Machine Translated by Google

ÉDITIONS IOP NANOTECHNOLOGIE

Nanotechnologie 18 (2007) 225103 (9pp) doi:10.1088/0957-4484/18/22/225103

Caractérisation des effets antibactériens renforcés des nouvelles nanoparticules d'argent

Siddhartha Shrivastava1,5 , Tanmay Bera2,5, Arnab Roy1 , Gajendra Singh3 , P Ramachandrarao4 et Debabrata Dash1,6

[1] Département de biochimie, Institut des sciences médicales, Université hindoue de Bénarès, Varanasi-221005, Inde
[2] Département de métallurgie, Institut de technologie, Université hindoue de Bénarès, Varanasi-221005, Inde
[3] Département d'anatomie, Institut des sciences médicales, Université hindoue de Bénarès, Varanasi-221005, Inde
[4] Institut de technologie avancée de la défense, Pune-411025, Inde

Courriel : ddass@satyam.net.in

Reçu le 19 janvier 2007, sous sa forme finale le 14 février 2007 Publié le 4 mai 2007
En ligne sur stacks.iop.org/Nano/18/225103

Résumé

Dans la présente étude, nous rapportons la préparation de nanoparticules d'argent de 10 à 15 nm présentant une stabilité accrue et une activité antibactérienne renforcée. La morphologie des nanoparticules a été caractérisée par microscopie électronique à transmission. L'effet antibactérien des nanoparticules d'argent utilisées dans cette étude s'est avéré bien plus puissant que celui décrit dans les rapports précédents. Cet effet était dose-dépendant et était plus prononcé contre les bactéries Gram-négatives que contre les organismes Gram-positifs.
Bien que la lyse des cellules bactériennes puisse être l'une des raisons de la propriété antibactérienne observée, les nanoparticules modulaient également le profil de phosphotyrosine des peptides bactériens putatifs, ce qui pourrait ainsi affecter la transduction du signal bactérien et inhiber la croissance des organismes.

1. Introduction

La nanotechnologie implique l'adaptation de matériaux à l'échelle atomique pour obtenir des propriétés uniques, qui peuvent être manipulées de manière appropriée pour les applications souhaitées [1]. La plupart des processus naturels se déroulent également à l'échelle nanométrique.
Par conséquent, une confluence de nanotechnologie et de biologie peut résoudre plusieurs problèmes biomédicaux et peut révolutionner le domaine de la santé et de la médecine [2]. La nanotechnologie est actuellement utilisée comme outil pour explorer les voies les plus obscures des sciences médicales de plusieurs manières, comme l'imagerie [3], la détection [4], l'administration ciblée de médicaments [5] , les systèmes d'administration de gènes [6] et les implants artificiels [7]. Par conséquent, les particules organiques et inorganiques de taille nanométrique suscitent une attention croissante dans les applications médicales [8] en raison de leur aptitude à la fonctionnalisation biologique.
Basés sur une efficacité accrue, les médicaments de la nouvelle génération sont nanoparticules de polymères, de métaux ou de céramiques, qui peuvent combattre des maladies comme le cancer [9] et combattre des agents pathogènes humains comme les bactéries [10–14].

L'argent est connu depuis longtemps pour son effet désinfectant et a trouvé des applications dans la médecine traditionnelle et l'art culinaire. Plusieurs sels d'argent et leurs dérivés sont utilisés commercialement comme agents antimicrobiens [15]. Ainsi, les nanoparticules d'argent ont été étudiées avec pertinence pour leurs propriétés antibactériennes [11–14].

Des efforts louables ont été faits pour explorer cette propriété à l'aide de la microscopie électronique, qui a révélé une interaction dépendante de la taille des nanoparticules d'argent avec les bactéries [13].
Les nanoparticules d'argent ont ainsi été étudiées comme support d'administration d'antibiotiques [16] et pour synthétiser des composites destinés à être utilisés comme filtres désinfectants [17] et matériaux de revêtement [18]. Cependant, la propriété bactéricide de ces nanoparticules dépend de leur stabilité dans le milieu de croissance, car cela confère un temps de rétention plus long pour l'interaction bactérie-nanoparticule.

