomplissement de mes souhaits, et dont je suis fière, autant qu'elle peut l'être de moi. Que ce travail soit en guise de reconnaissance et de gratitude, qu'elle reçoit tout mon amour.*

*** À mon cher père, qui s'est changé la nuit en jour pour m'assurer les bonnes conditions.*

*** À ma chère sœur Laeticia qui m'a aidé à surmonter les difficultés que j'ai rencontrées au cours de ce travail.*

*** À mon adorable sœur Melissa pour ses encouragements et son soutien indéfectible.*

*** Je ne saurais terminer sans citer mes amis : Imad, Lynda, Sarah, Yasmine, Yanis, Khaoula, Feriel, Nadjette, Djalil, Messipsa.*

*** Enfin je le dédie à tous mes amis que je n'ai pas cités à tous ceux qui me connaissent.*

*** Vous avez tous contribué à m'aider et à m'encourager, vous avez toujours fait et ferez toujours partie de ma vie*



** BAYÀ*

Liste d'abréviation

NPMs : Nanoparticules particules métalliques

NPd'Au : Nanoparticule d'or

NP de Cu : Nanoparticule de cuivre

NP d'Ag : Nanoparticule d'argent

NP de Zn : Nanoparticule de zinc

SARM : *Staphylococcus aureus* résistante a la méthicilline

ROS : (Reactive oxygen species) espèce réactive oxygéné

DPPH : 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle

DMSO : Diméthyle sulfoxyde

TCA: Trichloro-acétique

AgM : Nanoparticules d'argent issu à partir du mycélium

AgS : Nanoparticules d'argent issu à partir du surnageant

CuM : Nanoparticules de cuivre issu à partir du mycélium

CuS : Nanoparticules de cuivre issu à partir du surnageant

Zn M Nanoparticules de Zinc issu à partir du mycélium

ZnS Nanoparticules de Zinc cuivre issu à partir du surnageant

Kn : Kilo newton

FTIR : fourier transform infra-red spectrometry

MHB : Mueller Hinton broth

MH : Mueller Hinton agar

MEB : Microscopie électronique à balayage.

Nm : Nanomètre.

mM : Milli Mole

Liste des figures

Figure/ Schémas	Titre	Page
Figure 1	La taille des nanoparticules comparée à celles des principales structures biologiques	4
Schéma 1	Classification des différentes NPs	4
Schéma 2	Différentes méthodes de synthèse des nanoparticules	5
Figure 2	Biosources utilisé dans biosynthèse des NPs	7
Figure 3	Mécanismes de biosynthèses des NPs	8
Figure 4	Mécanismes d'action supposés des NPs contre les germes cibles	12
Figure 5	Divers domaines d'application des NPMs	13
Figure 6	Les habitats extrêmes inexplorés comme sources d'actinobactéries rares de la croute terrestre	14
Figure 7	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> sp	15
Figure 8	Potentiel application des actinobactéries en industrie et agriculture	16
Figure 9	Illustration des aspects morphologiques des souches isole BA51 et BA4	18
Schéma 3	Protocoles de la synthèse extracellulaire des nanoparticules métalliques	21
Schéma 4	Protocoles de la synthèse intracellulaire des nanoparticules métalliques	22
Schéma 5	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des solutions de NPMs par la méthode des puits	24
Schéma 6	Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des solutions de nanoparticules synthétisées par la méthode des microplaques	25
Figure 10	Mise en évidence de l'activité antagoniste de BA4 et BA51 à l'encontre des bactéries et des moisissures pathogènes par la méthode des cylindres	28

Figure 11	Solutions réactionnelles après incubation dans la synthèse intracellulaire	29
Figure 12	Évolution des solutions réactionnelles après incubation dans la synthèse extracellulaire	30
Figure 13	Représentation du pourcentage de production de NPMs via les souches BA51 et BA4	31
Figure 14	Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir de la biomasse de la souche BA4.	33
Figure 15	Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir de la biomasse de la souche BA51	34
Figure 16	Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir du surnageant de la souche BA51.	34
Figure 17	Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs de Cu obtenu à partir du surnageant de la souche BA51.	35
Figure 18	Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits intra-extracellulaire de la souche BA51 contre 11 germes	36
Figure 19	Boites représentatives des zones d'inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA51 contre les bactéries pathogènes	37
Figure 20	Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits intra-extracellulaire de la souche BA4 contre 11 germes	37
Figure 21	Boites représentatives des zones d'inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA4 contre les bactéries pathogènes	38
Figure 22	Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits intra-extracellulaire de la souche BA4 et BA51 à l'encontre des moisissures	39
Figure 23	Boites représentatives des zones d'inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA51 et BA4 contre les moisissures	40
Figure 24	Virage de couleur observé après la réduction du DPPH	41
Figure 25	Mise en évidence du pourcentage de piégeage du DPPH	42

Liste des figures

Figure 26	Mise en évidence d'inhibition de la formation Fe ²⁺ -ferrozine	43
Figure 27	Mise en évidence du résultat du pouvoir réducteur via les extraits	43
Figure 28	Mise en évidence du résultat des composé phénoliques	44
Figure I	Photographie d'un spectrophotomètre UV/VIS (Shamadzu)	Annexe III
Figure II	Etapas d'une analyse FTIR	Annexe III
Figure III	Résultats des différents tests réalisés pour mettre en évidence les activités antioxydantes des solutions de nanoparticules	Annexe III
Figure IV	Résultats des différents zones d'inhibition pour mettre en évidence le test antagonisme cylindre d'agar	Annexe III

Listes des tableaux

Numéro du tableau	Titre	Page
Tableau I	Espèces végétales utilisées dans la biosynthèse des nanoparticules et leur application	Annexe I
Tableau II	Diverses espèces d'algues productrices de nanoparticules	Annexe I
Tableau III	Diverses espèces de levure productrices de nanoparticules	Annexe I
Tableau IV	Diverses espèces de moisissures productrices de nanoparticules	Annexe I
Tableau V	Diverses espèces de bactéries productrices de nanoparticules	Annexe I
Tableau VI	Diverses molécules bios-synthétisées par les actinobactéries	Annexe I
Tableau VII	Actinobactéries utilisées dans la biosynthèse des nanoparticules	Annexe I
Tableau VIII	Poids des NPMs synthétise par deux souches d'actinobactéries	30
Tableau IX	Les différentes longueurs d'onde enregistrer des extraite de NPMs produite	32
Tableau X	Concentration minimale d'inhibition en $\mu\text{G/ml}$	40
Tableau X I	Table d'Absorptions IR pour les groupes fonctionnels représentatifs	Annexe III



SOMMAIRE

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	1
I . Nanoparticules métalliques (NPMs)	
1. Historique	3
2. Définition	3
3. Voie de biosynthèse des nanoparticules métallique	5
3.1. Différentes voies de synthèse	5
3.2. Modulation des nanoparticules	7
4. Facteurs influençant la biosynthèse des nanoparticules	8
5. Avantages et inconvénients des nanoparticules	9
6. Mécanisme d'action des nanoparticules sur les cellules cibles	9
7. Différentes utilisations des nanoparticules métalliques	12
II . Actinobactéries	
1. Généralités	13
2. Habitats	13
3. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> sp	14
4. Importance des actinobactér	15
Matériel	
1. Matériel analytique	17
2. Matériel biologique	17
2.1. Souches d'actinobactéries	17
2.2. Germes cibles	17
II . Méthodes	
1. Repiquage des souches BA51 et BA4	17
2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches	18

2.1. Standardisation de l'inoculum des germes	18
2.2. Test des cylindres d'agar.....	18
3. Culture des souches BA51 et BA4 et obtention des surnageants et biomasse.....	19
3.1. Préparation des précultures et culture.....	19
3.2. Obtention des surnageants de culture et des biomasses	19
4. Biosynthèse des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc.....	19
4.1. Biosynthèse à partir des surnageants de culture.....	19
4.2. Biosynthèse à partir de la biomasse	22
5. Caractérisation des nanoparticules synthétisées.....	23
5.1 Virages de couleur.....	23
5.2. Spectroscopie UV/Visible.....	23
5.3. Spectroscopie FTIR.....	23
6. Mise en évidence des activités biologiques des nanoparticules métalliques synthétisées de l'activité antimicrobienne.....	23
6.1.1. Préparation des solutions de nanoparticules métallique.....	24
6.1.2. Test des puits.....	24
7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)	25
8. Evaluation des propriétés antioxydantes des nanoparticules métalliques synthétisées.....	26
8.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH.....	26
8.2. Evaluation du pouvoir chélateur du fer.....	26
8.3. Evaluation du Pouvoir réducteur	27
8.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	27
1. Mise en évidence des résultats du test d'antagonisme par des souches d'actinobactéries par la technique cylindre d'agar	28
2. Biosynthèse des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc.....	29
2.1. Biosynthèse à partir des surnageants de culture.....	29
2.2. Biosynthèse à partir de la biomasse	30
3. Poids sec des NPMs produites par les souches d'actinobactéries.....	31
4. Caractérisation des nanoparticules synthétisées.....	31

4.1. Virage de couleur.....	31
4.2. Spectroscopie UV/Visible.....	31
4.3. Spectroscopie FTIR.....	32
5. Mise en évidence des activités biologiques des nanoparticules métalliques synthétisées.....	36
5.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	36
5.2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	30
6. Evaluation des propriétés anti oxydantes des nanoparticules métalliques synthétisées	
6.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH.....	41
6.2. Evaluation du pouvoir chélateur du fer.....	42
6.3. Evaluation de l'activité du Pouvoir réducteur	43
6.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques.....	44
Conclusion.....	45
Références bibliographiques.....	47
Annexes	
Résumé	



Introduction

Depuis la découverte de la pénicilline G par le biologiste écossais Alexander Fleming en 1928 et son application dès 1941 en deuxième guerre mondiale, les antibiotiques sont utilisés pour combattre les infections (**Bohuon et Monneret., 2021**). Toutefois, leur utilisation intensive dans le traitement des infections microbiennes et le phénomène d'automédication ainsi que leurs emplois en prophylaxie dans l'élevage, ont favorisé l'adaptation des bactéries à ces molécules et le développement d'une résistance (**OMS., 2020**)

La résistance aux antibiotiques est définie comme l'inefficacité des antibiotiques contre le germe cible, ce phénomène est naturel et prévisible car il est dû au fait que les germes peuvent faire des mutations et ces mutations peuvent être transmises d'une souche à une autre ce qui mène à une émergence de ce phénomène et menace la santé publique. D'après l'organisation mondiale de la santé (OMS), des milliers de décès sont enregistrés chaque année suite à ce phénomène (**OMS., 2020**). Ainsi, la recherche et le développement de nouveaux agents thérapeutiques basés sur des produits naturels bioactifs sont actuellement nécessaires en raison de la nécessité d'une action urgente contre la propagation d'agents pathogènes microbiens multirésistants. Ces dernières décennies ont vu l'apparition de nanoparticules qui intéressent fortement la communauté scientifique, possédant des applications divers, à cause de propriétés nouvellement découvertes ou mieux appréhendées, aussi bien en industrie cosmétique, emballages, automobile, textiles, dans le diagnostic médical, l'imagerie, et l'assainissement de l'environnement (**Gross et al., 2016**), en raison de leur multifonctionnalité telle que les propriétés antioxydantes, antimicrobiennes et anticancéreuses (**Bala et al., 2015**).

La synthèse des nanoparticules par les approches classiques (chimique et physique) est remplacé par une voie de synthèse verte qui reposent sur l'utilisation des microorganismes tels que les champignons et bactéries et l'utilisation d'extraits de plantes ou enzymes (**Lu et Ozcan., 2015 ; MacKellar et al., 2020 ; Mongat et al., 2020 ; Silva et al., 2020 ; Ganesh et al., 2021 ; Ajayi et al., 2021**).

Ce travail vise à élaborer des nanoparticules d'oxydes métalliques à partir de surnageant de culture et de biomasse d'actinobactéries afin d'évaluer leurs activités antibactériennes et anti oxydantes. Pour cela, cette étude est organisée en trois chapitres :

-Le premier chapitre est consacré à la synthèse bibliographique, abordant en premier lieu les nanoparticules, leur synthèse, leur utilisation et intérêt suivi d'une rétrospective sur les actinobactéries, notamment leur écologie, leur taxonomie et importance.

-Le second chapitre est consacré à l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de cette problématique regroupant le matériel et les différents procédés méthodologiques mis en œuvre pour la biosynthèse des nanoparticules par deux souches d'actinobactéries, la caractérisation par UV/Vis des nanoparticules issues des surnageants de culture et de la biomasse ainsi que l'étude de leurs potentiel antagoniste et antioxydant.

-Le dernier chapitre rend compte des résultats obtenus après expérimentation et leurs discussions suivies d'une conclusion et quelques perspectives



CHAPITRE 1

SYNTHESE

BIBLIOGRAPHIQUE

Partie 1 : Les nanoparticules (NPs)

• Historique

Bien que les nanoparticules soient considérées comme une invention de la science moderne, l'histoire de leur utilisation remonte à bien plus loin. En effet, l'homme a commencé à utiliser les nanoparticules dans le renforcement des matrices céramiques en incluant les nanofibres d'amiantes naturels il y a plus de 4500 ans, alors que des nanoparticules de plomb de 5 nm de diamètre ont été utilisées par les égyptiens de l'Égypte antique comme teinture pour cheveux, depuis plus de 4000 ans. Par ailleurs, la coupe de Lycurgue représente l'un des plus grands exemples de l'utilisation de nanoparticules dans le monde antique. C'est une coupe en verre romaine datant du IV^{ème} siècle, constituée d'un verre dichroïque qui reflète différentes couleurs en fonction de la source de lumière. Elle apparaît vert jade lorsqu'elle est éclairée de face, mais rouge vue de derrière ou de l'intérieur. Il aura fallu attendre l'arrivée des sciences modernes pour parvenir à décrypter ce changement de couleur. De récentes études ont montré que la coupe de Lycurgue contient un alliage de nanoparticules d'argent (NPMs d'Ag) et d'or (NPs d'Au) et environ 10% de cuivre (NPMs de Cu).

En 1857 Michael Faraday a fabriqué une solution colloïdale de NPs d'Au, qui est la première description scientifique à avoir rapporté la préparation de NPMs et a lancé l'histoire des NPMs dans le domaine scientifique. Il a également révélé que les caractéristiques optiques des colloïdes d'or sont différentes de celles de leurs homologues en vrac respectif.

En 1940, la fabrication de NPMs d'oxyde de silice (SiO₂) a remplacé le noir du carbone pour le renforcement en caoutchouc (**Jeevanandam et al., 2018**).

En 1990, de minuscules vésicules artificielles, les liposomes, sont utilisées en cosmétique pour encapsuler des principes actifs. Ensuite, cette technique est appliquée en médecine pour l'encapsulation. Les principes actifs de médicaments (**Anonyme 1**).

De nos jours, les NPMs peuvent améliorer de manière significative les caractéristiques des matériaux en vrac, comme la force, la conductivité, la durabilité et la légèreté (**Jeevanandam et al., 2018**).

2. Définition

Selon la Commission Européenne (2013), le nano matériel est défini comme un matériel naturel accessoire ou manufacturé contenant des particules ayant au moins une

dimension entre 1-100 nm à l'état non lié ou comme agrégat (**Figure 1**) (**Djearamane et al., 2016**). Les nanoparticules métalliques sont généralement de taille inférieure à 100 nm et contiennent environ 20 à 15 000 atomes (**Chen et Schluesener., 2008 ; Rai et al., 2009**).

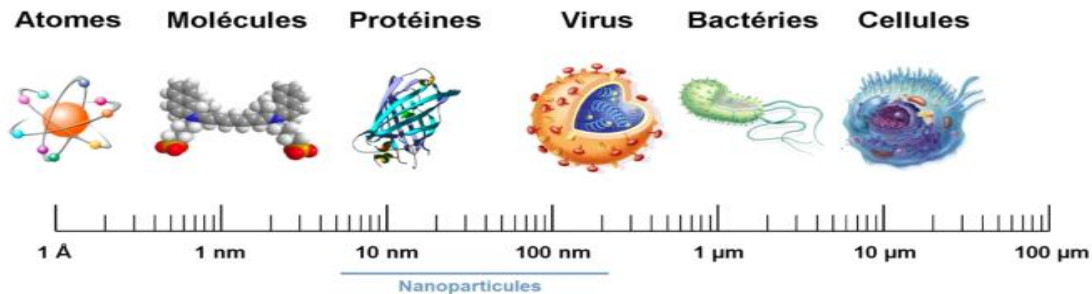


Figure 1 : La taille des nanoparticules comparée à celles des principales structures biologiques (**Belfennache., 2010**).

2.1. Classification des nanoparticules

La classification des nanoparticules peut se faire selon divers critères, la source (naturelle/anthropique), la nature dont elles sont issues (organiques, inorganiques). La structure (triangle, sphère, plan, cube, nanotube), la composition (Zn, ZnO, Fe₂O₃...) et l'état de dispersion (**Schéma 1**)

Les NPMs naturelles existent dans la nature depuis des milliers d'années et elles sont issues des processus naturels et se retrouvent dans divers environnements sol, eau, atmosphère, par contre les NPMs anthropiques, sont divisées en deux sous-familles qui sont les NPMs accidentelles (NPA) et les NP manufacturées (NPM) (**Pan et Xing., 201**

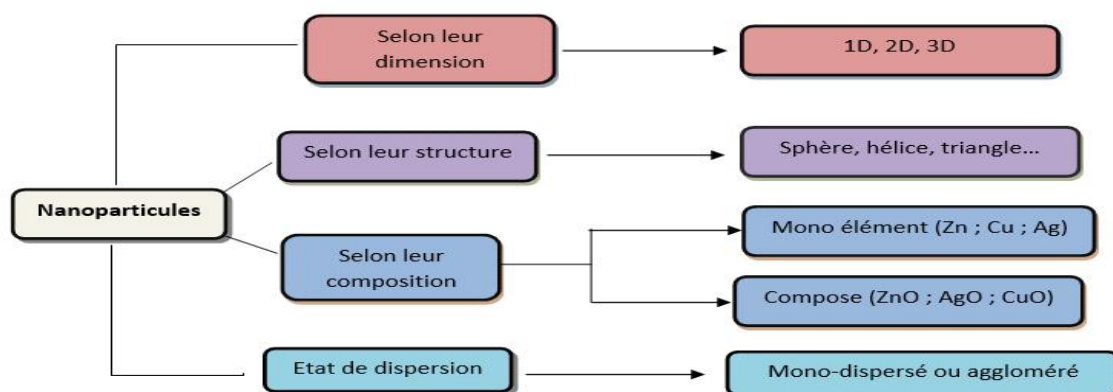


Schéma 1 : Classification des différentes NPMs (**Buzea et al., 2007**).

- **Voie de biosynthèse des nanoparticules métalliques**

La synthèse des NPMs est réalisable selon le principe ascendant ou descendant (**Schéma 2**) (**Fendler., 1998**). Il existe diverses techniques et procédés afin de synthétiser les NPMs (**Krishnan et al., 2017**).

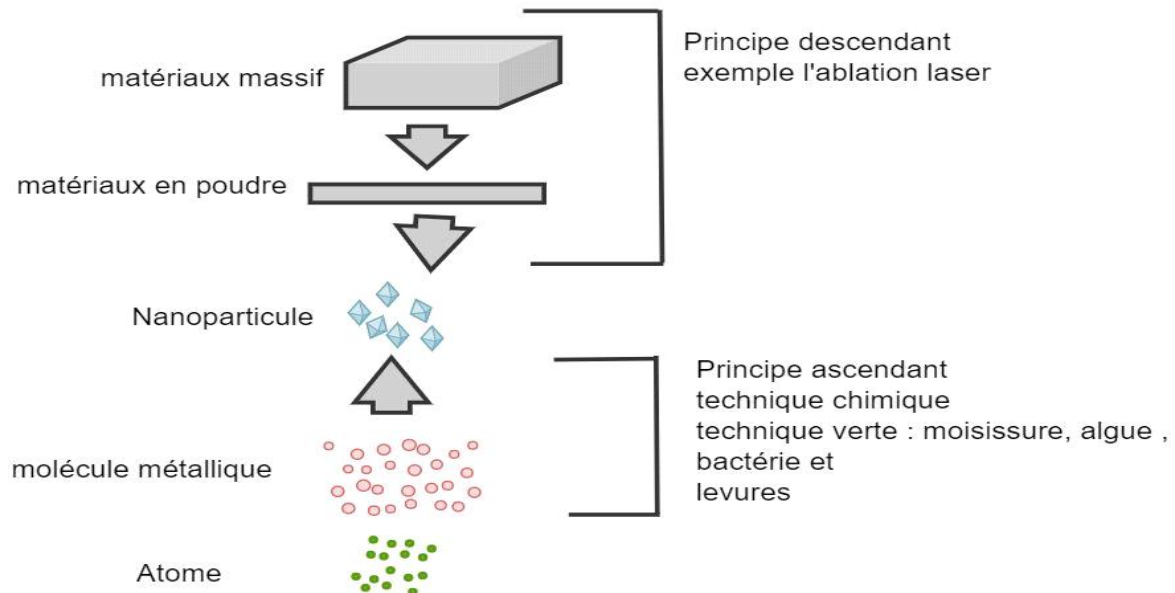


Schéma 2 : Différentes méthodes de synthèse des nanoparticules (**muhammad et al., 2016**).

3.1. Les différentes voies de synthèse

3.1.1. Technique chimique.

La production des NPMs par les méthodes chimiques se réalise à l'aide d'agents réducteurs qui ont le pouvoir de réduire les sels métalliques en nanoparticules métalliques (NPMs). Les agents réducteurs peuvent être de nature organique comme l'acide ascorbique ou inorganiques tels que le borohydrure de sodium (NaBH_4) et le borohydrure de potassium (KBH_4) (**Khan et al., 2015** ; **Fahmy et al., 2020**). Le miel et les polymères hydrosoluble comme le polyvinylpyrrolidone, le polyéthylène glycol et le chitosane ont le pouvoir de réduire les sels métalliques en NPM (**Usman et al., 2012**).

3.1.2. Technique physique.

La production des nanoparticules est réalisable par divers procédés, le procédé le plus utilisé est l'ablation laser car cette technique est facile et écologique (**Zijie Yan et al., 2012**).

3.1.3. Technique biologique.

La synthèse verte des nanoparticules s'effectue par l'utilisation des sources renouvelables, telles que les plantes, les bactéries, les levures et moisissures et les algues (**Figure 2**).

- **Par le biais de la végétation** : la biosynthèse des nanoparticules par les plantes (feuilles, tiges, racines, fruits...). Ces derniers fournissent des molécules bioactives (agent réducteur) par exemple les polyphénols, vitamines...) (**Soltys et al., 2021**) **Annexe I tableaux I**.
- **Par le biais d'algues** : Les algues sont utilisées comme « bio-usines » pour la biosynthèse des nanoparticules métalliques car elles présentent des capacités de bioréduction, et des avantages en raison de leur grande capacité d'absorption des métaux et de leur faible coût (**Davis et al., 2003**) **Annexe I tableaux II**.
- **Par le biais de bactéries** : la biosynthèse des nanoparticules métalliques par des bactéries est la meilleure technique utilisée, car ces dernières ont un taux de générations petit et peuvent être manipuler génétiquement afin d'améliorer leur rendement (**Liu et al., 2011 ; Vaseghi et al., 2018**). Ainsi, les microorganismes peuvent supporter des conditions variables telles que le pH, la température et la pression (**Vetchinkina et al., 2019**) **Annexe I tableaux III**.
- **Par le biais de levures et moisissures** : la biosynthèse des nanoparticules métalliques en utilisant des moisissures présente certaine avantage telle que le maillage mycélien fongique peut résister à l'agitation, à la pression d'écoulement et à certains d'autres conditions dans des bioréacteurs, ainsi une capacité de bioaccumulation de métaux exceptionnelle avec une capacité de liaison élevée, (**Yadav et al., 2015**). L'extrait de levure possède aussi des molécules organiques (vitamines, acides aminés, glucides) qui ont le pouvoir de réduire les sels métalliques, et jouent le rôle d'agents de coiffage et stabilisent les nanoparticules métalliques (**Jadoun et al., 2021**) **Annexe I tableaux IV**.

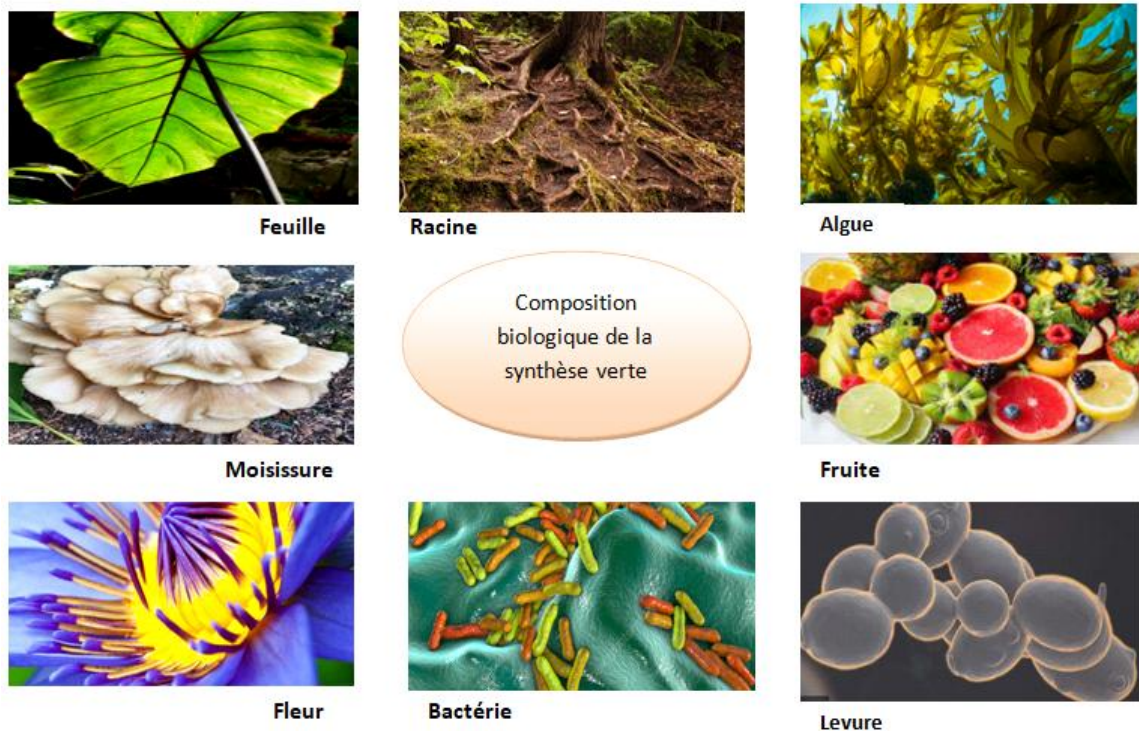


Figure 2 : Biosources utilisées dans la biosynthèse des NPMs (Soltys et al., 2021).

3.2. Modulation des nanoparticules

La biosynthèse des NPMs se résume à trois étapes principales :

Premièrement le piégeage d'ions métalliques, la seconde étape est la réduction des sels métalliques, et finalement la condensation des atomes en nanostructure.

Les éléments cellulaires et extracellulaires qui interviennent dans la biosynthèse sont :

Pour les plantes par exemple l'extrait de feuilles de *Pterolobium hexapetalum* contient des composés phytochimiques tels que les stéroïdes, les terpénoïdes, les polyphénols et les flavonoïdes qui agissent comme agents stabilisants et coiffants. Le précurseur métallique ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) réagit avec l'anion hydroxyle (OH^-) qui est généré par l'eau et forme du cuivre hydroxyde ($\text{Cu}(\text{OH})_2$). Après calcination, l'hydroxyde de cuivre est décomposé en nanoparticules de CuO qui est indiqué par le changement de couleur de la couleur bleue à noire (Elavarasan et al., 2019). Par contre chez les mycètes la nitrate-réductase est responsable de la réduction des sels métalliques (AgNO_3) en NPMs d'Ag (Ovais et al., 2018 ; Meenakshi, 2020). Chez les bactéries la réductase dépendante du NADH et du NADH chez *Pseudomonas aeruginosa* sont impliqués dans la bio-réduction de SeO_3^{2-} en NPs de Se^0 (Dwivedi et al., 2013) (Figure 3).

Pour les actinobactéries, dans la biosynthèse intracellulaire (via le mycélium) d'une souche alcalotolérante *Rhodococcus* sp. Synthétisé des nanoparticules métalliques d'ordre 12 nm à partir d'ions AuCl_4^- , (Absar et al.,2003). Une synthèse des NPMs d'au extracellulaire par une souche d'actinobactérie alcalothermophile (pH = 9 et température 50 °C) à partir d'ion AuCl_4^- (Absar et al., 2003).

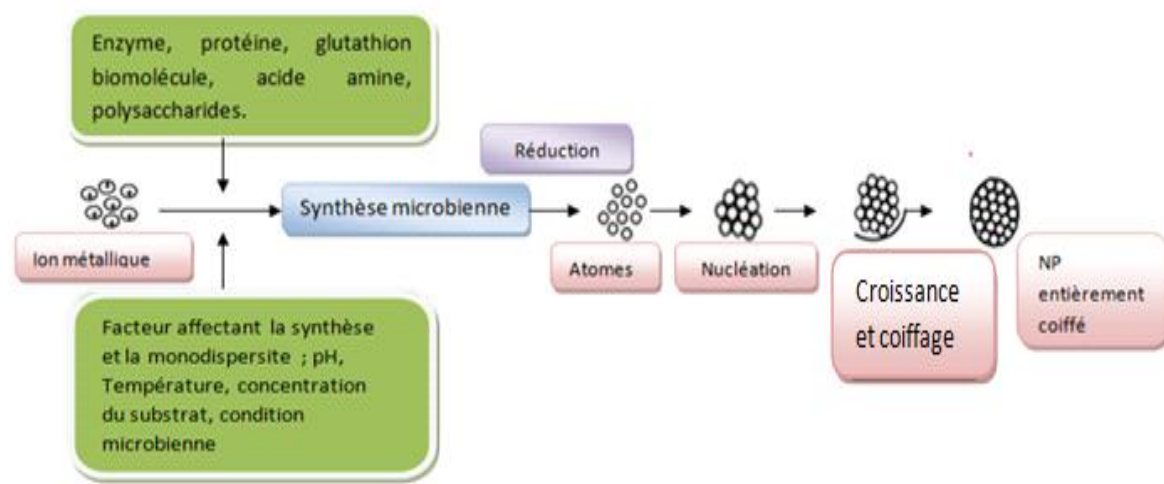


Figure 3 : Mécanismes de biosynthèses des NPMs (Shubhrima et al., 2021).

4. facteurs influençant la biosynthèse des nanoparticules

La biosynthèse des nanoparticules métalliques liée aux facteurs physicochimiques qui influent sur les différentes caractéristiques. Les facteurs influents sont :

PH : L'influence du pH sur la biosynthèse des nanoparticules métalliques réside dans la taille et la forme des NPMs, car la valeur du pH modifie la charge des nanoparticules métalliques ce qui influe sur leur stabilité (Verma et Mehata., 2016). D'autre part, le pH alcalin favorise la biosynthèse des nanoparticules métalliques hautement dispersées et de très petites tailles, alors que le pH très acide ($\text{pH} < 5$) inhibe la biosynthèse des nanoparticules métalliques (Chung et al., 2016).

Concentration : L'influence de la concentration des réactifs sur la production des nanoparticules métalliques, d'une part les agents réducteurs tels que les protéines et enzymes et d'autre part les sels métalliques présents dans le milieu réactionnel (Akintelu et al., 2020).

Température : L'influence de la température sur l'activité des enzymes et protéines qui réduisent les sels métalliques en nanoparticules métalliques, car les agents réducteurs ont des exigences par rapport à leur activité. En effet, les températures élevées inhibent la biosynthèse

des nanoparticules métalliques par le fait d'inactivation des agents réducteurs (**Akintelu et al., 2020**).

Temps : Le temps de la réaction influe sur le rendement de biosynthèse des nanoparticules métalliques car l'augmentation du temps de réaction se traduira par une augmentation du rendement (**Akintelu et al., 2020**).

5. Avantages et inconvénients des nanoparticules

Les avantages de la biosynthèse des NPMs via l'usage des sources renouvelables telles que les plantes, les algues, les levures et moisissure ainsi que les bactéries, une alternative non toxique pour l'environnement et facile de la mettre en œuvre par rapport aux méthodes classiques (chimique et physique) (**Aftab et al., 2021**) et la biosynthèse via les microorganismes nécessite des conditions douces en matière de pH, de pression et de température. De plus, les nanoparticules métalliques de biosynthétise présentent des tailles plus petites par rapport à celle produites chimiquement qui s'avèrent plus toxiques contre les germes pathogènes (**Praseetha et al., 2013**). Toutefois, les inconvénients de la biosynthèse est le mécanisme de biosynthèse qui n'est pas bien élucidé afin de contrôler la taille et augmenter la productivité car cette dernière est d'un tier en termes de rendement par rapport aux techniques de synthèses classiques (**Ovais et al., 2018**).

Par ailleurs, les inconvénients de la synthèse classique sont multiples tels que le cout relativement élevé et l'utilisation de solvants toxiques et polluants ainsi que des conditions de synthèse a une température et pression importantes. Ces inconvénients sont des facteurs limitant l'utilisation des procédés classiques (**Akintelu et al., 2020**).

6. Mécanisme d'action des nanoparticules sur les cellules cibles.

Le mode d'action des NPMs sur les microorganismes n'est pas réduits uniquement à une seule caractéristique telle que leur petite taille, mais à d'autres facteurs qui sont :la nature de la nano molécule, la taille, la structure, l'élément de coiffage, la concentration et le potentiel Zeta. Toutefois, le mécanisme d'action des nanoparticules métalliques sur la cellule bactérienne est mal connu. Pour les NPMs d'argent il y a 3 mécanismes possibles (**Figure 4**).

Mécanisme 1 : Les nanoparticules métalliques se lient à la membrane cellulaire et perturbent ses fonctions énergétiques, telles que la perméabilité et la respiration, provoquent une déplétion de l'ATP intracellulaire par rupture de membrane plasmique ou en bloquant la

respiration en association avec des groupes oxygène et sulfhydryle sur la paroi cellulaire pour former des liaisons R-S-S-R conduisant à la mort cellulaire. La membrane cellulaire peut être endommagée et les composants de la cellule sont libérés (**Sivalingham et al., 2012 ; Chauhun et al., 2013 ; Manivasagan et al., 2013**).

Mécanisme 2 : Les NPMs d'argent pénètrent dans la cellule et interagissent avec des composés contenant du soufre et du phosphore, tels que les protéines et l'ADN, et causent des dommages intracellulaires (**Chauhun et al., 2013 ; Manivasagan et al., 2013**).

Mécanisme 3 : Les NPMs d'argent libèrent des ions d'argent, l'ADN perd sa capacité de réplication, les protéines deviennent inactivées après interactions (**Chauhun et al., 2013 ; Manivasagan et al., 2013**).

L'influence de chaque facteur sur le mécanisme biocide contre les germes cibles est comme suit :

Nature de la molécule : Les NPMs d'oxyde de calcium et d'oxyde de magnésium génèrent de l' O_2^- , alors que les NPMs d'oxyde de zinc peuvent générer du $H_2O_2^-$ et OH^- , mais pas O_2^- .

Les NPMs d'oxyde de cuivre peuvent produire, en revanche, les quatre types d'espèces réactives oxygénées.

Les espèces O_2^- et $H_2O_2^-$ provoquent des réactions de stress moins aiguës et peuvent être neutralisés par des antioxydants endogènes tels que les enzymes super oxydases et la catalase. Les espèces réactif oxygène (ROS) sont bénéfiques pour augmenter les niveaux d'expression génique des protéines oxydatives, qui est un mécanisme clé dans l'apoptose des cellules bactériennes. Les multiples mécanismes d'action simultanés contre les germes cibles nécessiteraient plusieurs mutations génétiques simultanées dans la même cellule bactérienne pour développer une résistance antibactérienne, il est donc difficile pour les bactéries de devenir résistantes aux NPMs. L'avantage de ces mécanismes simultanés est évident : il est peu probable qu'un microorganisme ait plusieurs gènes mutés, il est donc beaucoup plus difficile de développer une résistance aux NPMs (**Wang et al., 2017**)

Taille : La taille exceptionnellement petite des nanoparticules entraîne de nouvelles propriétés, comme une grande interaction avec les cellules cibles en raison d'un rapport surface/masse plus important (**Wang et al., 2017**).

Potentiel zêta : Il joue un rôle important dans l'effet bactéricide contre les germes cibles car la charge des NPMs influe sur l'attraction entre les NPMs chargées positivement et les composants de la paroi bactériennes chargés négativement (**Wang et al., 2017**).

Structure cristalline : Les nanoparticules métalliques de forme cubique ont montré une toxicité pour les germes pathogènes plus élevée que les nanoparticules métalliques de forme sphérique pour le même diamètre (**Linlin.,2017**). Les nanoparticules métalliques de forme nano-plaque triangulaire ont un effet bactéricide plus important que les nanoparticules métalliques de forme nano-sphère ou nanotube, cette différence est due aux surfaces d'interaction des différentes structures (**Pal et al., 2007**).

Concentration : La concentration influe significativement sur l'efficacité antimicrobiens car à certaines concentrations inférieures à 5 mM, les germes cibles présentent une résistance vis à vis des nanoparticules métalliques (**John et al., 2021**).

Agents de coiffage : Selon une étude menée par [Wehling](#) et al., (2014), des groupements anhydride d'acide ont un effet antimicrobien et les surfaces oxydées et chargées négativement (oxygénée) ont un effet biocide plus important car ces derniers favorisent l'interaction avec les composantes cellulaires. Les nano diamant charge ⁺ se fixent à la surface des parois chargées négativement du germe cible électro-statiquement, tandis que les nano diamant charge ⁻ sont incorporées dans le germe cible.

Facteurs environnementaux : l'agitation, pH, oxygénation ainsi la chaleur influe sur la toxicité des NPMs contre le germe cible

- La diminution du pH accélère la dissolution des NPMs et augmente l'effet biocide des NPMs, car il modifie la charge de surface de ce dernier ce qui aide à l'adhérence sur les parois du germe cible. (**Wang et al., 2017**)
- La température et oxygénation, la température stimule les NPMs par le fait de libérer des électrons, et ces derniers interagissent avec O₂ et donnent des espèces réactives oxygénées ROS (**Wang et al., 2017**)

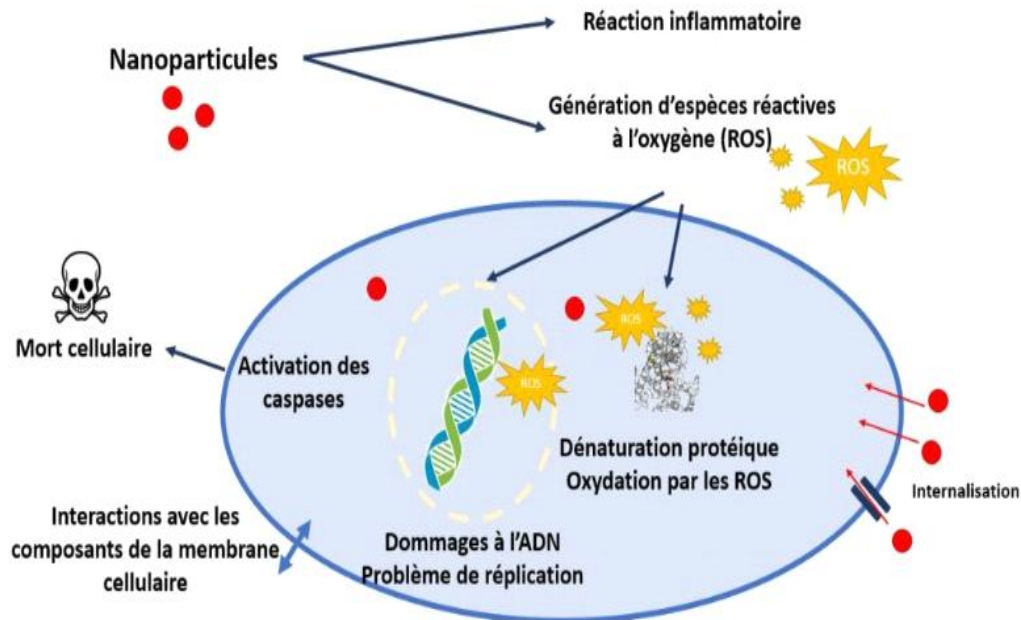


Figure 4 : Mécanismes d'action supposés des NPMs contre les germes cibles (DADI., 2019).

7. Différentes utilisations des nanoparticules métalliques

Les domaines d'utilisation des nanoparticules sont nombreux (**Figure 5**) tels que, biocapteurs, la thérapie génique, le diagnostic, la catalyse des colorants, les anti-inflammatoires et les anticancéreux. Des applications dans les domaines biotechnologiques telle que la filtration de l'eau, la conservation des aliments, la désinfection des tissus et les pansements pour les blessures, les cosmétiques, les vaporisateurs d'ambiance, les vêtements, la teinture, nano-pesticides et nano-insecticides (Aftab et al., 2021).

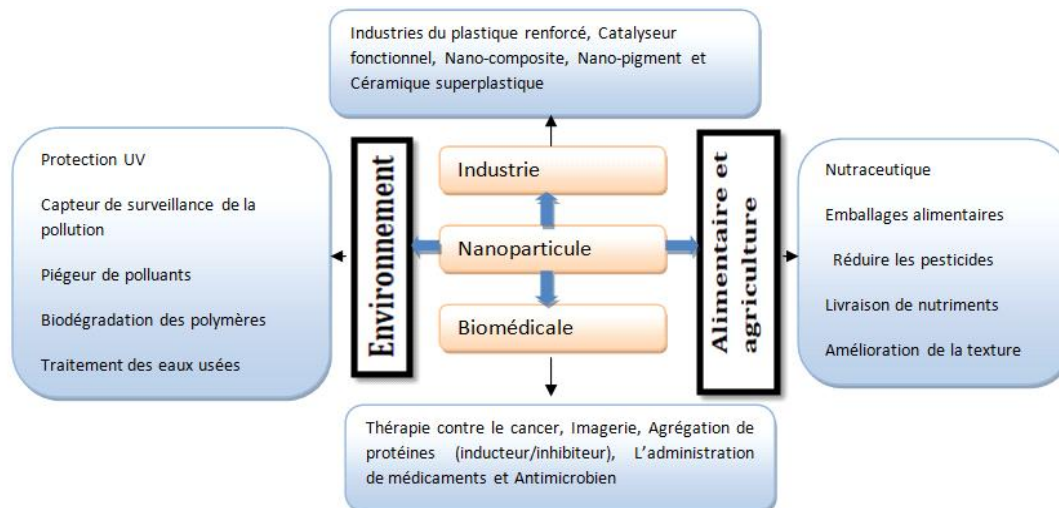


Figure 5 : Divers domaines d'application des NPMs (Ejaz, 2014).

Partie II : Actinobactéries

1. Généralités

Les actinobactéries sont des bactéries Gram positif, leur morphologie présente un mycélium, leur croissance donne lieu à des colonies filamenteuses qui irradient par une croissance centrifuge, autour du germe qui leur a donné naissance. Ce sont des bactéries aérobies (stricte ou facultative), chimio hétérotrophe, comme saprophyte dominant des sols, en outre la plupart des espèces du genre *Streptomyces* dégagent une odeur terreuse due à la synthèse de la géosmine (Law et al., 2019).

2. Habitats

Les actinobactéries peuvent être présent dans divers environnements tel que l'eau douce et sédiments (Ferial, 2008 ; Djinni et al., 2018), les eaux marines (Balagurunthan et al., 2010, Djinni et al., 2013), ou des parasites intracellulaires des spongiaires (Grandhimathi et al., 2007). D'autres sont endophyte (Inderiati et Franco, 2008 ; Djinni et al., 2013) ; aussi présent dans la rhizosphère des plantes médicinales, (Khamna et al., 2010) et même dans l'écorce des arbres, (Kitouni et al., 2005). Selon Mazodier et al., (1974), la présence des actinobactéries dans l'air n'est pas un habitat naturel mais un moyen de dissémination des spores, Les actinobactéries se retrouvent aussi dans les environnements extrêmes tels que les sols pollués contenant des métaux, (Desjardins., 2002), des hydrocarbures ou du pétrole (Baniasadi et al., 2009), des boues activées, (Simon et Meunier., 1970). Les sols sahariens,

(Djinni et al., 2019 ; Djinni et al.,2022) et les sols polaires gelés et les lacs extrêmement alcalins, (Mariat et Sebald.,1990, Sanglier et Trujill., 1997) (Figure 6).

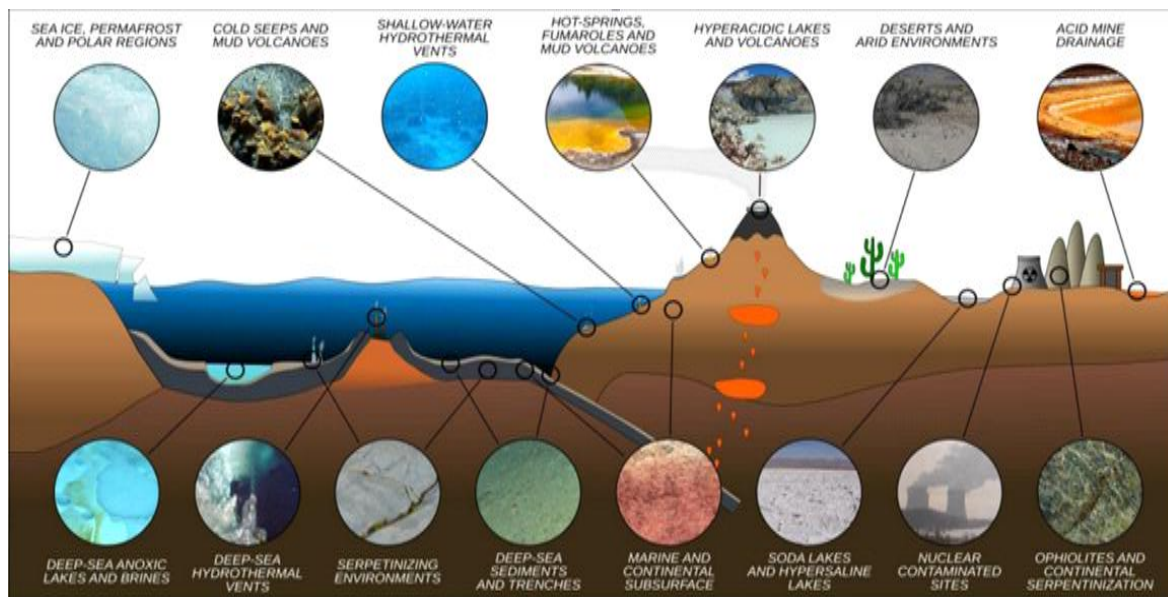


Figure 6 : Les habitats extrêmes inexplorés comme sources d'actinobactéries rares de la croûte terrestre (Merino et al., 2019).