[5] Ces deux auteurs ont contribué de manière égale.
[6] Auteur à qui toute correspondance doit être adressée.

 © 2007 IOP Publishing Ltd Imprimé au Royaume-Uni

Machine Translated by Google

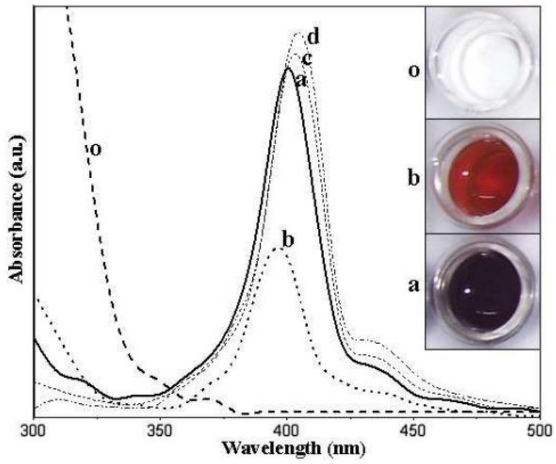

Figure 1. Spectres d'absorption UV–visible à différentes étapes de la réduction des ions argent en nanoparticules d'argent et après différents temps de vieillissement. Les images en médaillon montrent les changements de couleur avant (o), pendant (b) et après le processus de réduction (a). Les spectres conservent ce profil même après 15 jours (c) et un mois (d) de conservation dans des conditions ambiantes.

Le défi majeur est de préparer des nanoparticules d'argent suffisamment stables pour limiter considérablement la croissance bactérienne.

Dans la présente étude, nous présentons la synthèse de nanoparticules d'argent hautement stables, dotées d'importantes propriétés antibactériennes. Des études ont été menées sur des souches de bactéries Gram-négatives résistantes et non résistantes aux antibiotiques, ainsi que sur une souche non résistante de bactéries Gram-positives. Une souche de bactéries Gram-négatives multirésistantes a également été analysée afin d'examiner l'effet antibactérien des nanoparticules. Des efforts ont été déployés pour comprendre le mécanisme moléculaire sous-jacent à ces actions antimicrobiennes. L'effet des nanoparticules s'est avéré significativement plus prononcé sur les souches Gram-négatives, qu'elles soient résistantes ou non, que sur les organismes Gram-positifs. Nous avons observé un effet antibactérien similaire à des concentrations d'argent cinq fois supérieures.

moins que dans les cas précédemment rapportés [11]. Nous attribuons cet effet antibactérien renforcé des nanoparticules à leur stabilité dans le milieu en tant que colloïde, qui module le profil de phosphotyrosine des protéines bactériennes et arrête la croissance bactérienne.

2. Détails expérimentaux

2.1. Matériaux

Quatre souches bactériennes, à savoir Escherichia coli (ATCC 25922), Staphylococcus aureus (ATCC 25923), ampicilline-