3. Cycle de développement du genre *Streptomyces* sp.

Sur milieu solide, le cycle de développement des *Streptomyces* débute avec la germination de la spore qui donne lieu à un mycélium plurinucléés appeler mycélium du substrat (phase végétative). Le vieillissement de ce dernier donnera naissance à un mycélium aérien polynucléé qui se divisera en compartiments où chaque compartiment donne lieu à une spore de résistance (phase de sporulation reproductive). Pendant cette différenciation morphologique, il y'aura production de métabolites secondaires appelés différenciation morphologique et physiologique. (Law et al., 2019). Sur milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, cependant il existe d'autres cas exceptionnels qui peuvent sporuler (Figure 7).

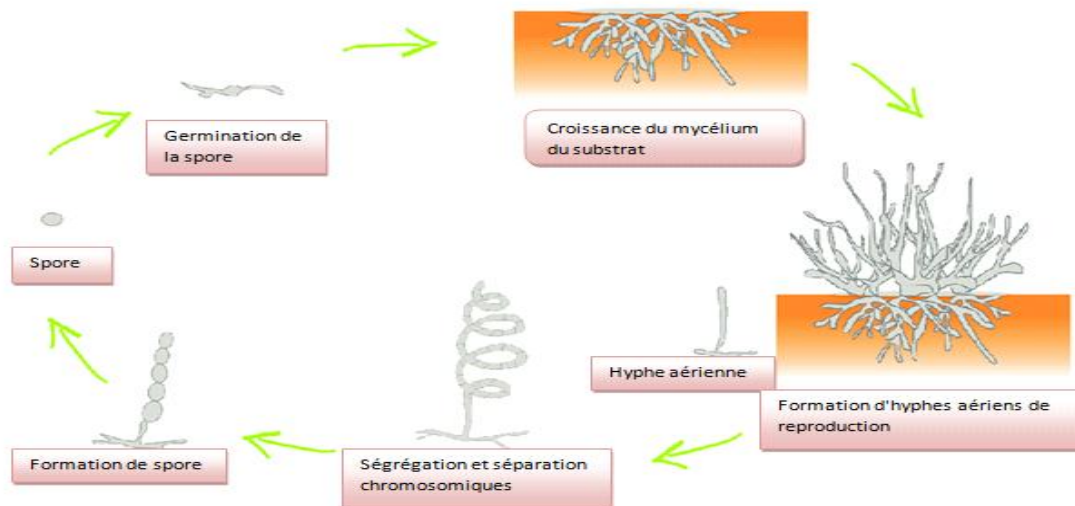


Figure 7 : Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Barka et al., 2016).

4. Importance des actinobactéries

Les actinomycètes, présentes dans le sol, ayant une polyvalence métabolique étonnante et un mécanisme pour nettoyer les polluants dangereux. Les actinobactéries sont également présentes dans des conditions extrêmes telles que température élevée, faible humidité, manque de nutriments et production de biosurfactants et accélération de la réaction d'oxydation biologique et de biodégradation des polluants. Ces bactéries ont des mécanismes de résistance pour produire des superoxyde dismutases, des transporteurs d'efflux et des protéines de liaison aux métaux. Ils provoquent la dégradation des herbicides, des pesticides (organochlorés-lindane), des métaux lourds, du chrome, des produits pétrochimiques, des nitroaromatiques, du 2,4,6 trinitrotoluènes (TNT), des déchets de tannerie et des composés aromatiques (Khurana et al., 2019).

Les actinobactéries présente un grand potentiel en termes de biosynthèse des substances bioactives, plus de 10000 molécules bioactives produites par ces derniers (annexe I tableau V). Intérêt de la synthèse des NPMs par les actinobactéries tel que les genres *Thermomonospora*, *Rhodococcus* et *Streptomyces* c'est que la synthèse est réalisable intra et extracellulaire (Skladanowski et al., 2006) (Figure 8) Annexe I (tableaux VI et VII)



Figure 8 : Potentielles applications des actinobactéries en industrie et agriculture



CHAPITRE 2

MATERIELS ET

METHODES

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Mycologie, laboratoire de génie des procédés (FTIR, SAA, UV, CPG) de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia, pendant la période allant du 14/04/2022 au 16/06/2022.

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel analytique utilisé dans cette étude est rapporté en **annexe II**.

2. Matériel biologique

2.1. Souches d'actinobactéries

Deux isolats d'actinobactéries appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) sont étudiés dans ce travail.

La souche *Streptomyces* sp. BA51 est d'origine tellurique, isolée par le Dr. Djinni, à partir d'une mine de charbon de la région de Béchar. Cette souche est productrice d'enzymes d'intérêt biotechnologique comme des amylases, protéases, lipases, cellulases et tyrosinases, ainsi que des molécules actives à l'encontre de *E. coli* ST131 uropathogène (**Djinni et al., 2022a**).

La souche *Nocardiopsis* sp. BA4 a pour origine un sol salin de la région d'El Oued et caractérisée par un potentiel biotechnologique important (**Djinni et al., 2022b**)

2.2. Germes cibles

Les quatorze souches de référence utilisées dans cette étude ont été fournies par le Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'université de Bejaia (LMA).

Des bactéries à Gram positif, Gram négatif et des moisissures :

Escherichia coli ATCC; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213; *Staphylococcus aureus* résistant à la méthiciline (SARM) ATCC 43400, *Vibrio cholerae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Typhi*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* sp, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp.

II. Méthodes

1. Repiquage des souches BA51 et BA4

Les isolats sélectionnés pour cette étude, BA51 et BA4, ont été repiqués sur leurs milieux d'isolement sélectifs.

Les souches ont été ensemencées sur les milieux Gausse (**annexe II**) et incubées à 28°C pendant 7 jours. La figure 9 illustre leurs aspects morphologiques (A, B)



A : Aspects morphologiques de la souche BA4

B : Aspects morphologiques de la souche BA51

Figure 9 : Illustration des aspects morphologiques des souches isolées BA51 et BA4.

2. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux souches

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des deux isolats BA51 et BA4 a été réalisée par la méthode des cylindres d'agar à l'encontre de germes cibles afin de déterminer leur potentiel antagoniste.

2.1. Standardisation de l'inoculum des germes cibles

Des cultures bactériennes et fongiques âgées de 24h et 72h, respectivement, ensemencées sur une gélose nutritive et PDA ont été utilisées. 3 à 4 colonies sont prélevées avec une pipette Pasteur stérile et introduites dans des tubes contenant 5mL d'eau physiologique stérile, la charge cellulaire a été par la suite ajustée par dilution de façon à obtenir une concentration de 10^7 UFC/ml. Après agitation rigoureuse au vortex, la suspension est ensemencée par écouvillonnage sur le milieu Muller-Hinton (MH) (**Annexe II**).

2.2. Test des cylindres d'agar

Les deux souches étudiées BA51 et BA4 sont ensemencées en stries serrées à la surface du milieu Gausse, puis incubées à 28°C pendant 7 jours afin d'obtenir un tapis homogène. Des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont réalisés avec une pipette pasteur et prélevés stérilement puis déposés, à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencé, à l'aide d'écouvillons, par les inoculum de germes cibles préalablement préparés. Pour chaque germe pathogène, 3 répétitions sont réalisées. Les boîtes sont mises par la suite à

4°C pendant 30 minutes, afin de permettre la diffusion des substances actives produites par les souches testées et inhiber momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 28°C pendant 24 à 48h pour les moisissures. La mesure des diamètres des zones d'inhibition autour des cylindres d'agar, exprimés en millimètre, traduit l'activité antimicrobienne des souches testées.

3. Culture des souches BA51 et BA4 et obtention des surnageants et biomasse

3.1. Préparation des précultures et culture

Dans le but d'amorcer la biosynthèse des nanoparticules métalliques à partir de surnageants de culture et de la biomasse de BA51 et BA4, des précultures de 25 ml dans le bouillon Gausse sont réalisées.

En effet, les deux souches ont étéensemencées en stries serrées sur milieu Gausse agar et incubées à 28°C pendant 7 jours, comme première étape. Cinq cylindres d'agar sont formés et utilisés en guise d'inoculum pour ensemercer les deux souches dans des flacons contenant 25 ml de bouillon Gausse, en seconde étape. Ces précultures sont, par la suite, mises à incuber à 28°C pendant 4 jours sous agitation permanente à 120 tours/min. Après 4 jours d'incubation, les précultures ainsi préparées sont utilisées pour inoculer des cultures de 500 ml de bouillon Gausse contenues dans des flacons de 1L. Ces dernières sont mises à incuber à 28°C pendant 7 jours sous agitation permanente à 120tours/min.

3.2. Obtention des surnageants de culture et des biomasses

Les cultures de BA51 et BA4 ainsi réalisées sont récupérées et centrifuger à 7000 tours/min pendant 20 min dans le but de récupérer les surnageants de culture d'une part et la biomasse en culot, d'autre part.

4. Biosynthèse des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc

La biosynthèse des nanoparticules métalliques à partir de surnagent de culture et de la biomasse des deux souches d'actinobactéries a été entreprise suivant les protocoles de Zaho et al., (2022) et Kumar et al., (2022).

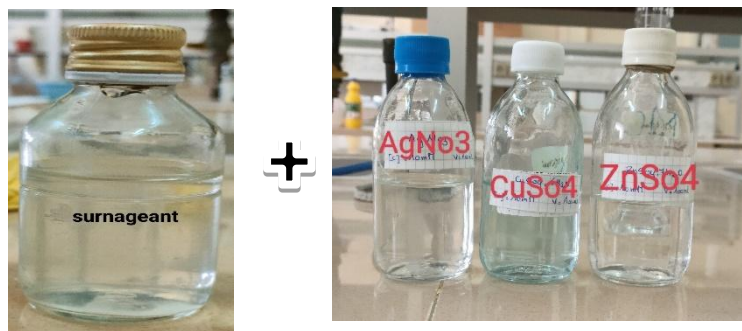
4.1. Biosynthèse à partir des surnageants de culture

La biosynthèse des nanoparticules métalliques réalisée à partir des surnageants de culture des deux souches BA51 et BA4 a été entreprise comme suit :

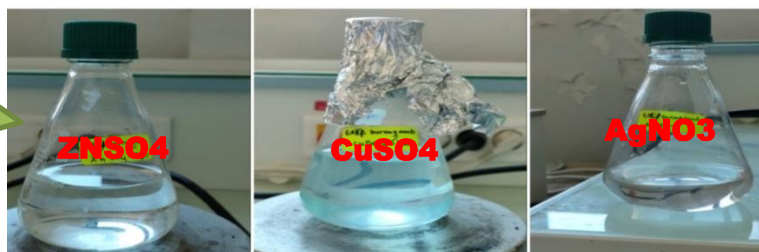
Chaque surnagent de culture a été divisé en 5 parties de 100 mL chacune pour une synthèse extracellulaire (schéma 3) de nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc.

Selon le protocole de **Zaho et al., (2022)**, une concentration de 10mM est réalisé pour chaque sels métalliques (AgNO_3 ; $\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$) dans 100ml d'eau distillé.

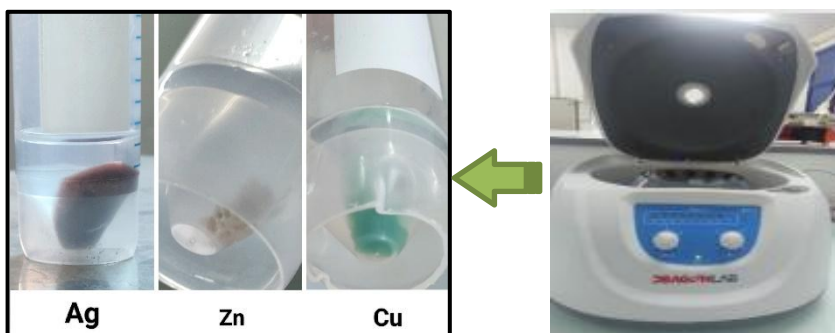
Une solution de 200mL est préparé en additionnant 100ml du surnageant avec une concentration 10mM de chaque sels métalliques préalablement préparé (v/v) et réchauffé à 100°C pendant 15min, un virage de couleur est obtenu, ensuite une centrifuge à 7000tours/min pendant 20min est réalisé a plusieurs cycles pour une bonne sédimentation, récupération des culots après plusieurs lavage a l'eau distille et a l'éthanol pour éliminer les ions libres, séchage à 100°C sous agitation afin d'obtenir une poudre de NPMs. Cette manipe a été applique pour les deux souches.



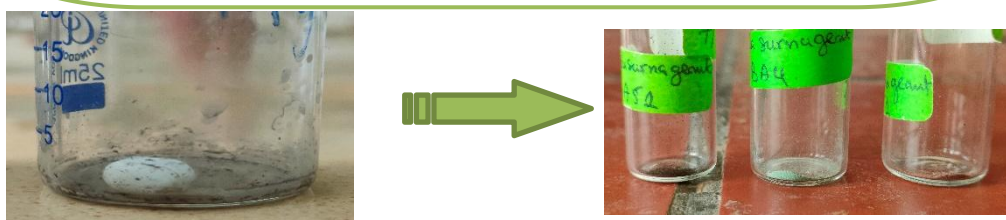
Addition du surnageant avec la concentration 10mM de chaque sel métallique (AgNO_3 ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)



Chauffage à $100^\circ\text{C}/15\text{min}$ sur plaque chauffante



Centrifugation à 7000 tours/min pendant 20 min et récupérations des culots après plusieurs lavage à l'eau distille et à l'éthanol



Séchages des culots à 100°C sous plaque agitatrice puis conservation

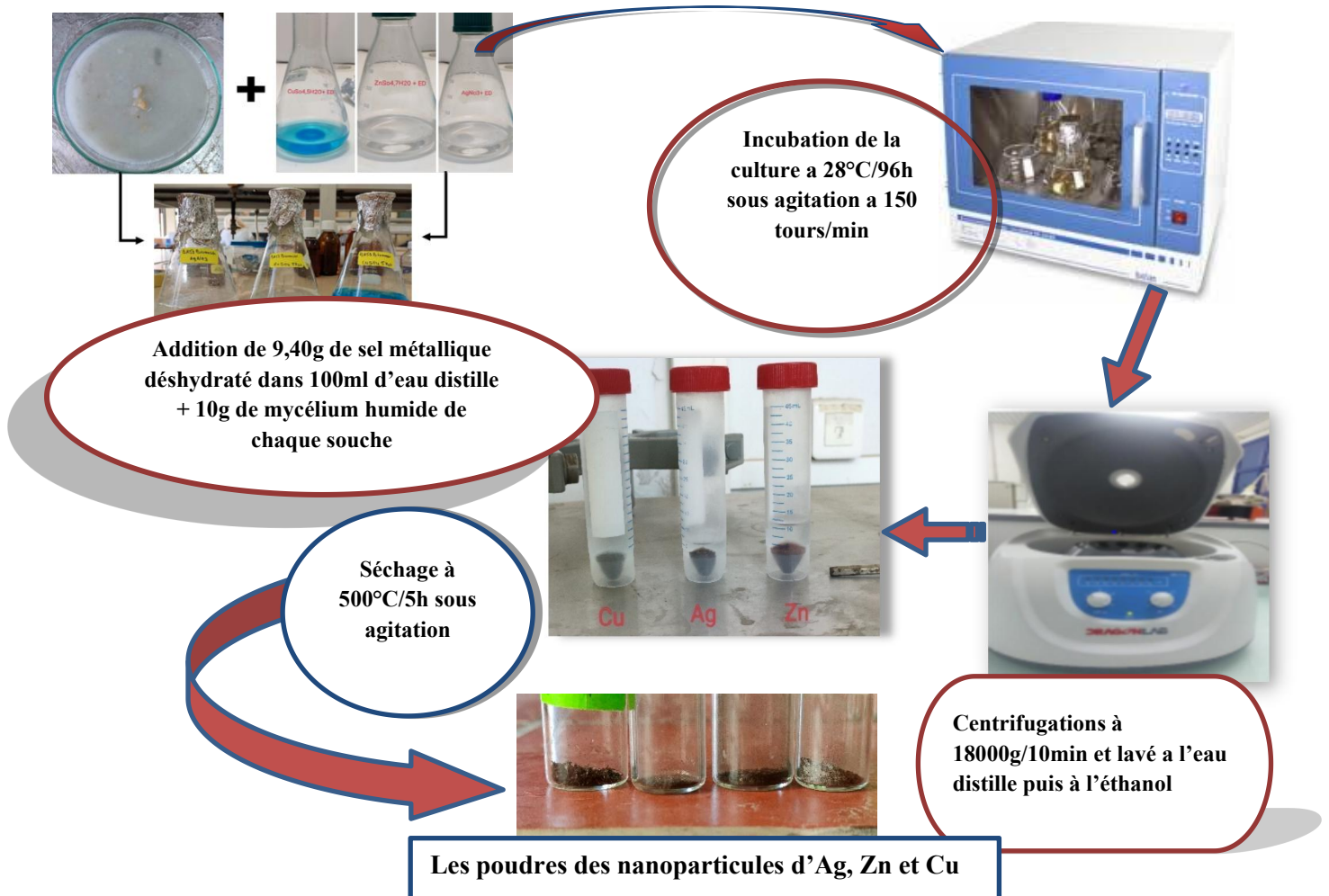
Schema 3: Protocoles de la synthese extracellulaire des nanoparticules metaliques

4.2. Biosynthèse à partir de la biomasse

Les nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc ont été synthétisées également à partir de la biomasse obtenue des deux souches étudiées selon le procédé adopté par Kumar et al., (2022).

Les étapes de biosynthèse sont rapportées dans le schéma 4 ci-dessous.

- 9,40g de sel métallique déshydraté est dissous dans 100ml d'eau distillé, 10g de mycélium humide de chaque souche (BA51 et BA4) est ajouté à la solution préparée et la culture est incubée à 28°C/96h sous agitation à 150 tours/min
- Après l'incubation un virage de couleur est observé, les nanoparticules produites sont soumises à un processus de centrifugation à 18000g/10min et lavé à l'eau distillé puis à l'éthanol pour éliminer tous les ions
- Les culots récupérés sont séchés à 500°C/5h sous agitation puis conservés



Schema 4 : protocoles de la synthèse intracellulaire des nanoparticules

5. Caractérisation des nanoparticules synthétisées

La mise en évidence des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc synthétisées est effectuée à travers l'utilisation de plusieurs méthodes spectrales telles que la spectroscopie UV/Vis et la spectroscopie infrarouge mais également à travers l'appréciation du changement de couleur après mise en contact du matériel biologique des deux souches (surnageant ou biomasse) avec la solution métallique.

5.1. Mise en évidence du changement de couleur

La synthèse des nanoparticules extracellulaire et intracellulaire ont démontré un virage de couleur comme indice de production des nanoparticules

Le test antioxydant a aussi démontré un virage couleur comme indice de présence de ce dernier

5.2. Spectroscopie UV/Visible (Annexe III)

Les étapes d'analyses de Spectroscopie UV/Visible

- ✓ 5mg d'extrait des NPMs sont dessous dans 10ml d'eau distillé suivis d'une sonication afin de solubiliser les NPMs.
- ✓ 1ml est versé dans une cuve en quartz, cette dernière est mise dans l'appareil ensuite un balayage de 200 à 600nm est réalisé et une lecture.

5.3. Spectroscopie infrarouge (FTIR) (Annexe III)

Les étapes d'analyses de Spectroscopie infrarouge (FTIR)

- ✓ Pesé 0.0800g de kbr est mélangé avec 0,002g, homogénéisé bien le mélange dans un mortier.
- ✓ Mettre le mélange dans le support afin de la presser à 75KN/2min dans le but d'avoir un disque.
- ✓ Mettre le disque dans l'appareil FTIR IRAffinity-1 et La lecture des pics est mise en évidence par un logiciel IRAffinity-1.

6. Mise en évidence des activités biologiques des nanoparticules métalliques synthétisées

Dans le but de mettre en évidence le potentiel bioactif des nanoparticules métalliques synthétisées à partir des surnageants de culture et des biomasses deux souches BA51 et BA4,

des tests d'activités ont été réalisés, notamment, l'évaluation des activités antibactérienne et antifongique, d'une part, et du potentiel antioxydant, d'autre part.

6.1. Evaluation de l'activité antimicrobienne

6.1.1. Préparation des solutions de nanoparticules métalliques

Un volume de 1,1mg de chaque extrait de NPMs pour les deux souches d'actinobactéries (BA51 et BA4), sont dissous dans un volume 1,1ml de Diméthyle sulfoxyde DMSO.

6.1.2. Test des puits

L'évaluation de l'activité antimicrobienne des 12 solutions de nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc issues des surnageants de culture et de la biomasse de BA51 et BA4 a été effectué par la méthode des puits sur milieu Mueller Hinton. Des puits (de 6 mm de diamètre) sont réalisés, à la surface du milieu Mueller Hinton préalablementensemencées par les germes cibles préalablement cités (10^7 UFC/mL), à l'aide d'un emporte-pièce, puis remplis de 50 μ l des 12 solutions de nanoparticules synthétisées, d'une part, et le DMSO comme témoin négatif, d'autre part. Deux essais sont réalisés pour chaque extrait. Les boîtes sont par la suite mises à incuber à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les moisissures. La lecture des résultats est effectuée en mesurant le diamètre des zones d'inhibition autour des puits après 24h pour les bactéries et 48h pour les moisissures comme l'illustre le schéma suivant.

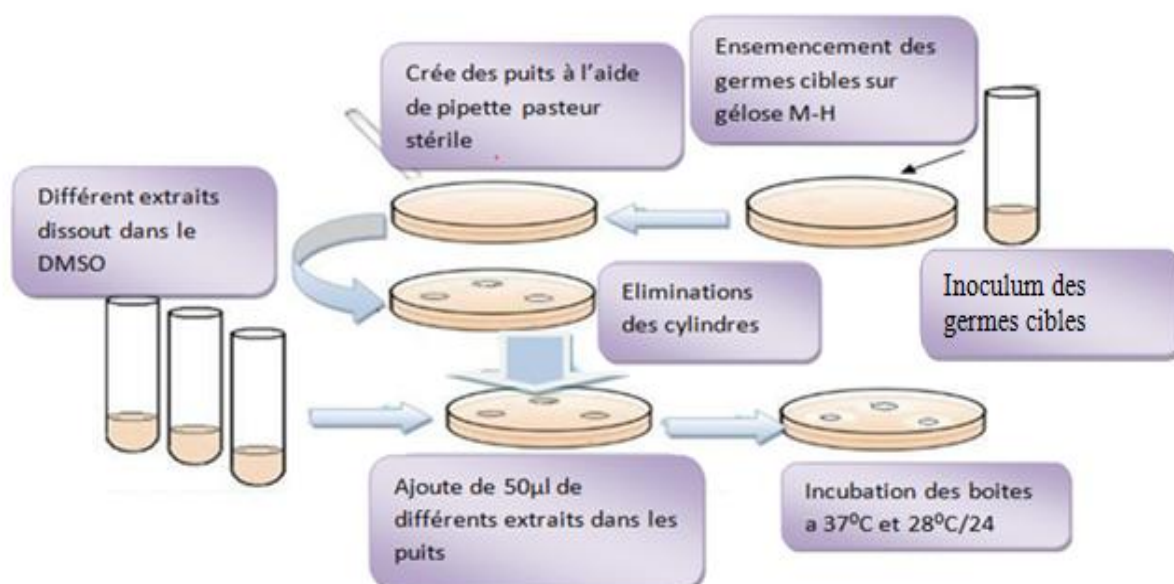


Schéma 5 : Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des solutions de NPMs par la méthode des puits

7. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI)

La détermination des concentrations minimales inhibitrices des solutions de nanoparticules ayant donné les résultats les plus prometteurs est réalisée par la méthode des micro dilutions (**sidharth et al., 2018**).