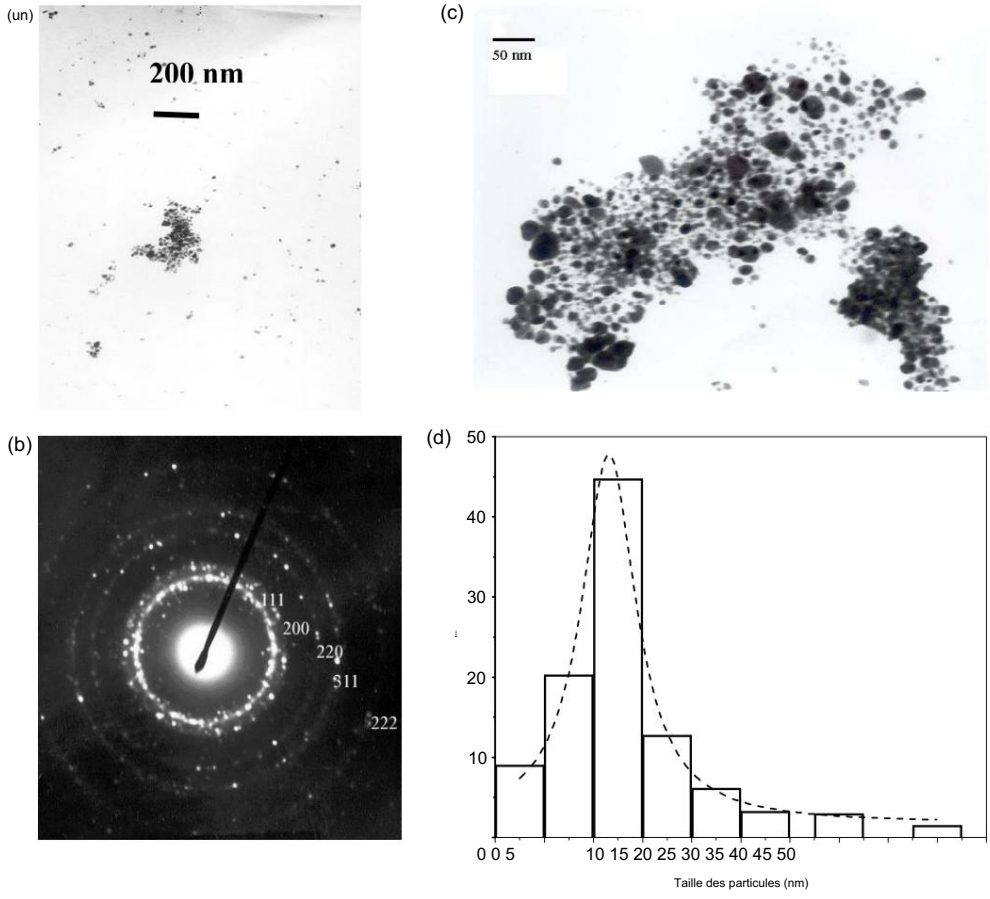

Figure 2. Micrographies TEM montrant des nanoparticules d'argent sphériques et le motif SAED. (a) Nanoparticules d'argent monodispersées et agglomérées ; (b) le motif de diffraction des nanoparticules ; (c) un grossissement plus élevé de l'amas révèle des nanoparticules d'argent sphériques ; (d) distribution granulométrique montrant la plupart des particules dans la gamme de tailles de 10 à 15 nm.

Machine Translated by Google

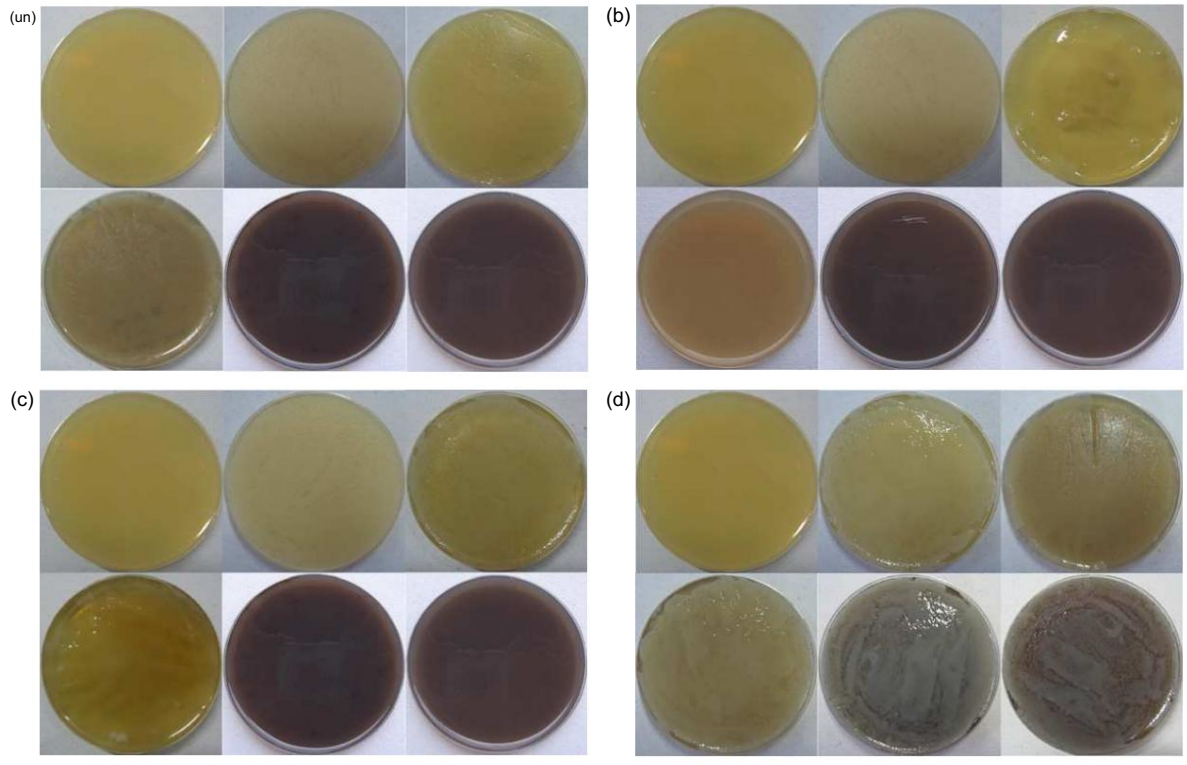

Figure 3. Bactéries cultivées sur des plaques d'agar à différentes concentrations de nanoparticules d'argent. (a) E. coli ; (b) E. coli résistant à l'ampicilline ; (c) S. typhi multirésistant aux médicaments ; (d) S. aureus. Dans chaque figure, les concentrations de nanoparticules d'argent sont les suivantes : en haut au milieu, 0 µg ml−1 ; en haut à droite, 5 µg ml−1 ; en bas à gauche, 10 µg ml−1 ; en bas au milieu, 25 µg ml−1 ; en bas à droite, 35 µg ml−1 . Plaque supérieure gauche, gélose sans nanoparticules et sans inoculation bactérienne.

Escherichia coli résistant et une souche multirésistante de Salmonella typhus, résistante au chloramphénicol, à l'amoxycilline et au triméthoprime, ont été soumis à cette analyse. Les composants du milieu Luria-Bertani (LB) et les différents antibiotiques utilisés dans l'étude ont été fournis par HiMedia Laboratories, en Inde. L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre la phosphotyrosine (clone 4G10) et l'anticorps secondaire anti-souris marqué à la peroxydase de raifort ont été obtenus respectivement auprès d'Upstate Biotechnology, aux États-Unis, et de Bangalore Genei, en Inde. Le kit de dosage des protéines BCA provenait de Novagen, aux États-Unis, les membranes PVDF de Bio-Rad, aux États-Unis, et le kit de chimioluminescence améliorée de Pierce, aux États-Unis.

Des réactifs de qualité analytique de Merck India Ltd. et de Qualigens Fine Chemicals (Inde) ont été utilisés pour la synthèse des nanoparticules d'argent. De l'eau déionisée de qualité Milli-Q (Millipore) a été utilisée pour la préparation des solutions.