Les étapes suivantes ont été suivies à cet effet :

- ✚ Préparation des solutions de nanoparticules (AgM51, AgM4, AgS51 et CuM4) à des concentrations de 2mg/mL de Diméthylsulfoxyde (DMSO)
- ✚ Préparation des inoculums : une concentration de 10^6 UFC/mL est réalisée pour chaque souche test à savoir *E. coli*, SARM, *Vibrio cholerae* et *Salmonella Typhi*.
- ✚ Utilisation d'une microplaque de 96 puits et 50 μ L de milieu Mueller Hinton bouillon (MHB) sont déposés dans chaque puit, ensuite un volume de 50 μ L des solutions préalablement préparées est déposée à la troisième colonne (**schéma 6**) et des dilutions sont, par la suite, réalisées à partir de cette concentration jusqu'au dernier puit de la première ligne pour avoir au final des concentrations allant de 1000 μ g/mL à 1.9 μ g/mL.
- ✚ Ensemencement de l'inoculum dans chaque puit, la même manipulation est réalisée pour les autres solutions et germes cibles testées puis la plaque est mise à incuber à 37°C pendant 24h.

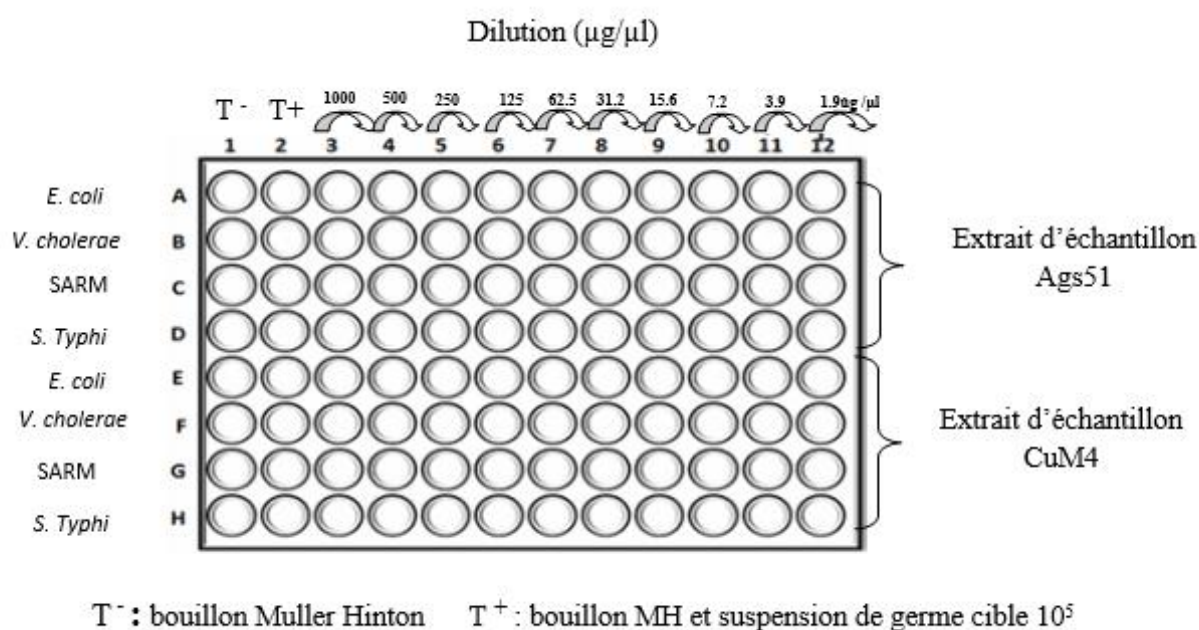


Schéma 6 : Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des solutions de nanoparticules synthétisées par la méthode des microplaques

8. Evaluation des propriétés antioxydantes des nanoparticules métalliques synthétisées.

8.1. Evaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH

Le réactif 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle (DPPH) réactif organique radicalaire, il est utilisé afin de mesurer le pouvoir antioxydant des substances bioactives. Le but de ce test est d'étudier la capacité des nanoparticules métalliques synthétisées à céder des protons et/ou des électrons afin de neutraliser le radical DPPH*, sous la forme radicalaire (**Williams et al., 1995**)

Le test de piégeage du DPPH est réalisé selon la méthode de **Lesage-Meessen et al., (2001)** avec des modifications mineures.

- Préparation de l'extrait : une concentration de 5mg par 10ml d'eau distillée est réalisée pour chaque solution, suivi d'une sonication afin de mieux solubiliser les NPMs.
- Préparation de la solution de DPPH en faisant dissoudre 6mg de DPPH dans 100ml de méthanol
- 200µl de la solution pour chaque échantillon de nanoparticules métallique avec 900µl de la solution DPPH suivi d'une agitation rigoureuse et incubation à l'obscurité pendant 30min. La mesure de l'absorbance est réalisée à 517nm.

La détermination de l'activité antiradicalaire est donnée par la formule ci-dessous

$$\text{Piégeage du DPPH (\%)} = \left[\frac{\text{Contrôle-Test}}{\text{Contrôle}} \right] \times 100$$

8.2. Evaluation du pouvoir chélateur du fer.

La capacité chélatrice des extraits de NPMs est mesurée en suivant l'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-ferrozine après incubation des échantillons en présence du fer divalent selon la méthode de **Wang et al. (2008)** avec une légère modification.

- Préparation de la solution témoin : 250µl de méthanol avec 25µl de chlorure ferreux et 800µl d'eau distillée
- Préparation de la solution témoin avec ferrozine : 250µl de méthanol avec 25µl de chlorure ferreux et 800µl d'eau distillée et 250µl de ferrozine.
- 250µl de solution de NPMs en mélange avec 25µl de chlorure de ferreux et 800µl d'eau distillée suivi d'une agitation et maintenir pendant 5minutes à l'obscurité.
- Rajout au mélange 50µl de la solution de ferrozine et attendre 5min avant la mesure de l'absorbance à 562nm.

- Le pouvoir chélateur des solutions de nanoparticules synthétisées est déterminé selon la relation suivante

$$\text{Capacité chélatrice (\%)} = [(A_b - A_t) / A_b] \times 100$$

8.3. Evaluation de l'activité du Pouvoir réducteur :

Le pouvoir réducteur est un essai souvent employé pour évaluer la capacité d'un éventuel antioxydant à donner des électrons (**Zouari et al., 2013**), il est estimé par la méthode de **Gülçin et al. (2002)** avec une légère modification.

- Mélange 375µl de l'extrait avec 375µl du tampon phosphate a 0.2M a pH6.6
- Incubation au bain marri à une température de 50°C pendant 20min
- Rajout 375µl de la solution trichloro-acétique (TCA) a 10% puis Incube a l'obscurité pendant 5min
- Rajout 50µl de la solution FeCl₂ (0.1%) et Mesure d'absorbance à 700nm

8.4. Détermination de la teneur en composés phénoliques

La teneur en composés phénoliques est déterminée selon la méthode décrite par **Kahkönen et al., (1999)**

- Préparation du folin est réalisé par addition de 4 ml du folin – ciocalteu dans 40ml d'eau distille.
- 200 µl d'extrait sont mélangés avec 1ml du réactif de Folin – Ciocalteu, puis agitation pendant 3 minutes
- Rajout 800µl de carbonate de sodium (7,5%) a la solution réactionnelle
- Incubation pendant 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 725nm



CHAPITRE 3

RESULTATS ET

DISCUSSIONS

Les résultats de cette étude seront présentés et discutés dans ce chapitre qui comprend, en premier lieu, la mise en évidence du potentiel antagoniste des deux souches d'actinobactéries étudiées, la synthèse des nanoparticules à partir de surnageants de culture et de la biomasse des deux isolats. La caractérisation des nanoparticules synthétisées et l'évaluation de leurs activités biologiques à travers le potentiel antibactérien, antifongique et antioxydant seront abordées en deuxième lieu.

1. Mise en évidence du potentiel antagoniste des souches d'actinobactéries étudiées

L'étude du potentiel antagoniste des souches étudiées BA4 et BA51 est réalisée en utilisant la méthode des cylindres d'agar à l'encontre de 11 bactéries et trois moisissures. Les résultats obtenus sont rapportés dans la **figure 10** ci-dessous

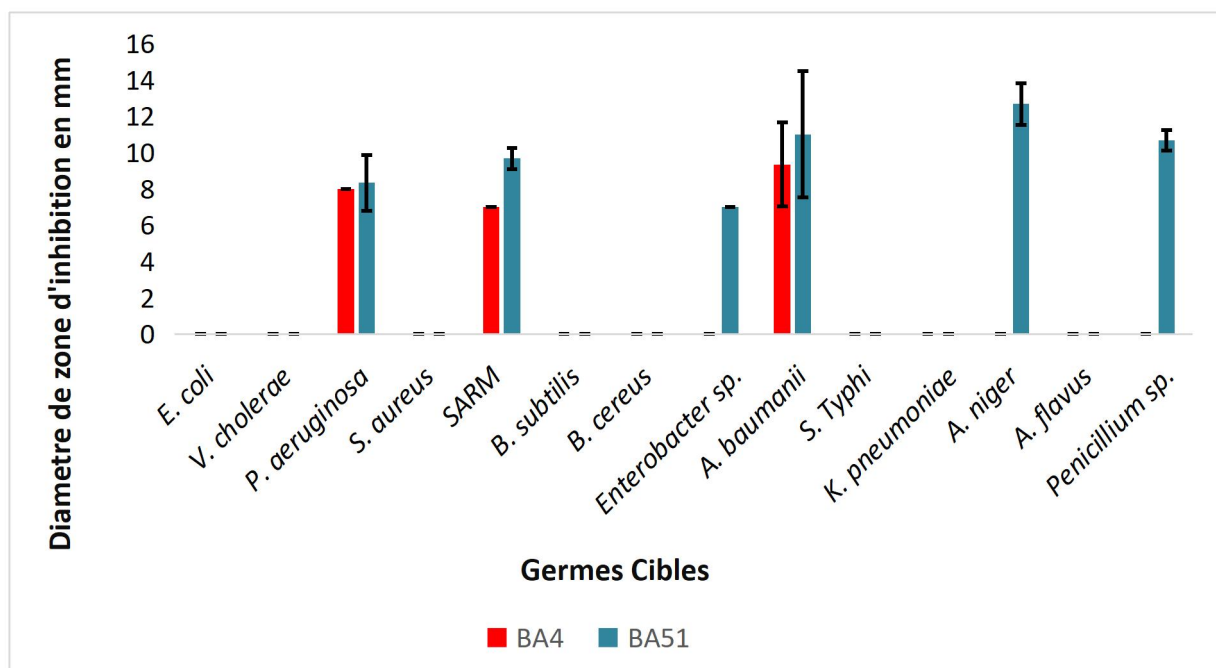


Figure 10 : Mise en évidence de l'activité antagoniste de BA4 et BA51 à l'encontre de bactéries et de moisissures pathogènes par la méthode des cylindres d'agar

A la lumière des résultats obtenus, la souche BA51 a montré une activité relativement faible aussi bien à l'encontre des bactéries à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* 8.33 ± 1.52 mm, *Enterobacter sp* 7 ± 0 mm, *Acinetobacter baumannii* 11 ± 3.46 mm, que Gram positif : SARM 9.66 ± 0.57 mm, ainsi que les moisissures telles que *Penicillium sp* 10.66 ± 0.57 mm, *Aspergillus niger* 12.66 ± 1.15 mm. Par ailleurs, la souche BA4 a un antagonisme

moyen à faible à l'encontre des bactéries à Gram positif et négatif, et est inactive contre les moisissures. **(Figure VI Annexe III).**

Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Djinni et al. (2022), pour la souche BA51 qui manifeste un antagonisme intéressant et important à l'encontre de *E. coli* ST131 uropathogène. Cette étude a permis, également, de mettre en évidence l'activité antifongique de cet isolat vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *flavus* ainsi que *Penicillium* sp. Ceci renseigne sur la richesse du métabolome de la souche. **(Figure VI Annexe III)**

Les actinobactéries d'origine tellurique sont connues pour leur grand potentiel antagoniste aussi bien antibactérien, antifongique qu'enzymatique **(Djinni et al., 2019).**

2. Biosynthèse des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc

2.1. Mise en évidence du virage de couleur des solutions

La biosynthèse des nanoparticules métalliques à partir des surnageants de culture et de la biomasse des deux souches a été entreprise suivant les protocoles de **Zaho et al. (2022)** et **Kumar et al. (2022).**

Au cours de la biosynthèse intracellulaire des NPMs, un virage de couleur est obtenu après incubations à 28°C pendant 144h qui est un indice de production des NPMs **selon Kumar et al. (2022).**

En effet, des virages du blanc au marron foncé ont été observés pour les solutions d'argent et de zinc et du blanc au bleu pour la solution de cuivre **(Figure 11)**

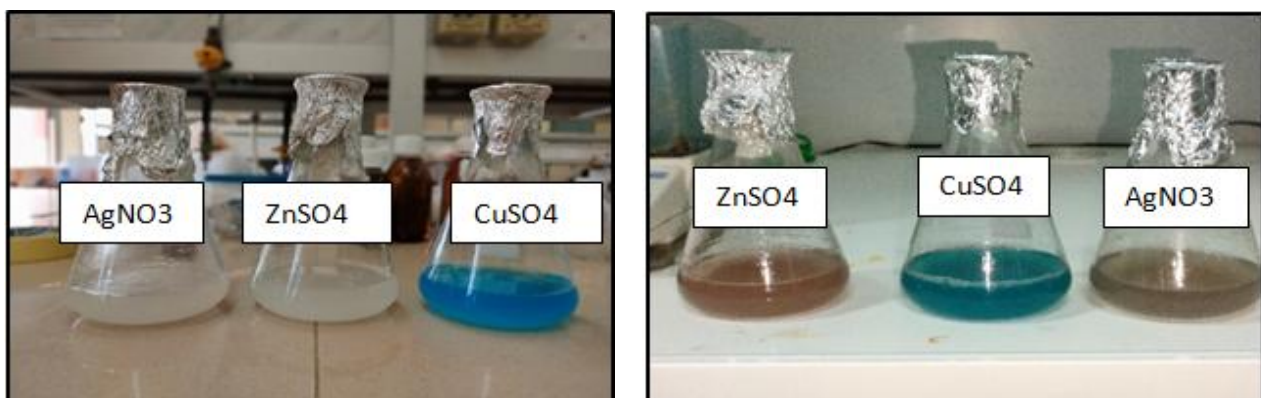


Figure 11 : Solutions réactionnelles après incubation à 28°C/144h dans la synthèse intracellulaire. **A** : Photographie des trois mélanges réactionnels avant incubation, **B** : photographie des trois mélanges réactionnels après incubation.

Des virages similaires ont également été observé lors de la biosynthèse extracellulaire durant le chauffage à 100°C pendant 15min, qui est un indice de production des NPMs selon **Zaho et al. (2022) (Figure 12)**.

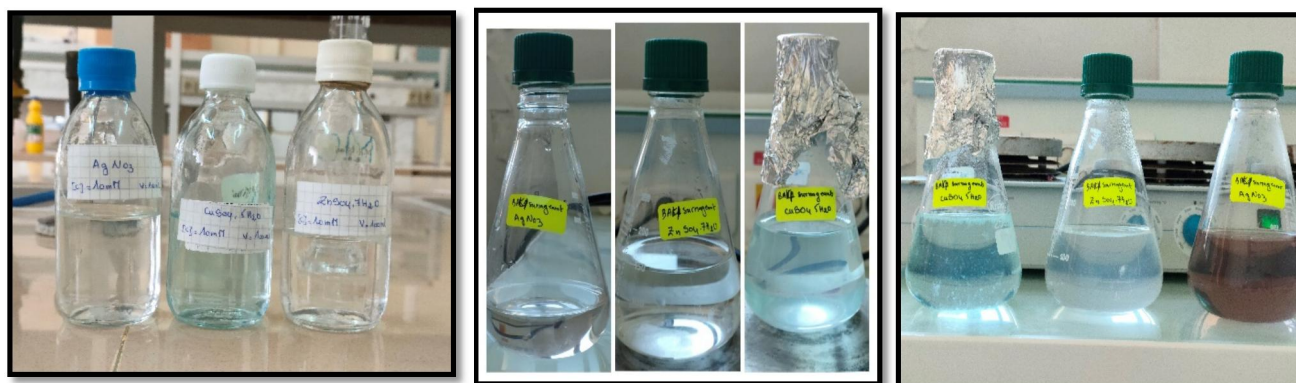


Figure 12 : Evolution des virages de couleurs des solutions réactionnelles après incubation à 100°C/10min lors de la synthèse extracellulaire.

2.2. Détermination des poids secs des poudres de nanoparticules

La détermination des poids secs des divers poudres de nanoparticules biosynthétisées a révélé des différences relatives au métal considéré, à la méthode de synthèse et à la souche d'actinobactérie étudiée. Les valeurs obtenues sont rapportées dans le **tableau VIII** et la **figure 13**.

Tableau VIII : Poids secs des NPMs synthétisées par BA4 et BA51

Poids secs des nanoparticules de cuivre, d'argent et de zinc synthétisées en mg											
<i>BA51 surnageant</i>			<i>BA51 mycélium</i>			<i>BA4 surnageant</i>			<i>BA4 mycélium</i>		
Ag	Zn	Cu	Zn	Cu	Ag	Zn	Cu	Ag	Ag	Zn	Cu
45	40	40	49	194	107	31	38	40	60	221	192

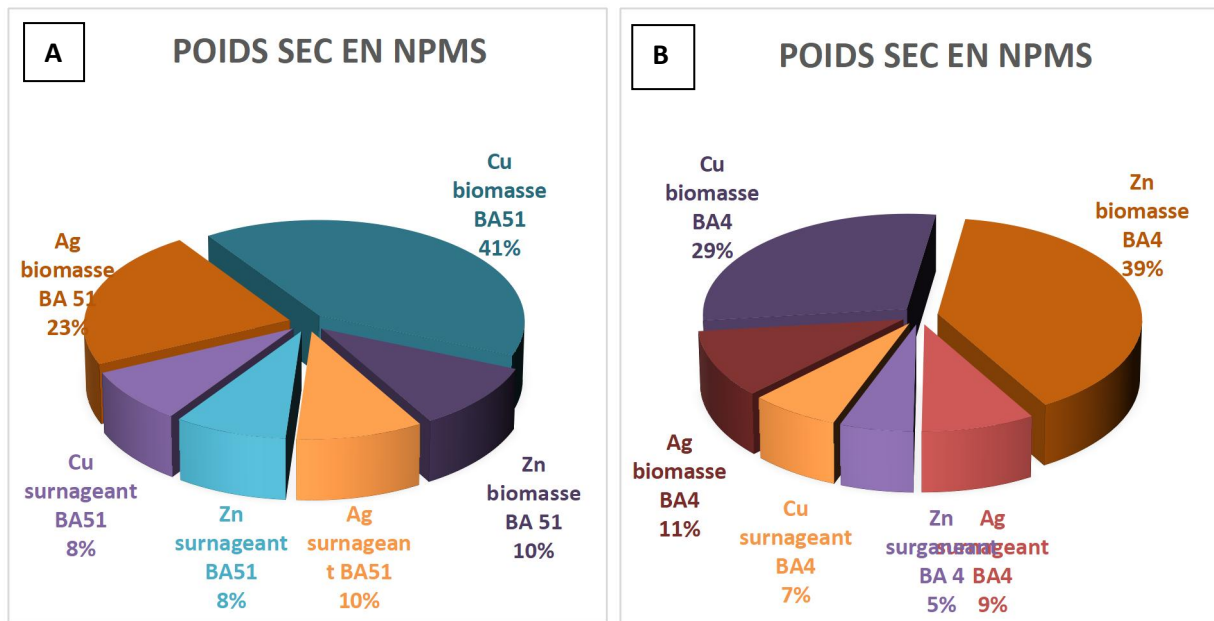


Figure 13 : Représentation du rendement de biosynthèse intracellulaire et extracellulaire des NPMs par **A** : BA51, **B** : BA4.

D'après ces résultats, il est clairement remarqué que la synthèse extracellulaire des NPMs produites par la souche BA51 est supérieure aux NPMs produites par la souche BA4, et ce pour les trois métaux étudiés.

D'autre part, le rendement de production de nanoparticules d'argent et de cuivre est plus important pour l'isolat BA51 que BA4. Cependant, cette dernière avait un rendement supérieur pour la synthèse des NP de Zn par rapport à la souche BA51.

3. Caractérisation des nanoparticules synthétisées

3.1. Spectroscopie UV/Visible

La formation des nanoparticules a été suivie en mesurant le spectre d'absorption UV/Vis dans la gamme de longueurs d'onde de 200 à 600 nanomètres. Les propriétés optiques des NPMs synthétisées ont été étudiées en utilisant la spectroscopie UV/Vis et les longueurs d'ondes maximales d'absorption enregistrées sont présentées dans le **Tableau IX**.

La mesure de l'absorbance du surnageant avant la biosynthèse de NPMs était de 226 nm à 3.360 pour la BA4 ainsi que 216 nm à 3.235 pour la BA51 (**Annexe III**)

Tableau IX : Les différentes longueurs d'ondes maximales d'absorption enregistrées des douze extraits de NPMs produites

Nanoparticules	λ_{\max}	Absorbances
BA51 surnageant Ag	200	1.558
BA51 surnageant Zn	200	1.581
BA51 surnageant Cu	220	1.170
BA51 biomasse Ag	208	3.598
BA51 biomasse Zn	200	1.170
BA51 biomasse Cu	201	2.337
BA4 surnageant Ag	220	2.881
BA4 surnageant Zn	200	0.699
BA4 surnageant Cu	200	1.261
BA4 biomasse Ag	200	4.184
BA4 biomasse Zn	200	0.699
BA4 biomasse Cu	200	1.783

La spectroscopie UV/VIS permet de se renseigner à la nature des liaisons présentes au sein d'un échantillon via l'ordre de grandeur λ_{\max} (Anne et al., 2012).

3.2. Spectroscopie infrarouge à transformé de fourrier (FTIR)

Afin de déterminer la présence des groupements fonctionnels liés à la formation des nanoparticules produites, une analyse par spectrophotométrie FTIR est réalisée par balayage entre 4000 et 400 cm^{-1} . Les profils obtenus sont donnés en **Figures 14, 15, 16, 17**.