2.2. Synthèse de nanoparticules d'argent

Une solution d'ions argent à 0,01 M a été préparée en dissolvant 0,017 g d'AgNO3 dans 100 ml d'eau déionisée. Au cours du procédé, des additifs tels que l'ammoniac (30 %) ont été ajoutés goutte à goutte, permettant aux ions argent de former un complexe soluble stable. La solution obtenue a servi de précurseur aux nanoparticules d'argent. Un mélange d'agents réducteurs tels que le D-glucose et l'hydrazine a été utilisé lors de la synthèse des nanoparticules.
Le mélange était essentiel pour contrôler le taux de réduction de manière à obtenir un taux optimal. Un taux de réduction plus élevé avait été Il a été démontré qu'ils formaient des amas de nanoparticules d'argent à stabilité réduite [11]. Environ 110 ml d'un tel mélange d'agents réducteurs (à une concentration de 0,01 M) ont été incorporés dans 100 ml de solution mère de nitrate d'argent (0,01 M) sous agitation continue. Cela a assuré la réduction complète des ions argent pour former des nanoparticules d'argent à une concentration de 0,005 M en milieu aqueux. Le pH des nanoparticules ainsi formées a été maintenu à 7,4 avec de l'acide citrique (1 M). Les solutions brunes de nanoparticules d'argent ont été conservées dans des flacons en verre fermés à température ambiante pour de futures expériences.

2.3. Caractérisation des nanoparticules d'argent

Pour vérifier la réduction des ions argent, la solution a été scannée dans la plage de 200 à 600 nm dans un spectrophotomètre (Pharmacia Biotech) à l'aide d'une cuvette en quartz avec de l'eau comme référence.
La taille et la morphologie des nanoparticules ont été analysées au microscope électronique à transmission (JEOL 200C×). L'échantillon a été préparé en déposant une goutte de nanoparticules d'argent sur une grille de cuivre recouverte de carbone, puis en la séchant à l'air libre, avant de la transférer au microscope fonctionnant à une tension accélérée de 120 kV. La stabilité des nanoparticules a été examinée en les exposant aux conditions ambiantes pendant quatre semaines, puis en les centrifugant (Plasto Crafts) à 15 000 g pendant 15 min à température ambiante afin d'exclure la formation de précipités au fil du temps.
La couleur et le pH de la solution ont également été vérifiés à intervalles réguliers, ce qui n'a montré pratiquement aucun changement.

Machine Translated by Google

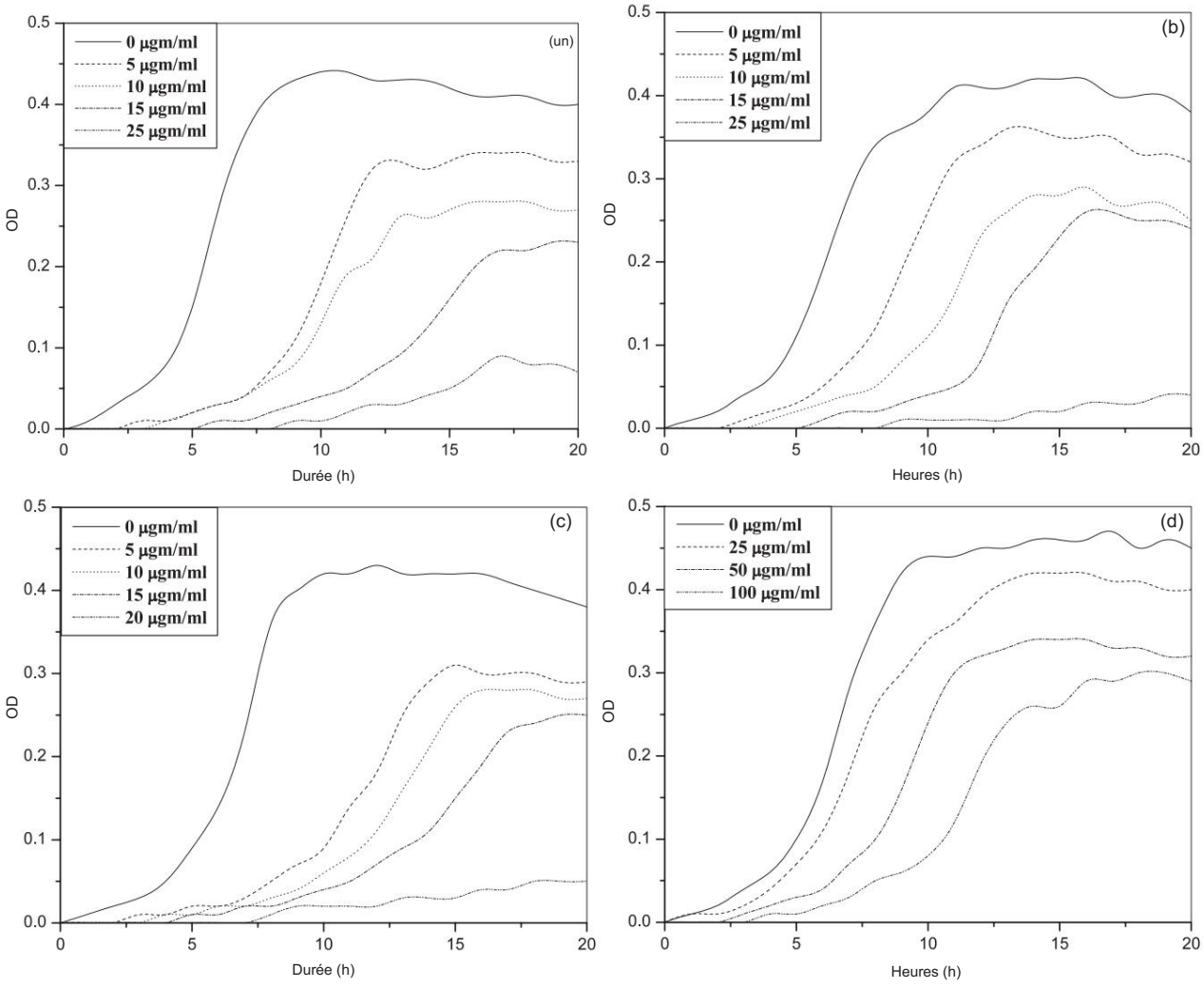

Figure 4. Courbe de croissance dynamique bactérienne dans les milieux LB à différentes concentrations de nanoparticules d'argent. (a) E. coli ; (b) E. coli résistant à l'ampicilline ; (c) S. typhi multirésistant aux médicaments ; (d) S. aureus.

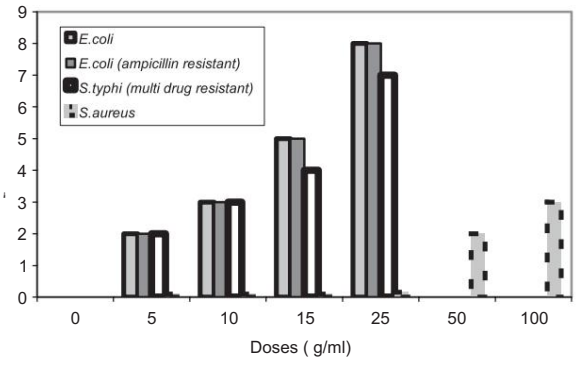

Figure 5. Phase de latence dans la courbe de croissance bactérienne à différentes concentrations de nanoparticules d'argent.

2.4. Analyse de l'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent

L'effet des nanoparticules d'argent sur les bactéries Gram-négatives et Gram-positives a été étudié en cultivant les organismes sur des plaques d'agar LB (106 unités formant des colonies (UFC) de (chaque souche par plaque) supplémentée avec des nanoparticules à des concentrations de 5, 10, 25 ou 35 µg ml−1. Des plaques sans nanoparticules d'argent ont été utilisées comme témoins. Les plaques ont été incubées pendant 24 h à 37 ◦C et le nombre de colonies a été compté. Les comptages sur trois plaques correspondant à un échantillon particulier ont été moyennés.