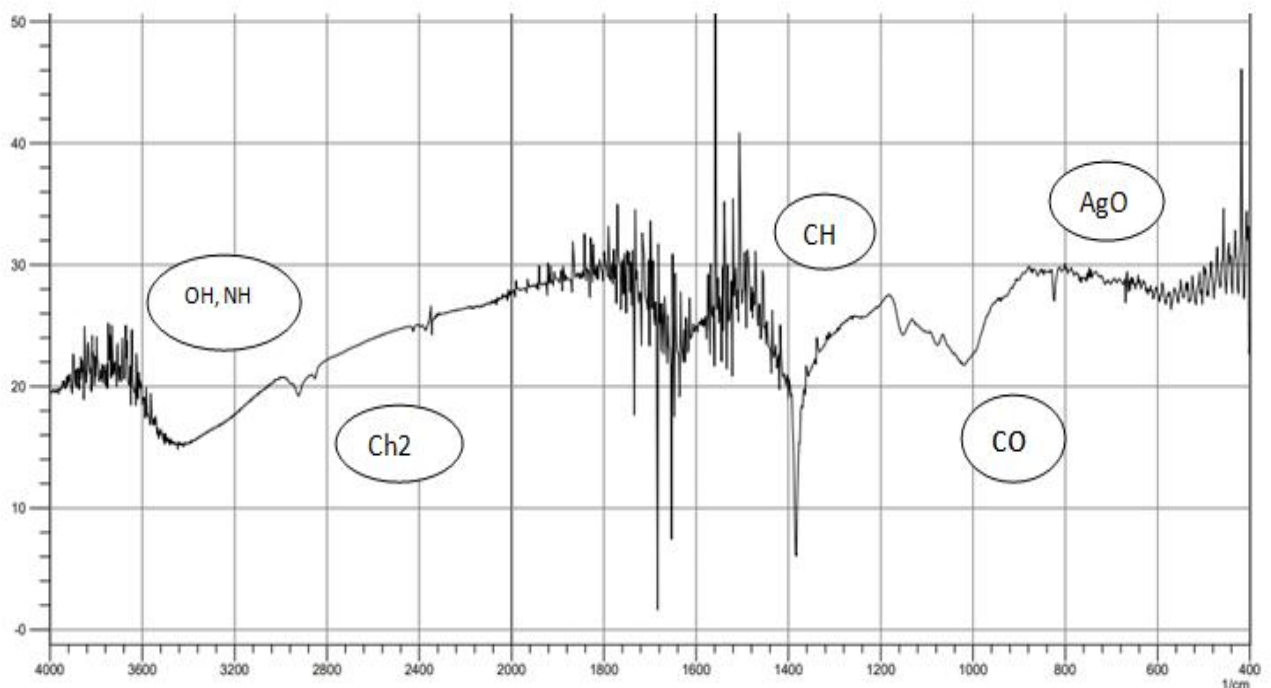


Figure 14 : Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir de la biomasse de la souche BA4

Une bande large comprise entre à 3200 et 3600 cm^{-1} est observée attribué aux vibrations d'étirement des liaisons N–H recouvertes d'un étirement OH. L'ampleur de ce large pic pourrait être attribuée à la formation de liaisons hydrogène intra et intermoléculaires. **(Golinska et al., 2018)**

Le pic de faible intensité observé entre 2960 et 2880 cm^{-1} est lié à l'étirement CH_2 des glucides asymétriques et symétriques et/ou lipides, alors que la bande entre 1350 et 1400 cm^{-1} correspond à la vibration d'étirement aliphatique C-H. **(Golinska et al., 2018)**

La bande comprise entre 1000 et 1050 cm^{-1} est attribuée à l'étirement C–O **(Golinska et al., 2018)**. L'apparition d'un pic est observée à vers 500 cm^{-1} est attribué à la liaison Ag-O de l'oxyde d'argent.

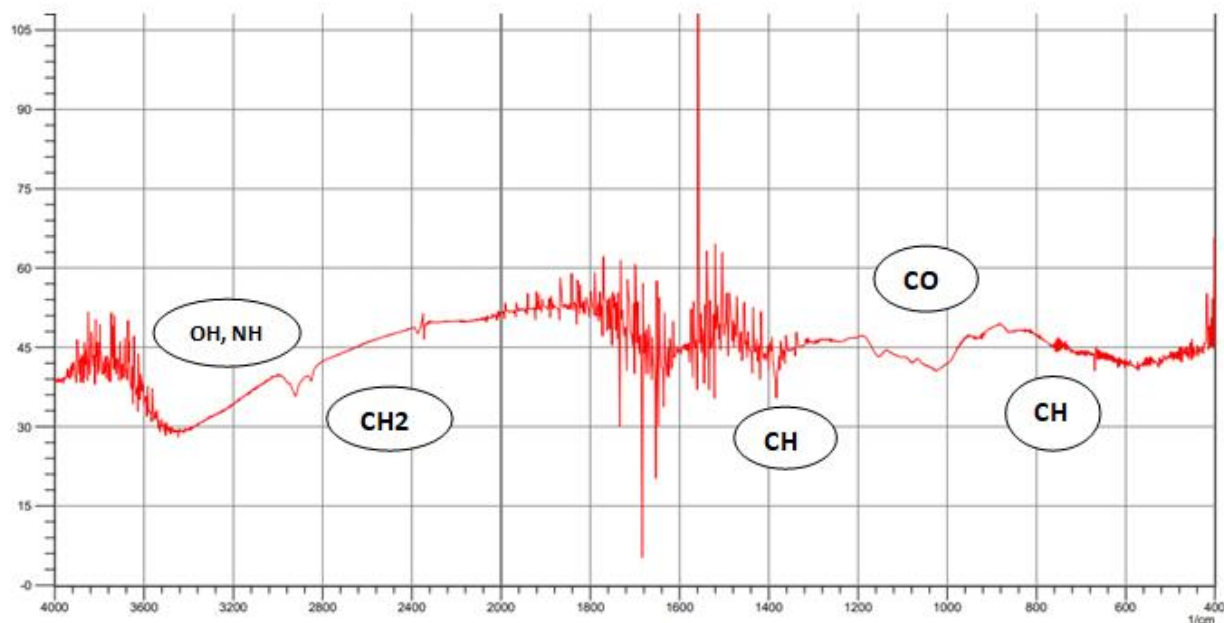


Figure 15 : Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir de la biomasse de la souche BA51.

Les mesures FTIR pour les NPs d'oxyde d'argent synthétisées à partir de la biomasse de la souche BA51 sont données dans la figure 15.

Les forts pics observés à 3444, 2960 et 2880 cm^{-1} , 1350 et 1400 cm^{-1} et entre 1000 et 1050 cm^{-1} correspondent respectivement aux vibrations d'étirement OH ou NH, CH₂, C-H, C-O et aliphatiques C-H

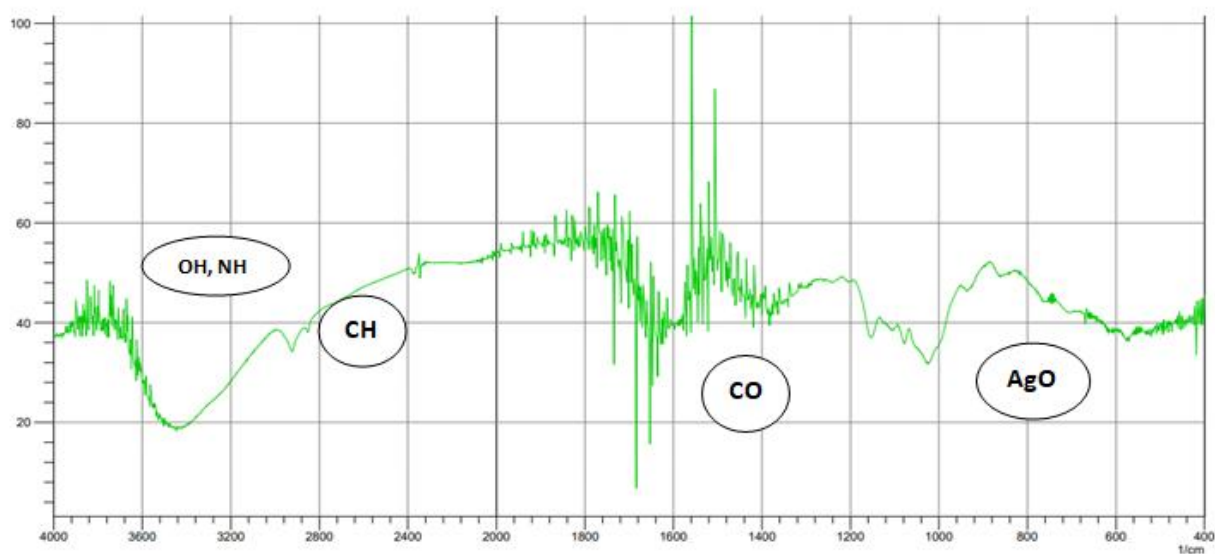


Figure 16 : Spectre infrarouge a transformé de fourrier des NPs d'Ag obtenu à partir de du surnageant de la souche BA51.

Le profil IR obtenu nous permet d'identifier

une large bande à 3440 cm^{-1} attribuée à la vibration d'étirement N-H ou O-H.

De faibles bandes entre 2880 et 2960 cm^{-1} peuvent être associées aux vibrations d'étirement C-H (Golinska et al., 2018). Une bande à entre 1000 et 1040 cm^{-1} peut être attribuée à la vibration d'étirement C-O (Golinska et al., 2018). Le pic observé vers 600 cm^{-1} est attribué à la liaison Ag-O de l'oxyde d'argent.

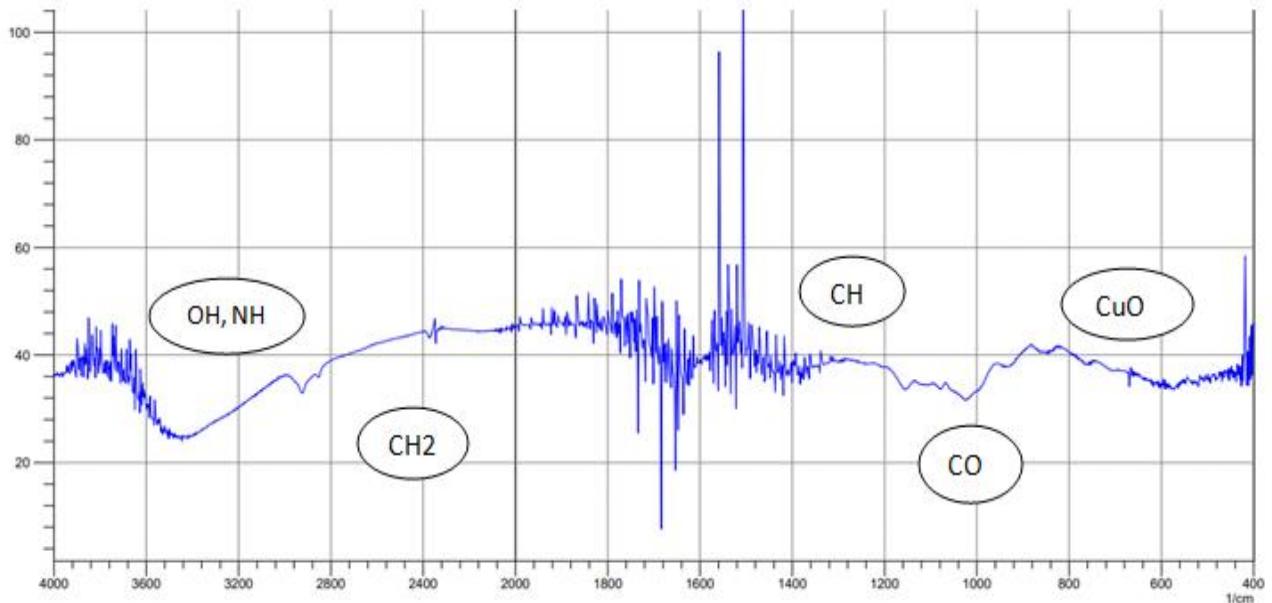


Figure 17 : Spectre infrarouge à transformé de Fourier des NPs de Cu obtenu à partir du surnageant de la souche BA51.

L'analyse FTIR des CuNPs synthétisés à partir de la souche BA51 a montré un total de quatre bandes d'absorbance entre 3200 et 3600 cm^{-1} , entre 2880 et 2960 cm^{-1} , entre 1100 - 1200 cm^{-1} et 1000 et 1040 cm^{-1} .

Les pics d'absorption à 3200 et 3600 cm^{-1} peuvent être attribués à la vibration d'étirement N-H ou O-H (Ehab et al., 2021), tandis que 2880 et 2960 cm^{-1} peuvent être associés à C-H.

Le pic entre 1100 - 1200 cm^{-1} peut correspondre aux vibrations de déformation de C-H et à 1033 cm^{-1} peut être attribué à la vibration d'étirement C-O. Un pic est observé vers 600 cm^{-1} est attribué à la liaison Cu-O de l'oxyde de cuivre.

4. Mise en évidence des activités biologiques des nanoparticules métalliques synthétisées

Afin de déterminer les activités biologiques des nanoparticules synthétisées, trois tests ont été réalisés comme suit :

4.1 Evaluation de l'activité antimicrobienne

Des concentrations de 50 µl des différents extraits sont évaluées à l'encontre de 14 germes cibles à savoir des bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que des moisissures. Les résultats sont illustrés dans les figures 18, 19, 20, 21, 22 et 23.

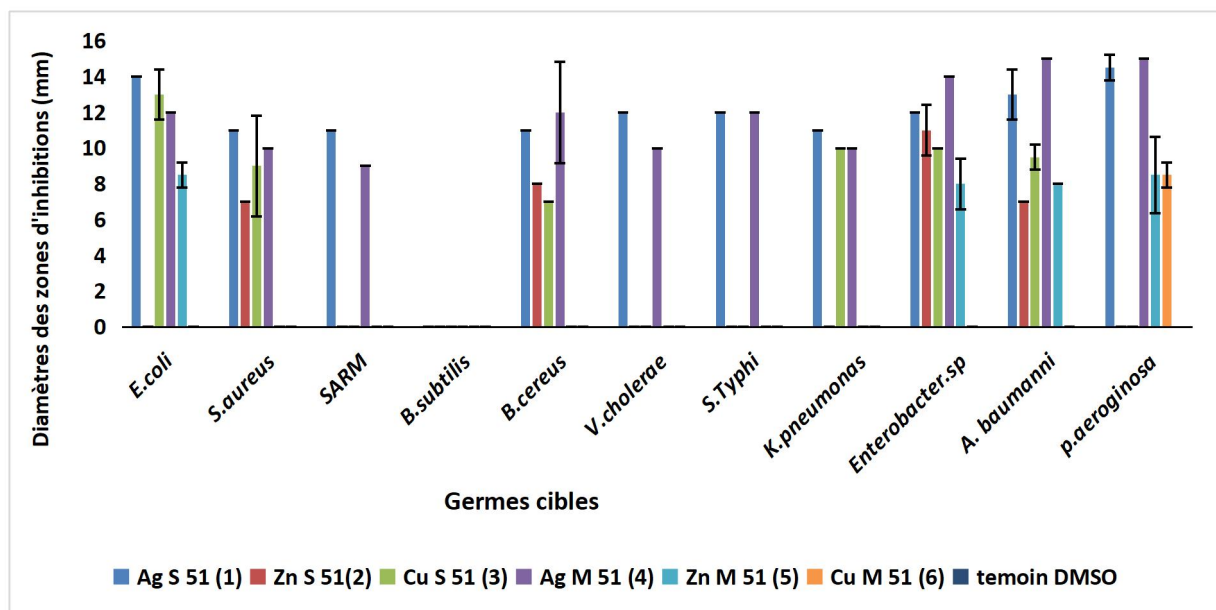


Figure 18 : Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits intra-extracellulaire de la souche BA51 contre 11 germes.

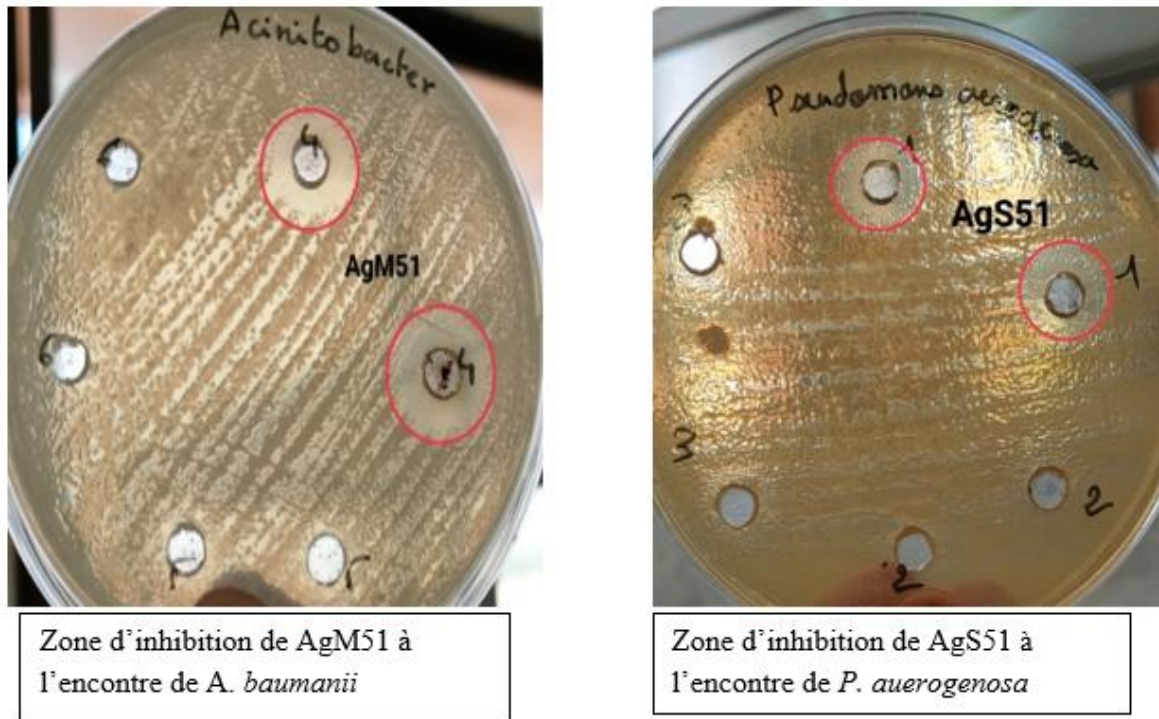


Figure 19 : Boîtes représentatives des zones d'inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA51 contre les bactéries pathogènes

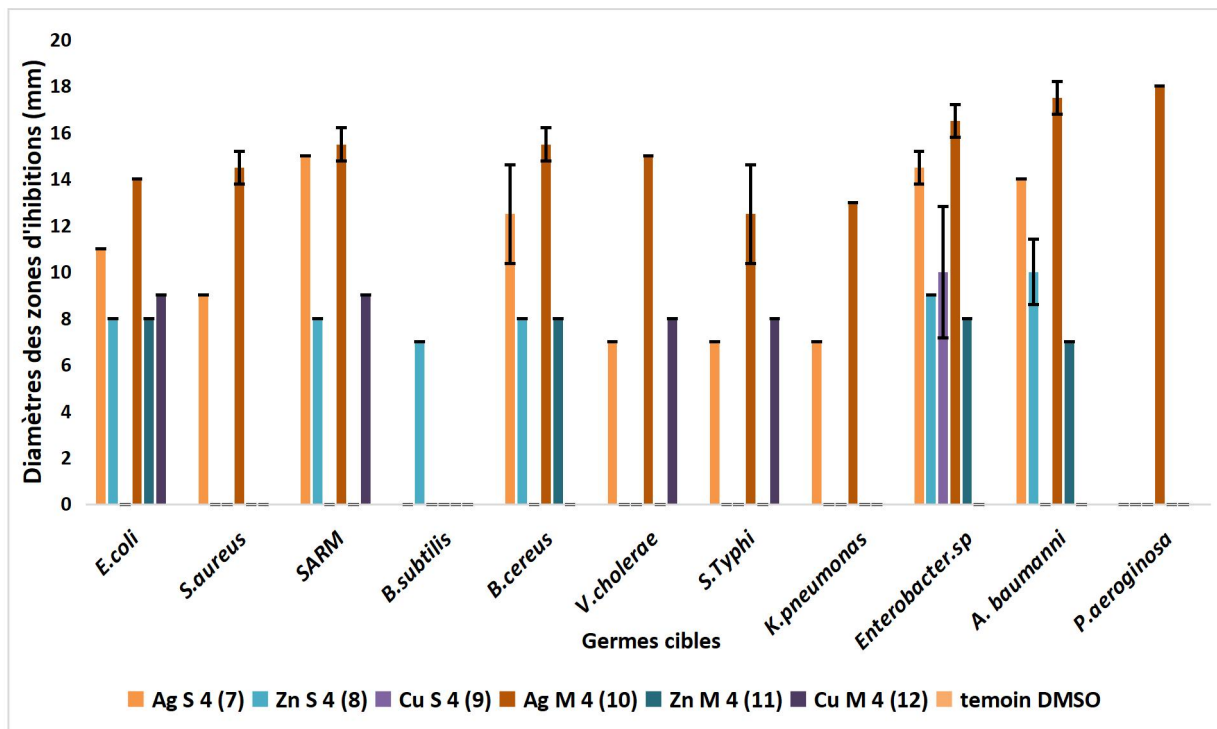


Figure 20 : Mise en évidence de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc synthétisées à partir du surnageant et de la biomasse de la souche BA4

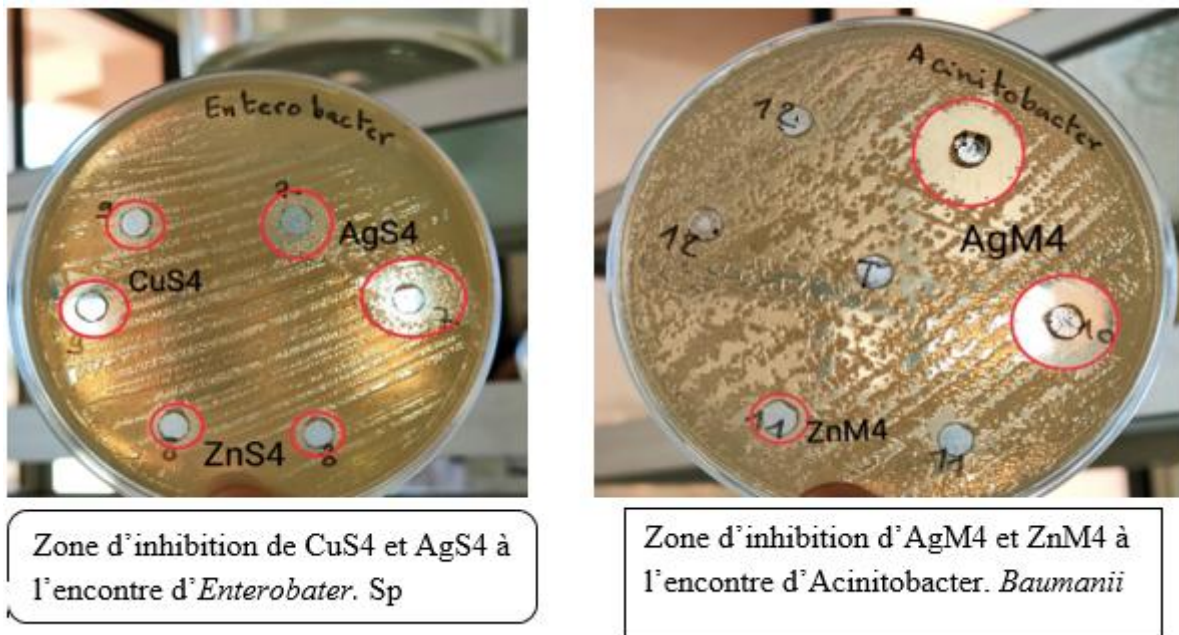


Figure 21 : Boîtes représentatives des zones d'inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA4 contre les bactéries pathogènes

Suite aux résultats illustrés dans la **figure 18 et 19**, il est clair que pratiquement l'ensemble des solutions de nanoparticules synthétisées, soit à partir du surnageant de culture ou de la biomasse de la souche BA51, ont présenté un effet antagoniste à l'égard de tous les germes cibles testés à l'exception de *B. subtilis*. En effet, un potentiel antagoniste intéressant est observé aussi bien à l'encontre de bactéries à Gram positif telles que *S. aureus*, SARM et *B. cereus* avec des zones d'inhibition atteignant 12 mm pour AgM51, que Gram négatifs telles que *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* et *Enterobacter. sp*.

De plus, nous rapportons les hauts pouvoir antibactérien des nanoparticules d'argent synthétisées à partir du surnageant et de la biomasse de la souche BA51 comparé aux autres nanoparticules métalliques testées.

Concernant l'isolat BA4, des observations similaires ont été réalisées où des effets antagonistes ont été enregistrés pour la totalité des bactéries testées. En effet, des zones d'inhibitions de diamètres variables ont été obtenues allant de 7 mm pour CuS4 à 18 mm pour AgM4 à l'égard de *B. cereus* et de *P. aeruginosa* respectivement. (**Figure 20 et 21**)

L'activité bactéricide des NPs d'Ag contre un large éventail des bactéries a été démontrée dans plusieurs études. Ce potentiel confirme la stratégie multiforme des NPs d'Ag lors du contact avec les bactéries. Le mécanisme de l'activité bactéricide des NPs d'Ag est très probablement dû à la fixation des nanoparticules à la paroi cellulaire et à la génération des

radicaux libres. De plus, la présence de NPs d'Ag dans la membrane cellulaire a été prouvée par l'étude de **Oves et al., (2018)**. Les NPs d'Ag perturbent la perméabilité membranaire en pénétrant dans la membrane cellulaire et en provoquant une fuite d'ATP intracellulaire et la mort cellulaire (**Hajipour et al., 2012 ; Hajitha et al., 2014**).