Pour étudier la croissance des bactéries dans un bouillon liquide, des inoculations ont été effectuées à partir de colonies fraîches sur des plaques d'agar dans 100 ml de milieu de culture LB. La croissance a été laissée jusqu'à ce que la densité optique atteigne 0,1 à 600 nm (une DO de 0,1 correspond à une concentration de 108 UFC ml−1 de milieu). Par la suite, 2 × 108 UFC ci-dessus ont été ajoutées à 100 ml de milieu liquide LB supplémenté de 5, 10, 15 ou 25 µg ml−1 de nanoparticules d'argent. Des bouillons témoins ont été utilisés sans nanoparticules. Des antibiotiques (ampicilline, 100 µg ml−1 ; kanamycine, 25 µg ml−1 ; chloramphénicol, 32 µg ml−1 ; triméthoprime, 16 µg ml−1 ; amoxyciline, 40 µg ml−1) ont été ajoutés à différents milieux selon les besoins. Le taux de croissance a été déterminé en mesurant la densité optique à 600 nm à intervalles réguliers. Afin de mieux définir l'effet des nanoparticules d'argent sur les bactéries à Gram positif, S. aureus a été exposé à des doses plus élevées de nanoparticules d'argent (50 et 100 µg ml−1) et la croissance a été étudiée.