L'évaluation de l'activité antifongique à l'égard de *A. niger* et *A. flavus* ainsi que *Penicillium* sp. a permis de mettre en évidence un potentiel remarquable, essentiellement à l'égard de *A. niger*. En effet, des activités estimées de 8 mm pour le CuS4 et 20 mm pour AgS4 à l'encontre de *A. niger* alors qu'une inhibition atteignant 40 mm de diamètre a été enregistrée par la solution de nanoparticules d'argent obtenues à partir de la biomasse de la souche BA4 vis-à-vis de *Penicillium* sp. Un effet inhibiteur prononcé a également été obtenu par les nanoparticules d'argent synthétisées à partir du mycélium des deux souches étudiées (**Figure 22 et 23**)

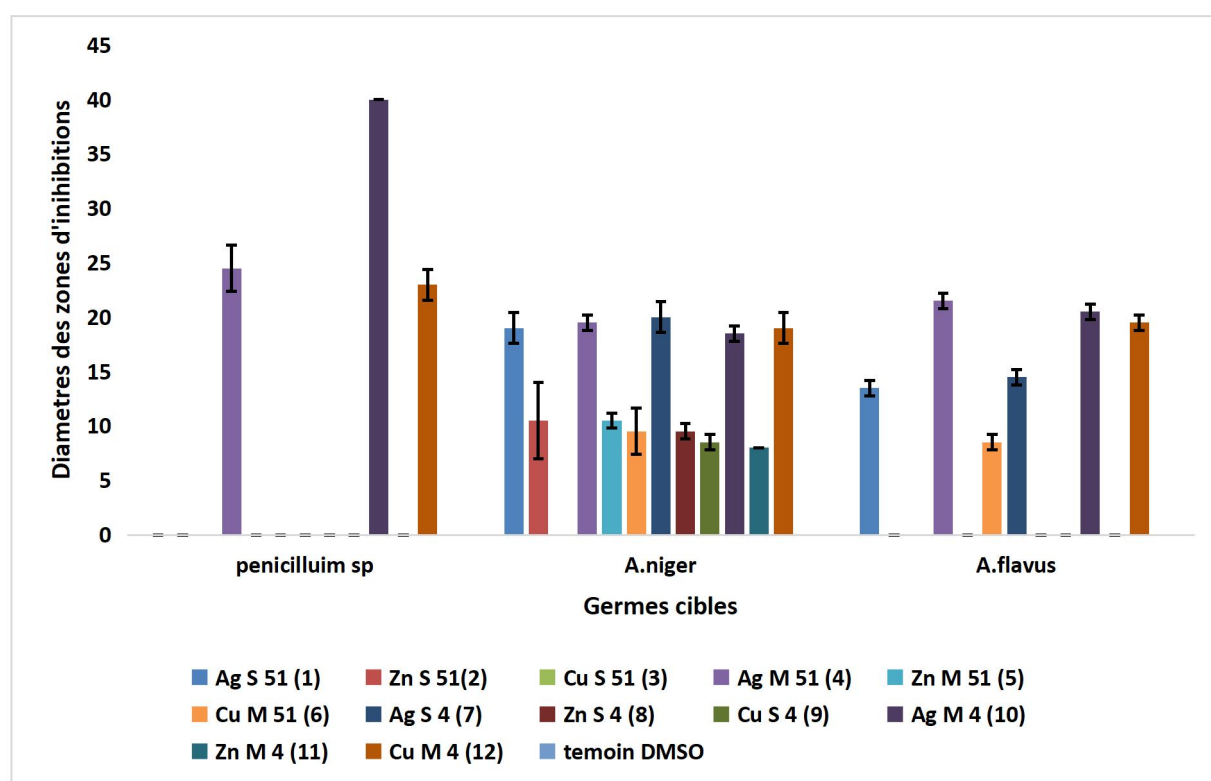


Figure 22 : Mise en évidence de l'activité antifongique des nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc synthétisées à partir du surnageants et de biomasses des souches BA51 et BA4

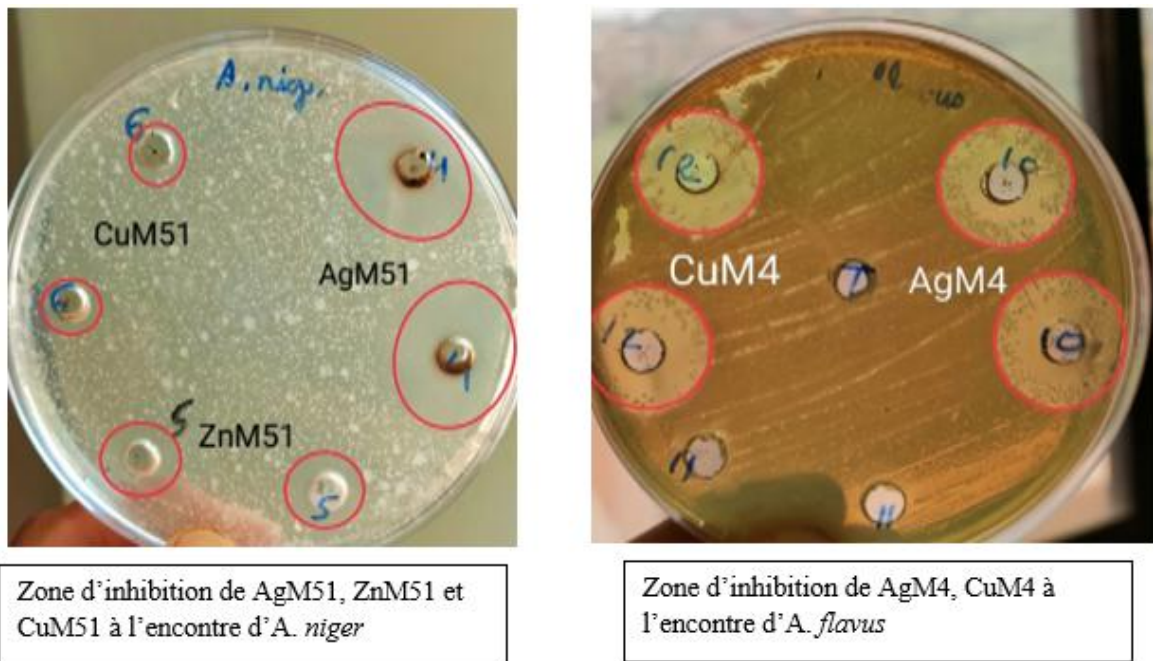


Figure 23 : Boîtes représentatives des zones d’inhibition des extraits de NPS produites à partir de la souche BA51 et BA4 contre les moisissures

8.2.Détermination de la concentration minimale inhibitrice

La détermination des CMI est déterminée suite à la lecture après incubation à 37°C/24h. Les puits qui n’ont pas présenté de croissance sont considérés comme concentration minimale inhibitrice. Les résultats du test sont rapportés sur le tableau X.

Tableau X : Concentrations minimales inhibitrices exprimées en µg/mL des solutions de nanoparticules synthétisées les plus actives.

Concentrations minimale inhibitrice en µg/ml				
Germes cibles	Ag S51	CuM4	Ag M51	Ag M4
<i>E. coli</i>	31	125	31	7.8
<i>V. cholerae</i>	31	250	62.5	15.625
<i>SARM</i>	62.5	125	125	31
<i>S Typhi</i>	31	250	31	31

D’après les résultats obtenus, il est clairement remarqué que les valeurs des CMI obtenues sont différentes en fonction des germes cibles étudiés et de l’élément métallique considéré.

La solution métallique la plus active à l'égard des 4 pathogènes est la solution de nanoparticules d'argent synthétisées à partir de la biomasse de la souche BA4. En effet, Les CMI's enregistrées sont de 7,8, 15,625, 31 et 31 $\mu\text{g/mL}$, respectivement contre *E. coli*, *V. cholerae*, SARM et *S. Typhi*. La solution de nanoparticules d'argent synthétisées à partir du surnageant de culture de BA51 vient en deuxième position avec des valeurs de CMI's allant de 31 à 62,5 $\mu\text{g/mL}$ à l'encontre du SARM.

5. Evaluation des propriétés anti oxydantes des nanoparticules

Les résultats obtenus dans le test antioxydants sont soumis a une analyse statistique par le logiciel STATISTICA (5.5). Des différences significatives entre les extraite teste montre dans des figures ci-dessous.

5.1 Evaluation de l'activité anti-radicalaire par la méthode du DPPH

Les extraits testent de NPMs ont prouvé tous une activité de piégeage du radical DPPH. Le pouvoir de piégeage du DPPH testés présente des différences significatives ($p < 0,05$).

Le virage de couleur est observé après incubation a l'obscurité, est un indicateur qui prouve y a eu piégeage du DPPH (**figure24**).



Figure 24 : Virage de couleur observé après la réaction de réduction du DPPH

Le pourcentage d'inhibition du DPPH le plus élevé a été obtenu avec l'extrait de NPs d'Ag du surnageant de BA51 et de la biomasse de BA4 suivie du surnageant de BA4 et de la biomasse de BA51 avec des valeurs de $38.77\% \pm 0.13$, $38.41\% \pm 0.34$, $26.98\% \pm 2.10$, $21.67\% \pm 0.20$ respectivement. Le pourcentage est différent par rapport l'étude faite par **Khalil**

et al. (2022), à savoir 58% d'inhibition a une concentration de 50 μ g/ml d'extrait, le seconde extrait de NPMs qui ont montré une activité inhibitrice se sont les NPMs de Cu qui ont montré une activité inhibitrice du plus élevé au moins élevé comme suit CuM51, CuS51, CuM4 CuS4 avec un pourcentage de 29.02% \pm 1.70, 27.93% \pm 0.61, 24.89% \pm 0.23 et 18.31% \pm 0.20 respectivement. Finalement l'extrait de NPMs de Zn ont montré une activité d'inhibition du DPPH du plus élève au moins élevé comme suit ZnM4, ZnM51, ZnS4 et ZnS51 avec un pourcentage de 30.34% \pm 1.76, 26.39% \pm 2.72, 19.95 % \pm 1.70 et 17.27% \pm 1.36 respectivement. Le résultat est comparable à celui obtenu par Kumar et al. (2021) qui est de 26.42% avec une concentration de 25 μ l d'extrait. (Figure25).

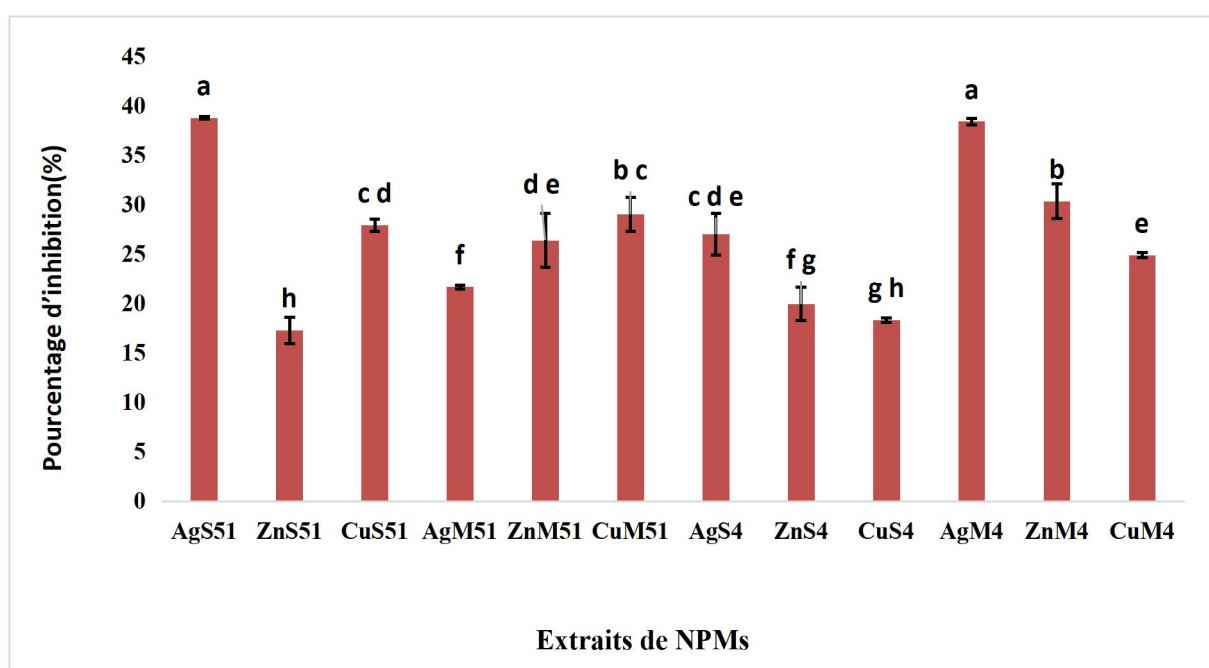


Figure 25 : Mise en évidence du pourcentage de piégeage du DPPH

5.2 Evaluation du pouvoir chélateur du fer (Annexe III figure III)

Le pourcentage d'inhibition de la formation du complexe Fe²⁺-ferrozine de chaque extraites de NPMs teste est représenté dans la **figure (26)**. L'extrait NP d'Ag issu du S51 a donné un meilleur pourcentage d'inhibition de formation du complexe Fe²⁺-ferrozine avec un pourcentage de 90% \pm 0.69 les autres extraites du plus élevé en termes de pourcentage d'inhibition son comme suite CuM51 79% \pm 0.62, ZnS5 78% \pm 0.13, CuM4 73% \pm 0.34, CuS4 61% \pm 0.96, ZnM4 52% \pm 0.13, AgM4 et M51 ont 51% \pm 0.27, CuS51 et Zn S4 ont respectivement 50% \pm 0.21 et 0.27, ZnM51 48% \pm 0.34. Et le plus faible pourcentage est enregistré pour extraite de AgS4 avec 24% \pm 0.34), à notre connaissance aucune référence en rapport avec notre étude ne permet de comparer nos résultats. La différence du pourcentage

d'inhibition est du probablement à l'élément de NPMs test et la source dont elle est issue (souche intra-extracellulaire).

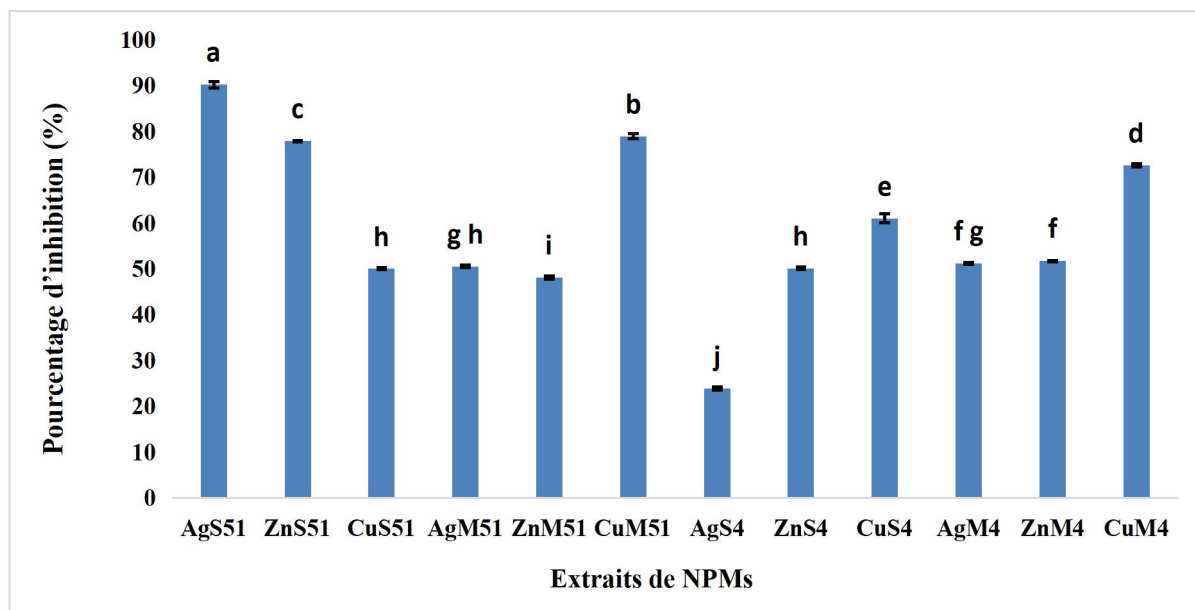


Figure 26 : Mise en évidence d'inhibition de la formation Fe^{2+} -ferrozine

5.3 Evaluation de l'activité du Pouvoir réducteur (Annexe III figure III)

Le potentiel antioxydant des extraits est estimé en utilisant la méthode de réduction au ferricyanure de potassium. La présence d'agents réducteurs dans les extraits induit la réduction des ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}). Les résultats sont représentés dans la **figure (27)**.

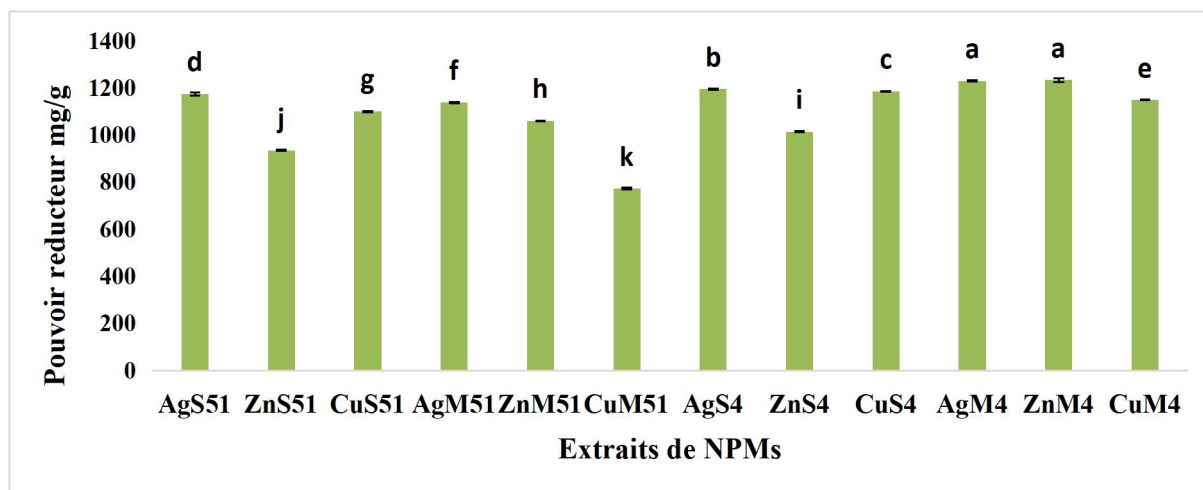


Figure 27 : Mise en évidence du résultat du pouvoir réducteur via les extraits

L'extrait qui a montré la valeur la plus élevée c'est ZnM4 ($1234,33 \pm 7,50 \text{mg/g}$) et le plus faible élément enregistré dans le teste de réduction est CuM51 ($773.03 \pm 4.73 \text{mg/g}$), à notre connaissance aucune référence en rapport avec notre étude ne permet de comparer nos résultats.

5.4 Détermination de la teneur en composés phénoliques (Annexe III figure III)

L'évaluation de la présence potentiel des composés phénolique des extraits de nanoparticule biosynthétisées est estime selon la méthode décrite par **Kahkönen et al., (1999)**.

La teneur en composés phénoliques totaux des extraits est représenté dans la **figure 28**, l'extrait le plus élevé en compose phénolique est AgM4 ($44.27 \pm 5.99 \text{mg/g}$) et la plus faible est enregistré par l'extrait de CuS51 ($7.60 \pm 2.39 \text{mg/g}$). A notre connaissance aucune référence en rapport avec notre étude ne permet de comparer nos résultats.

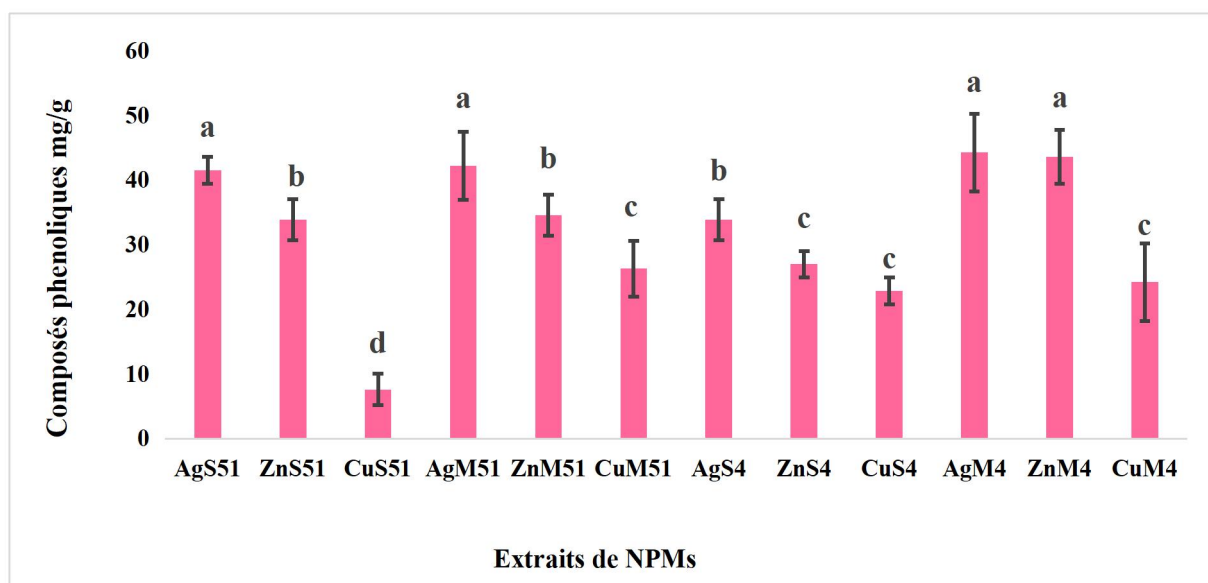


Figure 28 : Mise en évidence des composés phénoliques



CONCLUSION

L'objectif principal de cette étude est de proposer de nouvelles voies de biosynthèse des nanoparticules métalliques dans le but de remplacer l'utilisation des techniques classiques (chimique et physique) et ainsi de comparer leurs efficacités aux antibiotiques synthétisés. En effet, contrairement à la synthèse chimique, les nanoparticules obtenues à partir de systèmes biologiques tels que les champignons, les bactéries et les plantes est économique et écologique. D'autre part, le caractère unique des actinobactéries, considérées comme des micro-organismes prometteurs en raison de la production de divers métabolites secondaires attire l'attention de la communauté scientifique.

La présente étude décrit la synthèse intracellulaire et extracellulaire de nanoparticules d'argent, de cuivre et de zinc par deux souches d'actinobactéries BA4 et BA51 appartenant à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée. Les deux isolats ont fait objet, en premier lieu, de l'étude de leurs potentiels antibactériens et antifongiques à l'encontre de microorganismes pathogènes et la méthode des cylindres d'agar a permis de révéler des activités relativement moyennes à faibles.

La biosynthèse des nanoparticules à partir des surnageants de culture et des biomasses a principalement été notée par le changement de couleur des mélanges réactionnels confirmés par des maximas d'absorption à 200nm, pour AgS5(1.558), ZnS51(1.581), ZnM51 (1.170), ZnS4 (0.699), CuS4(1.261), AgM4 (4.184), ZnM4 (0.699), CuM4(1.783) et a 201nm pour CuM51 (2.337) de plus à 208nm pour l'AgM51(3.598) et a 220nm pour CuM51 (1.170) et AgS4 (2.881) dans l'UV Vis

Les biomolécules associées à la réduction, la stabilisation et le coiffage des nanoparticules synthétisées ont été déterminées par des bandes IR dans le spectre FTIR.

L'évaluation des activités antimicrobiennes des 12 poudres de nanoparticules biosynthétisées, a montré des activités antibactériennes (anti-Gram positif et négatif) et antifongiques considérables. En effet, la synthèse intracellulaire des nanoparticules d'argent issu de la biomasse de la souche BA51 et BA4 ont présenté les activités antimicrobiennes les plus importantes, notamment envers les bactéries multirésistantes, enregistrant des zones d'inhibition de 18 mm à l'encontre de *P. aeruginosa*, 17.5 mm contre *Acinetobacter baumannii* 16.5 mm contre *Enterobacter.sp*, 15.5 mm contre *SARM* et *B.cereus*, 15 mm contre *Vibrio cholerae*, 14.5mm contre *S.aureus*, 14 mm contre *E.coli* et 13 mm à l'encontre de *K.pneumonas*.

Ces résultats sont confirmés par la détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) avec des valeurs allant de 7.8 µg/ml pour AgM4 contre *E. coli*, *Vibrio Cholerae* 15.625 µg/ml, SARM, *S. Typhi* 31 µg/ml.

D'autre part, la détermination du pouvoir antioxydant des nanoparticules synthétisées à travers l'estimation de la teneur en polyphénols totaux, de l'activité chélatrice, du pouvoir réducteur et du piégeage du radical DPPH a donné des résultats prometteurs pour les nanoparticules d'argent AgS51 38% suivi de zinc ZnM4 30% et du cuivre CuM51 29% dans le piégeage de du DPPH et , le test chélateur de Fe²⁺-ferrozine 90% pour AgS51, 44.27mg/g dans le test des polyphénols totaux pour AgM4, ainsi ZnM4 qui a donné le meilleur résultat qui est de 1234.33mg/g dans le test du pouvoir réducteur .

L'ensemble des résultats de cette étude met en évidence les avantages potentiels des nanoparticules d'argent synthétisées à base de biomasses et de surnageant de culture des deux souches BA4 et BA51, qui pourrait être une alternative aux méthodes chimiques et physiques pour le développement de nouveaux produits pour des applications biomédicales.

Bien que l'objectif de notre étude soit atteint, celle-ci reste incomplète et laisse lieu à d'innombrables perspectives à envisager. On site :

- Utilisation du microscope électronique à balayage (MEB) afin de déterminer la forme et la taille des nanoparticules synthétisées.
- Etude de l'efficacité des nanoparticules contre la formation de biofilms et poursuivre la détermination des solutions restantes à l'égard des germes extraite cibles non testés.
- Application des plans d'expérience (DOE) afin de déterminer les facteurs influençant la biosynthèse de nanoparticules dans le but d'optimiser leur production.

Tester d'autres activités telle que la dégradation des colorants et des polymères plastiques



REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Anne-sophie bernard, Sylvain Clède, Matthieu Emond, Hélène Moninsoyer, Jérome Querard.(2012).techniques expérimentales en chimie classe pr epas et concours 3e édition

Abdee S. Geo2 Sukanya Praseetha P.K, Dhanya R.P.(2013). Biosynthesis of Silver nanoparticles from Actinomycetes for therapeutic applications.Intern. J. Nano dimension, 5, 155-162.

Ajitha, B., Reddy, Y. A. K., & Reddy, P. S. (2014). Biogenic nano-scale silver particles by Tephrosia purpurea leaf extract and their inborn antimicrobial activity. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 121, 164-172.

Aftab Hossain Mondal1, * Dhananjay Yadav2, * Sayani Mitra1 Kasturi Mukhopadhyay. (2020)Biosynthesis of Silver Nanoparticles Using Culture Supernatant of Shewanella sp. ARY1 and Their Antibacterial Activity. International Journal of Nanomedicine 2020:15 8295–8310.

Ahmad, Absar; Senapati, Satyajyoti; Khan, M Islam; Kumar, Rajiv; Ramani, R; Srinivas, V; Sastry, Murali (2003). Intracellular synthesis of gold nanoparticles by a novel alkalotolerant actinomycete, Rhodococcus species. 14(7), 824 828. doi:10.1088/0957-4484/14/7/323.

Ahmad, Absar; Senapati, Satyajyoti; Khan, M. Islam; Kumar, Rajiv; Sastry, Murali (2003). Extracellular Biosynthesis of Monodisperse Gold Nanoparticles by a Novel Extremophilic Actinomycete, Thermomonospora sp.. Langmuir, 19(8), 3550–3553. doi:10.1021/la026772l

Andriambelason Onja-Randriamiharisoa Herivony. (2016).selection et caracterisation de souches d'actinomycetes isolees a partir des rhizomes et du sol rhizospherique de gingembre ayant des activites biologiques comparables a celles de son huile essentielle. Thèse de Doctorat, Universite d'antananarivo. Thèse doctorats.

Anonyme1 :(https://nanotechnologie-medecine.webnode.fr/).

Ayesha Khan, Audil Rashid & Rafia Younas.(2016) A chemical reduction approach to the synthesis of copper nanoparticles. https://doi.org/10.1007/s40089-015-0163-6 .

B

BOUMARAF Ramla - KEMOUGUETTE Souaad - SELLAOUI Khadidja. (2020).

Biosynthèse des nanoparticules d'argent et applications. Université 8 Mai 1945 Guelma. Mémoire master.

D

Deka, Purbajyoti (2020). Développements nouveaux et futurs de la biotechnologie microbienne et de la bio-ingénierie : biofilms microbiens || Actinobactéries en tant que source naturelle potentielle pour produire des composés antibiofilm.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dadi Rania.(2019). Français. Synthèse de nanoparticules d'oxydes métalliques et leur activité antibactérienne. Université Paris-Nord - Paris XIII. Thèse de Doctorat.

E

Elavarasan Nagaraj1 • Kokila Karuppanan1 • Prakash Shanmugam1 • Sujatha Venugopal1. (2019). Exploration of Bio-synthesized Copper Oxide Nanoparticles Using *Pterolobium hexapetalum* Leaf Extract by Photocatalytic Activity and Biological Evaluations.

G

Golinska Patrycja, Wypij Magdalena, Ingle Avinash P, Gupta Indarchand, Dahm Hanna, Rai Mahendra. (2014). Biogenic synthesis of metal nanoparticles from actinomycetes:biomedical applications and cytotoxicity. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98:8083–8097

H

Heba Mohamed Fahmya Nashwa Moatez Ebrahim b Mohamed Hassaneen Gaber .(2020).In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126481>

Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., ... & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511.

I

Ibtissem Djinni, Warda Djoudi, Nadia Harfi, Imene Stambouli, Sara Khamtache,Djaouida Makhoulouf, Betitera Yanat, Samiha Souagui & Mouloud Kecha (2022) Enhanced Anti-E.coli ST131 Metabolites Production by a Novel *Streptomyces* sp. CMB51 Strain Isolated from a Coal Mining Soil Using Statistical Optimization, *Geomicrobiology Journal*, 39:1, 39-53, DOI:10.1080/01490451.2021.2005186

Ibtissem Djinni. (2009). Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaïa. Mémoire de Magister. Université de Bejaïa p 47.

J

J. Gross, S. Sayle, A.R. Karow, U. Bakowsky, P. Garidel. (2016) Nanoparticle tracking analysis of particle size and concentration detection in suspensions of polymer and protein samples: Influence of experimental and data evaluation parameters. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 104 pp. 30-4.

Jaison Jeevanandam, Ahmed Barhoum, Yen S. Chan1,Alain Dufresne, Michael K. Danquah. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2018, 9, 1050–1074.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Jodie Woan FeiLoi , Priyia Pusparajah, Nurul-Syakima Ab Mutalib , Sunny HeiWong Bey-Hing Goh , Learn-Han Lee.(2019). A Review on Mangrove Actinobacterial Diversity: The Roles of Streptomyces and Novel Species Discovery.

Julien Gigault.(2021) Développement de méthodes de fractionnement par couplage Flux-Force (FFF)/ Mutli-détection pour la caractérisation de nanotubes de carbone dispersés en milieu aqueux. Université de Pau et des Pays de l'Adour.

L

Linlin Wang, Chen Hu, Longquan Shao. (2017). The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *International Journal of Nanomedicine* 2017;12 1227–1249

M

M. Manimaran and K. Kannabiran.(2017). Actinomycetes-mediated biogenic synthesis of metal and metal oxide nanoparticles: progress and challenges. *Letters in Applied Microbiology* ISSN 0266-8254.

Madiha Batool¹ · Shazia Khurshid¹ · Zahid Qureshi¹ · Walid M. Daoush². (2020). Adsorption, antimicrobial and wound healing activities of biosynthesised zinc oxide nanoparticles.

Magda M. Aly, Lina A. Bahamdain and Salah Abu Aba. (2019). Unexplored Extreme Habitats as Sources of Novel and Rare Actinomycetes with Enzyme and Antimicrobial Activities. e-ISSN:2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 14, Issue 6 Ser. III (Nov –Dec 2019), PP 45-54.

Maha A. Khalil, Abd El-Raheem R. El-Shanshoury, Maha A. Alghamdi, Fatin A. Alsalmi, Samia F. Mohamed, Jianzhong Sun and Sameh S. Ali. (2022). Biosynthesis of silver nanoparticles by marine actinobacterium *Nocardioopsis dassonvillei* and exploring their therapeutic potentials. *Front Microbiol*, 3;12:705673.

Mouhamed harari. (2018) Caractérisation des souches d'actinobacteries isolées des sols arides et semi aride d'Algérie. Université Oran 1 Ahmed ben Bella. Thèse de Doctorat.

Muhammad Ovais , Ali Talha Khalil, Muhammad Ayaz , Irshad Ahmad , Susheel Kumar Nethi , et Sudip Mukherjee .(2018). Biosynthèse de nanoparticules métalliques via des enzymes microbiennes : une approche mécaniste. doi: 10.3390/ijms19124100

Muhammad Sani Usman, Ni Azowa Ibrahim, Kamyar Shameli , Norhazlin Zainuddin et Wan Md Zin Wan Yunus.(2012). Copper Nanoparticles Mediated by Chitosan: Synthesis and Characterization via Chemical Methods. *Molecules* 17(12):14928-36.

Muthusamy Sanjivkumar, Tamilselvan Silambarasan, Subburaj Ananthi, Kubendran Thanga Tharani. (2021). Biosynthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles from an

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

estuarine associated actinobacterium *Streptomyces* spp. and its biotherapeutic applications. *Arch Microbiol*, 13;204(1):17

O

Oves, M., Aslam, M., Rauf, M. A., Qayyum, S., Qari, H. A., Khan, M. S., ... & Ismail, I. M. (2018). Antimicrobial and anticancer activities of silver nanoparticles synthesized from the root hair extract of *Phoenix dactylifera*. *Materials Science and Engineering: C*, 89, 429-443

P

Plant Biotechnology : Progress in Genomic Era (pp.277-307)

R

Reshma R. Anilkumar, Lekshmi K. Edison, and N.S. Pradeep. (2020). Exploitation of Fungi and Actinobacteria for Sustainable Agriculture in Microbial Biotechnology P 155

S

Soufi Ouahiba- Maddi. (2019). Etude des effets du salage sur le profil phénolique et les propriétés antioxydantes de variétés d'olives noires. Thèse de Doctorat. P 33,40-44.

Sánchez-Sanhueza Gabriela, Fuentes-Rodríguez Daniela & B, ello-Toledo Helia .(2016). Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals. A Systematic Review. . A systematic Review. *Int. J. Odontostomat.*, 10(3):547-554, 2016.

Sapana Jadoun, Narendra Pal Singh Chauhan, Payam Zarrintaj, Mahmood Barani, Rajender S. Varma.(2021). Nanomaterials for Sustainability: A Review on Green Synthesis of Nanoparticles Using Microorganisms.revu

Sunday Adewale Akintelu a,b , Aderonke Similoluwa Folorunso c , Femi Adekunle Folorunso d , Abel Kolawole Oyebamiji b .(2020).Green synthesis of copper oxide nanoparticles for biomedical application and environmental remediation. *Revu*

T

https://www.utoronto.ca/webapps/chemistryonline/production/ir_spectroscopy.php

W

Wehling, Julia; Dringen, Ralf; Zare, Richard N.; Maas, Michael; Rezwan, Kurosch (2014). Bactericidal Activity of Partially Oxidized Nanodiamonds. *ACS Nano*, 8(6), 6475–6483. doi:10.1021/nn502230m.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Wang H., Gao,X.D.,Zhou,G.C.,Cai,L., Yao,W.B.(2008).In vitro and in vivo antioxydant activity of aqueous extract from choerospondiasaxillaris fruit.food chemistry,106(3),888-89



ANNEXES

ANNEXE I

Tableau I : Espèces végétales utilisées dans la biosynthèse des nanoparticules et leur application (Batoo et al., 2020)

Species	Metal oxide nanoparticles	Active component	Particle size and shape	Antimicrobial applications	References
<i>Glycosmis mauritania</i>	Fe ₃ O ₄	Triterpenes, eugenol	58–79 nm, spherical	<i>E. coli</i>	Isik et al. (2019)
<i>Cassia fistula</i>	ZnO	Polyphenols, flavonoid	5–15 nm, hexagonal	<i>P. aeruginosa</i>	Jamdagni (2018)
<i>Phyllanthus amarus</i>	CuO	Not mention	50 nm	<i>S. aureus</i>	Jassal et al. (2016)
<i>Aloe barbadensis</i>	ZnO	Flavanones, terpenoids	25–40 nm, spherical	<i>M. luteus</i>	Jayakumar et al. (2011)
<i>Sageretia thea</i>	Fe ₂ O ₃	Polyols	Below 100 nm	<i>B. cereus</i>	Jiang et al. (2015)
<i>Parthenium hysterophorus</i>	ZnO	Proteins	27–84 nm, hexagonal	<i>S. Typhimurium</i>	Khalil et al. (2017)
<i>Ocimum basilicum</i>	ZnO	Flavanones, terpenoids	50 nm, hexagonal	<i>S. enteritidis</i>	Khochage (2010)
<i>Solanum lycopersicum</i>	ZnO	Not mention	25 nm, hexagonal	<i>K. pneumoniae</i>	Kim et al. (2020)
<i>Camellia sinensis</i>	Fe ₂ O ₃	Carboxyl, hydroxyl, amine groups and proteins	60 nm, mesoporous	<i>P. aeruginosa</i>	Kumar et al. (2015)
<i>Sapindus mukorossi</i>	Fe ₂ O ₃	Flavonoids	Below 100 nm	<i>K. pneumoniae</i>	Maiti et al. (2017)
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i>	Cu ₄ O ₃	Phenolic compound	30–50 nm	<i>E. coli</i>	Metwally et al. (2020)
<i>Aloe barbadensis</i>	Fe ₂ O ₃	Proteins, terpenoids	20–60 nm	<i>S. aureus</i>	Mihai et al. (2019)
<i>Aloe barbadensis</i>	CuO	Carbonyl groups	15–30 nm, versatile	<i>S. epidermidis</i>	Mukherjee et al. (2016)
<i>Eucalyptus globulus</i>	Fe ₂ O ₃	Phenols and proteins	Below 100 nm	<i>E. faecalis</i>	Naeimi et al. (2015)
<i>Gum karaya</i>	CuO	Carbohydrates, proteins	7.8 nm, irregular	<i>Bacillus subtilis</i>	Nandhini et al. (2019)
<i>Hibiscus subdariffa</i>	ZnO	carboxylic acids, phenol	20–45 nm, hexagonal	<i>B. cepacia</i>	Noundou (2016)
<i>Padina pavonica</i>	Fe ₃ O ₄	Not mention	19.5–27 nm	<i>E. coli</i>	Oskam (2006)
<i>Calotropis procera</i>	ZnO	amine groups, proteins	5–40 nm, spherical, granular	<i>P. fluorescens</i>	Padil and Černík (2013)
<i>Arachis hypogaea</i>	Cu ₂ O	Phenolic compound	37 nm	<i>S. putrefaciens</i>	Petkova et al. (2014)
<i>Azadirachta indica</i>	Cu ₄ O ₃	Flavanones or terpenoids	~28–30 nm, tetragonal	<i>S. macrophilia</i>	Pitout (2012)
<i>Aloe barbadensis</i>	Cu ₄ O ₃	Phenols and proteins	30–60 nm	<i>K. pneumoniae</i>	Qiu et al. (2020)

Tableau II : Diver espèces d'algues productrices de nanoparticules (Sapana et al.,2021)

Espèces d'algues	NPs	Taille (nm)	Forme	Référence
<i>Amphiroa rigida</i>	Ag	25	Sphérique	(Gopu et al., 2021)
<i>Chara vulgaris</i>	Ag	16.99 ± 0.3	-	(Hassan et al., 2021)
<i>Tetraselmis indica</i>	ZnO	20-40	Sphérique	(Thirumoorthy et al. 2021)
<i>Padina boryana</i>	Pd	11.16	Crystal	(Sonbol et al. 2021)
<i>Macrocyctis pyrifera</i>	CuO	2-50	Sphérique	(Araya-Castro et al. 2021)
<i>Anabaena cylindrica</i>	ZnO	40-60	Tige	(Bhattacharya et al. 2020)
<i>Neodesmus pupukensis</i>	Ag,Au	5-34	Circulaire	(Omomowo et al. 2020)
<i>Portieria hornemannii</i>	Ag	-	Sphérique	(Fatima et al. 2020)
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Ag	220.8 ± 31.3	Sphérique	(Borah et al. 2020)
<i>Noctiluca scintillans</i>	Ag	4.5	Sphérique	(Elgamouz et al. 2020)
<i>Botryococcus braunii</i>	Ag	40-90	Sphérique, Cubique et Tronqué Triangulaire	(Arya et al. 2019)
<i>Ulva armoricana</i>	Ag	12.5	Sphérique	(Massironi et al. 2019)
<i>Gelidiella acerosa</i>	Au	5.81- 117.59	Sphérique	(Senthilkumar et al. 2019)
<i>Chlorella vulgari</i>	Ag	40-90	Sphérique, Cubique et Tronqué Triangulaire	(Mahajan et al. 2019)
<i>Cladophora glomerata</i>	Zn	14.39 - 37.85	Sphérique	(Abdulwahid et al. 2019)

Tableau III : Diver espèces de levure productrice de nanoparticules (Sapana et al.,2021)

Levures	Nanoparticules	Taille (nm)	Structure	Référence
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	6.72	Irrégulier	(Elnagar et al. 2021)
<i>Candida parapsilosis</i>	Au	-	-	(Krishnan et al. 2021)
<i>Pichia kudriavzevii</i> HA-NY2 et <i>Saccharomyces uvarum</i> HA-NY3	Ag	20.655 ±9.48(Ag) et 2.4 ±6.02(Ag)	Cube. Ronde	(Ammar et al. 2021)
Commercial yeast	AgCl	9-51	Sphérique	(Sivaraj et al. 2020)
Yeast extract	Ag	13.8	Sphérique	(Shu et al. 2020)
<i>Magnusiomyces ingens</i>	Se	70-90	Sphérique et quasi sphérique	(Lian et al. 2019)
<i>Ogataea polymorpha</i>	Pd	20-40	Sphérique, hexagonale	(Gayda et al. 2019)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Se	20-240	Sphérique	(Bartosiak et al. 2019)
Brewer's yeast	Pd	-	Sphérique	(Yantcheva et al. 2019)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Au	104	Polygonale où Sphérique	(Ben Tahar et al. 2019)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ag	10-60	Sphérique	(Sowbarnika et al. 2018)
<i>Rhodotorula</i> sp. strain ATL72	Ag	8.8-21.4	Sphérique et ovale	(Soliman et al. 2018)
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Au,Ag	2.22 ±0.75(Au).et 4.1 ±1.44(Ag)	Sphérique (Au), et quasi Sphérique (Ag)	(Rónavári et al. 2018)
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> KX008616	Ag	2.5-30	Sphérique	(Alamri et al. 2018)
<i>Magnusiomyces ingens</i> LH-F1	Au	20.3	Uniforme	(Qu et al. 2018)
Baker's yeast	TiO2	6.7 ±2.2	Sphérique	(Peiris et al. 2018)
<i>Candida albicans</i>	Ag	2-7.3	Sphérique	(Ananthi et al. 2018)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Au	9.99 ±1.63	Sphérique	(Shi et al. 2017)
Marine yeast	ZnO et Ag	86.27(ZnO).31.7 8Ag	Ronde	(Aswathy et al. 2017)
<i>Pichia pastoris</i>	Se et Ag	70-180	Sphérique	(Elahian et al. 2017)

Tableau IV : Diver espèces de moisissure productrice de nanoparticules (Sapana et al.,2021)

Moisissures	Nanoparticules	Taille	Structure	Référence
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ZnO	50	Hexagonale	(Sharma et al. 2021)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ag	21.49	Cube	(Konappa et al. 2021)
<i>Rhizopus oryzae</i>	CuO	20.38 ± 9.9	Sphérique	(Hassan et al. 2021b)
<i>Morchella esculenta</i>	Au	16.51	-	(Acay 2021)
<i>Aspergillus sydowii</i>	Ag	1-24	Sphérique	(Wang et al. 2021)
<i>Aspergillus flavus</i>	Cu	2-60	Sphérique	(Saitawadekar and Kakde 2020)
<i>Ganoderma lucidum</i>	Ag	15-22	Sphérique	(Aygün et al. 2020)
<i>Periconium sp.</i>	ZnO	16-78	Quasi sphérique	(Ganesan et al. 2020)
<i>Fusarium solani</i>	Au	40-45	Aiguille	(Clarance et al. 2020)
<i>Trichoderma harzianum</i>	Ag, CuO et ZnO	5-18	Sphérique	(Consolo et al. 2020)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Au	22-30	Sphérique, hexagonale	(NaimiShamel et al. 2019)
<i>Pleurotus sp.</i>	Ag	2-100	Sphérique	(Owaid 2019)
<i>Trichoderma asperellum</i>	Fe ₂ O ₃	18-32	Sphérique	(Mahanty et al. 2019)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Ag	1-50	Sphérique	(Kalyani et al. 2018)
<i>Aspergillus niger</i>	Ag	61	Sphérique	(Rayaman et al. 2018)
<i>Penicillium chrysogenum</i>	MgO	5-12	Irrégulier	(El-Sayyad et al. 2018)
<i>Pleurotus sajorcaju</i>	Ag	16.8	Sphérique	(Musa et al. 2018)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Au	2-20	Sphérique	(Vetchinkina et al. 2018)
<i>Lenzites betulina</i>	Ag	14-50	Sphérique	(Syty and Camacho 2018)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Ag	40	Sphérique	(Al-Bahrani et al. 2017)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ag	61.15±11.45	Triangle	(Silva et al. 2017)

Tableau V : Diver espèces de bactérie productrice de nanoparticules (Sapana et al.,2021)

Bactéries	Nanoparticules	Taille (nm)	Structure	Reference
<i>Enterobacter sp</i>	ZnO	33-75	Sphérique	(Ahmed et al. 2021)
<i>Bacillus subtilis</i>	Ag	2-26	Sphérique	(Yu et al. 2021)
<i>Achromobacter sp</i>	TiO ₂	2-10	Irrégulier	(Farag et al. 2021)
<i>Dietzia maris</i>	Ag	40-50	Sphérique	(Venil et al. 2021a)
<i>Pseudomonas sp.et Enterobacter</i>	Ag	63.50 ET45.81	-	(Saleh 2020)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Ag	1.23-10.80	Sphérique	(Abd El Aty and Zohair 2020)
<i>Pseudoduganella eburnea</i>	Ag	8-24	Sphérique	(Huq 2020b)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Au	40	Irrégulier	(Scala et al. 2019)
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Ag	20-100	Sphérique	(Hossain et al. 2019)
<i>Bacillus haynesi</i>	ZnO	20-100	Sphérique	(Rehman et al. 2019)
<i>Nostoc linckia</i>	Ag	5-60	Sphérique	(Vanlalveni et al. 2018)
<i>Bacillus megaterium</i>	ZnO	45-95	Tige et Forme cubique	(Saravanan et al. 2018)
<i>Streptomyces griseoruber</i>	Au	5-50	Sphérique, triangle, hexagonale	(Ranjitha and Rai 2017)
<i>Streptomyces genus</i>	Ag	160	Sphérique	(SilvaVinhote et al. 2017)
<i>Actinomycetes sp.</i>	Ag	-	-	(Thomas 2017)
<i>Streptomyces sp.</i>	Ag	11-38	Sphérique	(Gupta et al. 2017)

Tableau VI : Divers molécules bios-synthétisées par les actinobactéries (Onja., 2016)

Actinomycètes producteurs	Molécules bioactives	Références
Les agents immunostimulateurs <i>Nocardia rubra</i> <i>Streptomyces olivoreticuli</i>	Rubratin BestatinI	De boer et al., 2000 chinose et al., 2003
Les agents immunosuppresseurs <i>Streptomyces filipinensis</i> <i>Nocardia brasiliensis</i>	Pentalenolactone Brasilicardine A	Uyeda et al., 2001 Komatsu et al., 2005
Les enzymes <i>Streptomyces spp</i> <i>Streptomyces sp</i>	L- asparaginase Alpha-amylase	Saleem Basha et al., 2009 Cotarlet et al., 2010
Les bioherbicides et bioinsecticides <i>Saccharopolyspora spinosa</i> <i>Streptomyces hygrosopicus</i>	Spinosad (insecticide) Herbimycine (herbicide)	Williamson et al., 2006 Omura et al., 2006
Les agents antibactériens <i>Streptomyces griseus</i> <i>Marinispora sp</i>	Candicidine Marinomycine	Jinenez et al., 2009 Sturdiková et Sturdik, 2009
Les agents antifongiques <i>Nocardia transvalensis</i> <i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Transvalencine Blastocidine	Mukai et al., 2006 Fukunagak et al., 2008.

Tableau VII : Actinobactéries utilisées dans la biosynthèse des nanoparticules (Manimaran et Kannabiran.,2017)

Actinobactéries	Type de Nanoparticule	Référence
<i>Streptacidiphilus durhamensis</i>	Argent	Buszewski et al. (2016)
<i>Streptomyces graminofaciens</i>	Argent	Kamel et al. (2016)
<i>Streptomyces rochei</i> MHM13	Argent	Abd-Elnaby et al. (2016)
<i>Streptomyces sp.</i> VITPK1	Argent	Sanjenbam et al. (2014)
<i>Actinomycetes sp.</i>	Argent	Sunitha et al. (2013)
<i>Streptomyces sp. LK3</i>	Argent	Karthik et al. (2014)
<i>Streptomyces sp</i>	Argent	Abdeen et al. (2014)
<i>Streptomyces sp. VDP-5</i>	Argent	Singh et al. (2014)
<i>Streptomyces- MS 26</i>	Argent	Zarina and Nanda (2014)
<i>Streptomyces parvuus</i> SSNP11	Argent	Prakasham et al. (2014)
<i>Streptomyces sp. JARI</i>	Argent	Chauhan et al. (2013)
<i>Streptomyces sp.</i> HBUM171191	Manganèse	Waghmare et al. (2011)
<i>Streptomyces viridogens</i> HM10	Or	Balagurunathan et al. (2011)
<i>Rhodococcus sp</i>	Or	Ahmad et al. (2003)
<i>Streptomyces sp</i>	Zinc/cuivre	Usha et al. (2010)

Annexe II

Matériel analytique utilisé durant notre expérimentation

Autoclave (ALFA-10-Plus)

Bain-Marie

Balance analytique (RADWAG)

Etuve à 28°C, 37°C

Microscope optique (Optika B-350).

PH- mètre

Plaque agitatrice (VELP scientifica :AM4)

Vortex (VELP scientifica : ZX³)

Centrifuge (HETTECH)

Sonificateur (SONICS Vibra cell)

Spectrophotomètre (UV mini 1240 ; SHIMADZU) (UviLinde 9400)

FTIR (IRAffinity-1 SHIMADZU CORPORATION)

Presse hydraulique (SHIMADZU SSP-10A)

Bec bunsen

Béchers

Entonnoir

Erlenmeyers

Flacons

Microplaques

Annexe III

Composition des milieux de culture

I. Milieux d'isolement

I.1. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964)

- Amidon :10g
- Caséine :0,3g
- KNO₃ :2g
- K₂HPO₄ :2g
- NaCl :2g
- MgSO₄, 7H₂O :0,05g
- CaCO₃ :0,02g
- FeSO₄, 7H₂O :0,01g
- Agar :18g
- Eau distille :500mL
- Eau de mer :500mL

PH 7,2 ±0,2.

I.2. Milieu Gausse (Ivantiskaya et al., 1978)

- Amidon :10 g ;
- K₂HPO₄ :0,5 g ;
- KNO₃ :1 g ;
- MgSO₄, 7H₂O :0,5 g ;
- FeSO₄, 7H₂O :0,01 g
- Agar :18 g ;
- Eau distille :1000 mL.

PH : 7,4±0,2.

I.3. Milieu Mueller -Hinton (John Howard Mueller et Jane Hinton, 1941)

- Boite de 250g de Muller Hinton déshydraté (institut pasteur) :38g
- H₂O distille :1000mL

PH : 7,3±0,2

I.4. Milieu PCA :

- Boite de 500g de Plate count agar déshydraté(liofilchem).....23,5g
- H₂O distille :1000m

I.5. Milieu Muller -Hinton (John Howard Mueller et Jane Hinton, 1941)

- o Boite de 300g de bouillon Muller Hinton déshydraté (TM MEDIA) :21g pour 1L

I.6. Eau physiologique

- o NaCl 9g
- o H₂O distille1000ml

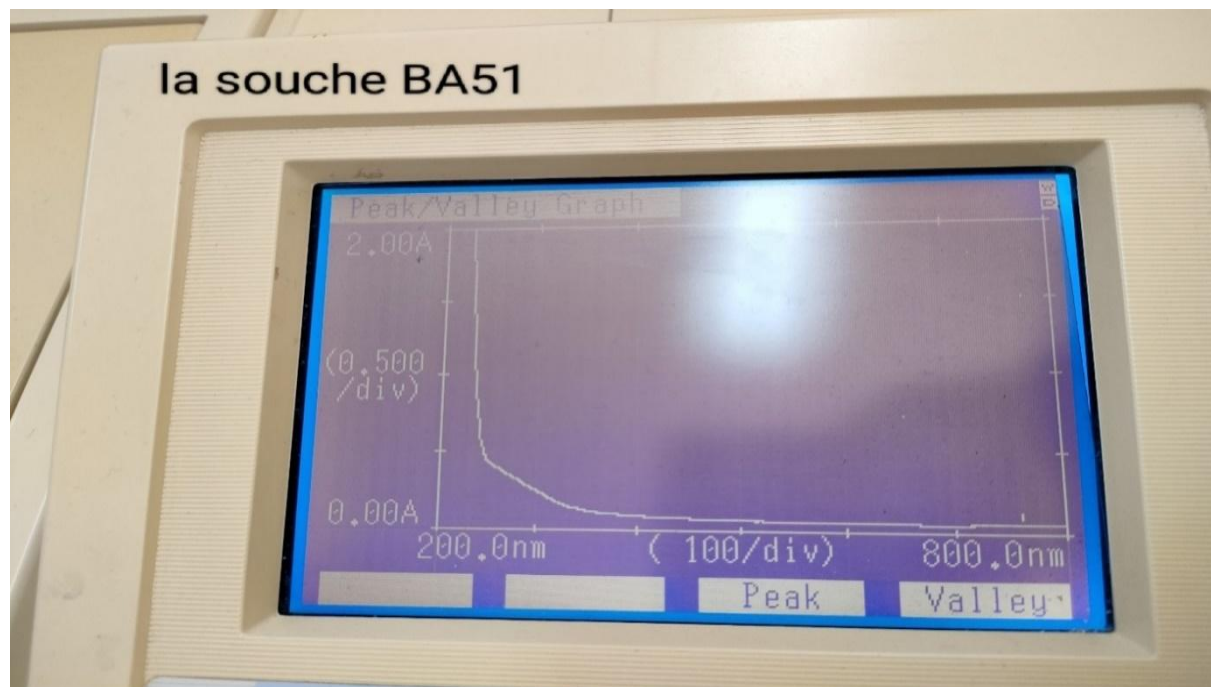
1.Spectroscopie UV/vis (Shimadzu UV mini 1240)

La spectroscopie UV/VIS est une technique très utilisée dans la caractérisation des molécules organiques ou chimiques. De l'état fondamental de la molécule vers un état excité suite au passage des ondes électromagnétiques cette modification d'état énergétique s'exprime par un déplacement d'un électron de la couche de valence plus externe à un niveau énergétique plus élevé.

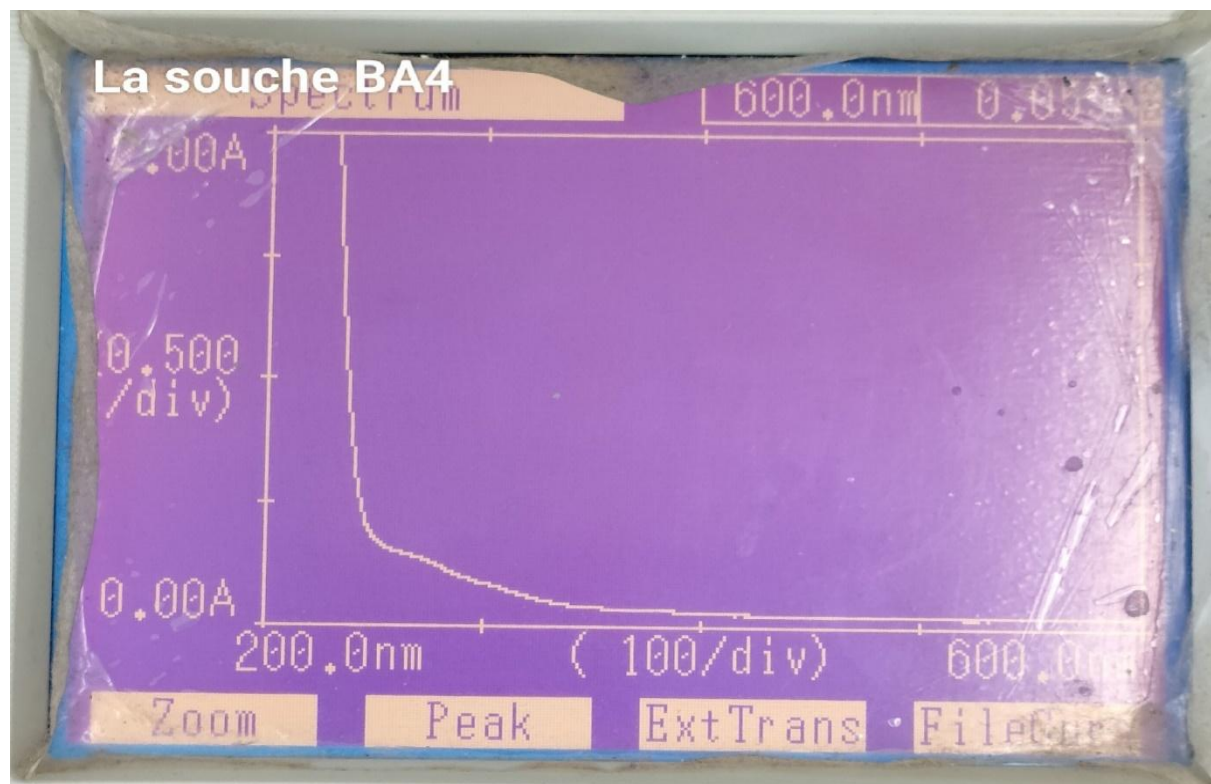


Figure I : Photographie d'un spectrophotomètre UV/VIS (Shimadzu)

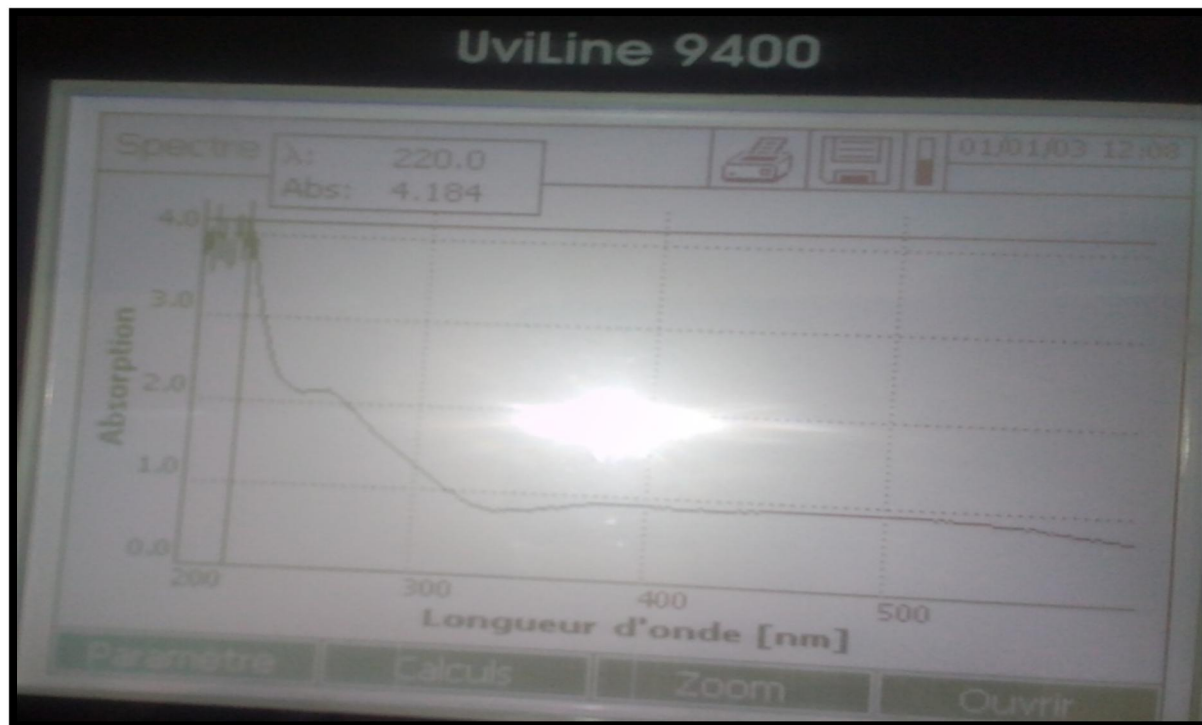
Les figures suivantes présentent les différents profils UV/Vis obtenues des différentes solutions de nanoparticules synthétisées après balayage entre 200 et 600 nm.



Pic d'absorbance 3.235 du surnageant de la BA51 à 216nm



Pic d'absorbance 3.360 du surnageant de la souche BA4 a226nm



Pic d'absorbance 4.184 du AgM4 a220nm

La spectrophotométrie infrarouge a transformé de fourier

La spectrophotométrie infrarouge est une méthode utilisée dans le but de caractériser et identifier les groupements fonctionnels des composés (Mollick et al., 2015) (Figure II).

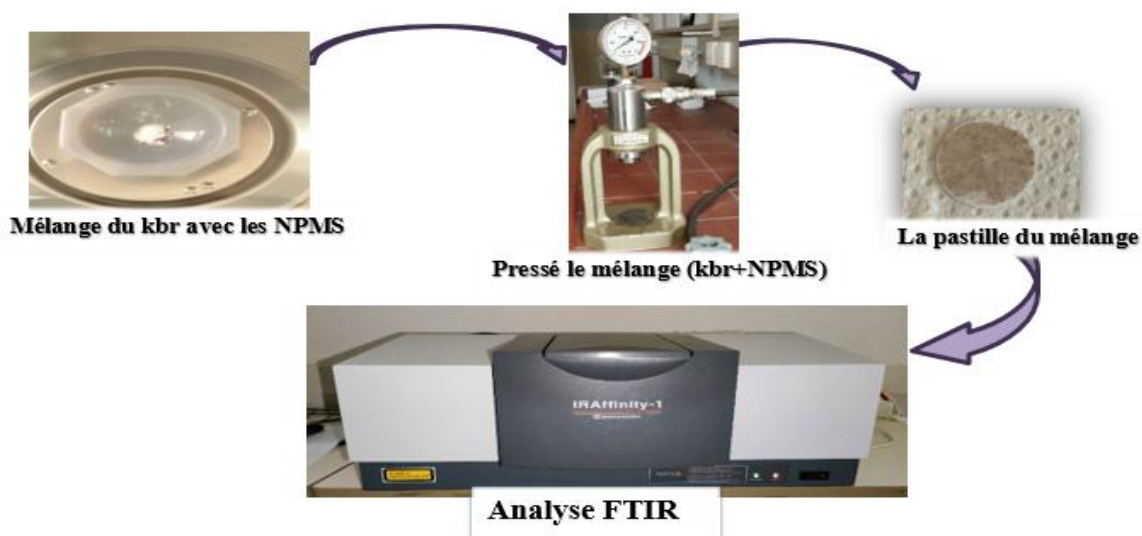


Figure II : Etapes d'une analyse FTIR



Figure III : Résultats des différents tests réalisés pour mettre en évidence les activités antioxydantes des solutions de nanoparticules

Résultats des test antagonisme

Test cylindre d'agar



Zone d'inhibition de la BA51 à l'encontre de SARM



Zone d'inhibition de la BA51 à l'encontre de *A. niger*

Figure IV : Résultats des différents zones d'inhibition pour mettre en évidence le test antagonisme cylindre d'agar

Tableau XI : Table d'Absorptions IR pour les groupes fonctionnels représentatifs

<u>aromatics</u>	C-H stretch	3020-3000
	C=C stretch	~1600 & ~1475
	C-H bend (mono)	770-730 & 715-685
	C-H bend (<u>ortho</u>)	770-735
	C-H bend (meta)	~880 & ~780 & ~690
	C-H bend (<u>para</u>)	850-800
<u>alcohols</u>	O-H stretch	~3650 or 3400-3300
	C-O stretch	1260-1000
<u>ethers</u>	C-O-C stretch (<u>dialkyl</u>)	1300-1000
	C-O-C stretch (<u>diaryl</u>)	~1250 & ~1120
<u>aldehydes</u>	C-H aldehyde stretch	~2850 & ~2750
	C=O stretch	~1725
<u>ketones</u>	C=O stretch	~1715
	C-C stretch	1300-1100
<u>carboxylic acids</u>	O-H stretch	3400-2400
	C=O stretch	1730-1700
	C-O stretch	1320-1210
	O-H bend	1440-1400
Functional Group	Molecular Motion	Wavenumber (cm⁻¹)
<u>alkanes</u>	C-H stretch	2950-2800
	CH ₂ bend	~1465
	CH ₃ bend	~1375
	CH ₂ bend (4 or more)	~720
<u>alkenes</u>	=CH stretch	3100-3010
	C=C stretch (isolated)	1690-1630
	C=C stretch (conjugated)	1640-1610
	C-H in-plane bend	1430-1290
	C-H bend (<u>monosubstituted</u>)	~990 & ~910
	C-H bend (<u>disubstituted</u> - E)	~970
	C-H bend (<u>disubstituted</u> - 1,1)	~890
	C-H bend (<u>disubstituted</u> - Z)	~700
C-H bend (<u>trisubstituted</u>)	~815	
<u>alkynes</u>	<u>acetylenic</u> C-H stretch	~3300
	C ₂ triple bond stretch	~2150
	<u>acetylenic</u> C-H bend	650-600



RESUME

Dans cette étude, des nanoparticules métalliques de Zn, d'Ag et de Cu ont été synthétisées par voie intracellulaire et extracellulaire, en utilisant deux souches d'actinobactéries, BA51 et BA4, dans des conditions douces en matière de pH, de pression et de température.

Les nanoparticules d'argent, de zinc et de cuivre synthétisées ont été caractérisées par spectroscopie UV-Vis et spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR).

Les données ont montré l'efficacité des métabolites d'actinobactéries dans la synthèse de nanoparticules à des longueurs d'onde de 200 nm pour les deux souches. De plus, l'analyse FT-IR a montré des pics d'absorption variés liés à la formation de nanoparticules.

La mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique des 12 préparations de nanoparticules a permis de révéler des activités remarquables aussi bien à l'égard des bactéries Gram positif que négatif et même à l'encontre de germes pathogènes multirésistants tels que le SRAM, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter sp.* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antifongique est également très significative notamment le AgM4 avec des inhibitions de 40, 18,5 et 20,5 mm à l'égard de *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus flavus*, respectivement. Les concentrations minimales inhibitrices ont également été déterminées pour les préparations les plus actives, révélant le AgM4 comme le plus actif avec 7,8 µg/mL à l'égard de *E. coli*, 15,625 à l'encontre de *V. cholerae* et 31 µg/mL vis-à-vis de SARM et *S. Typhi*. L'activité antioxydant des préparations a été évaluée à travers l'étude du piégeage du radical DPPH, enregistrant le pourcentage le plus important pour AgS51 avec 38.77%±0.13, alors que AgS51 a donné le meilleur pourcentage d'inhibition de formation du complexe Fe²⁺ferrozine avec un pourcentage de 90%±0.69. Par ailleurs, ZnM4 a présenté le pouvoir réducteur le plus élevé enregistrant 1234,33± 7,50mg/g. Pour finir, la teneur en composés phénoliques des préparations a révélé que l'extrait le plus riche en composés phénoliques est AgM4 avec 44.27±5.99mg/g.

Mots clés : Nanoparticules métalliques, Biosynthèses intra-extra cellulaire, Actinobactéries, Activité antimicrobienne, Activité antioxydante

Abstract

In this study, metallic nanoparticles of Zn, Ag and Cu were synthesized intracellularly and extracellularly, using two strains of actinobacteria, BA51 and BA4, under soft conditions of pH, pressure and of temperature.

The synthesized silver, zinc and copper nanoparticles were characterized by UV-Vis spectroscopy and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. The data showed the efficiency of actinobacteria metabolites in the synthesis of nanoparticles at wavelengths of 200 nm for both strains. Moreover, FT-IR analysis showed varied absorption peaks related to the formation of nanoparticles. The demonstration of the antibacterial and antifungal activities of the 12 nanoparticle preparations revealed remarkable activities against both Gram-positive and negative bacteria and even against multi-drug resistant pathogenic germs such as MRSA, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*. The antifungal activity is also very significant, especially AgM4 with inhibitions of 40, 18.5 and 20.5 mm against *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus*, respectively. Minimum inhibitory concentrations were also determined for the most active preparations, revealing AgM4 as the most active with 7.8 µg/mL against *E. coli*, 15.625 against *V. cholerae* and 31 µg/mL against MRSA and *S. Typhi*. The antioxidant activity of the preparations was evaluated through the study of the scavenging of the DPPH radical, recording the highest percentage for AgS51 with 38.77% ± 0.13, while AgS51 gave the best percentage of inhibition of the formation of the Fe²⁺ complex. Ferrozine with a percentage of 90%±0.69. On the other hand, ZnM4 presented the highest reducing power recording 1234.33± 7.50mg/g. Finally, the phenolic compounds content of the preparations revealed that the richest preparation in phenolic compounds is AgM4 with 44.27±5.99mg/g.

Keywords: Metallic nanoparticles, intracellular and extracellular biosynthesis, Actinobacteria, Antimicrobial activity, Antioxidant activity