Machine Translated by Google

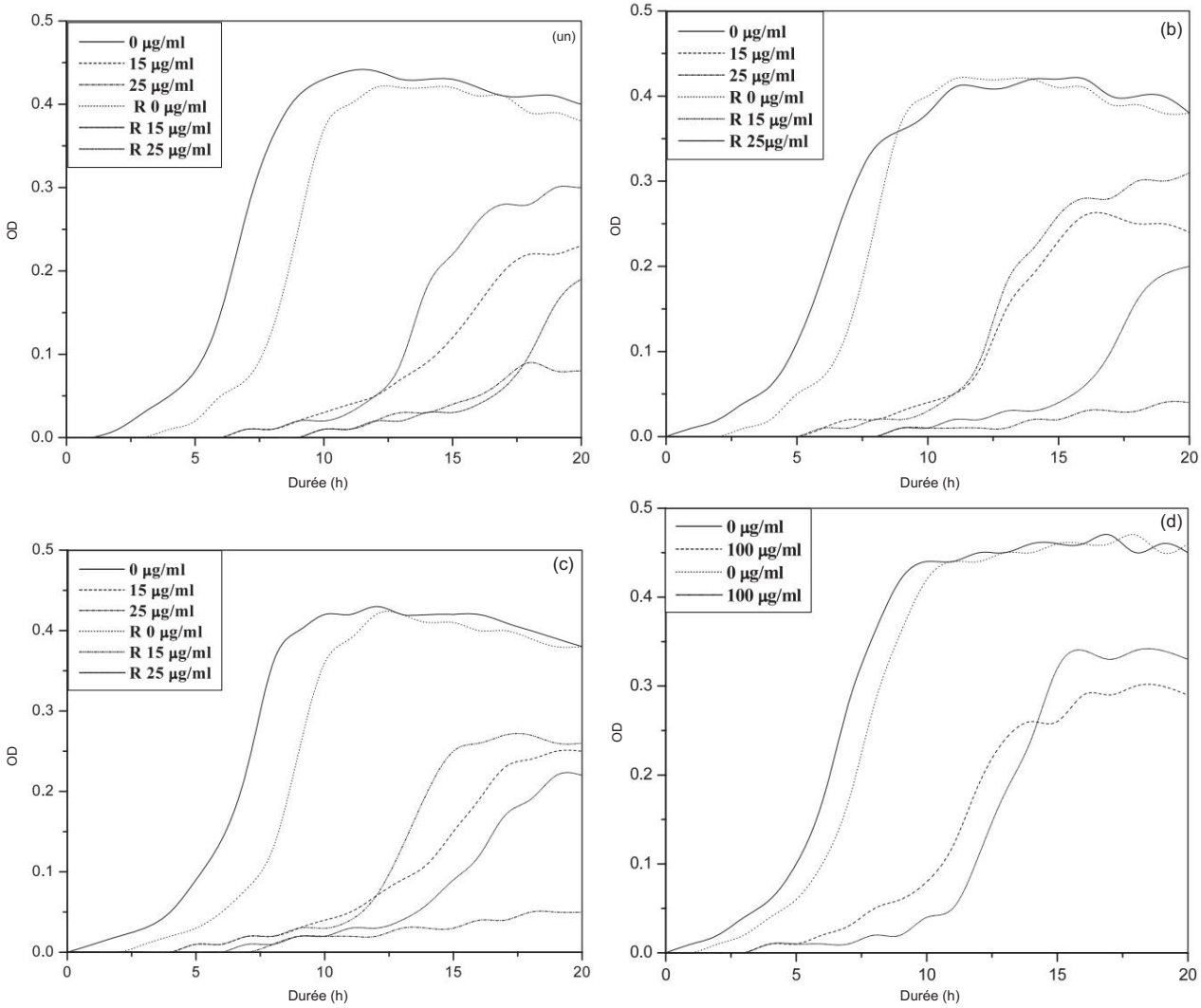

Figure 6. Courbe de croissance dynamique bactérienne dans les milieux LB après sédimentation et remise en suspension des bactéries. (a) E. coli ; (b) E. coli résistant à l'ampicilline ; (c) S. typhi multirésistant aux médicaments ; (d) S. aureus.

Dans d'autres expériences, l'interaction entre les bactéries et les nanoparticules d'argent a été étudiée en cultivant les cellules dans du milieu LB pendant 60 min en présence de nanoparticules, puis en sédimentant les bactéries et en les replantant dans du milieu frais (sans nanoparticules).

2.5. Analyse du profil de phosphotyrosine des protéines bactériennes

Pour étudier l'effet des nanoparticules d'argent sur la transduction du signal bactérien, des souches de bactéries ont été cultivées séparément dans 100 ml de milieu LB, supplémenté sans ou avec des concentrations variables de nanoparticules d'argent, jusqu'à ce que la DO (à 600 nm) atteigne 0,1. Les cellules ont été collectées par centrifugation à 5000 g pendant 5 min à 4 ◦C et ont été remises en suspension dans 10 ml de PBS réfrigéré supplémenté en orthovanadate de sodium (3 mM). Après 15 min d'incubation dans la glace, les cellules ont été lysées par sonication (50 W pendant 10 s, total de sept cycles) et centrifugées à 10 000 g pendant 5 min à 4 ◦C. Le surnageant a été bouilli avec du tampon de lyse de Laemmli et stocké à −20 ◦C.

Environ 60 ng de protéines bactériennes ont été analysées sur des gels de polyacrylamide–SDS à gradient de 10 à 18 % et électrotransférées sur membrane PVDF. Après blocage avec 5 % de BSA, les membranes ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps monoclonal anti-phosphotyrosine (clone 4G10) (dilution 1:100).

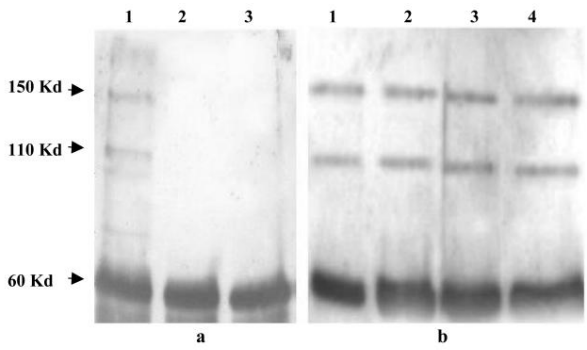

Figure 7. Profil des protéines phosphorylées sur tyrosine obtenues à partir d' E. coli (a) et de S. aureus (b). Dans les différentes pistes, les concentrations de nanoparticules d'argent sont les suivantes : piste 2 : 10 µg ml−1 ; piste 3 : 25 µg ml−1 ; piste 4 : 50 µg ml−1 · La voie 1 est sans nanoparticules.

Machine Translated by Google

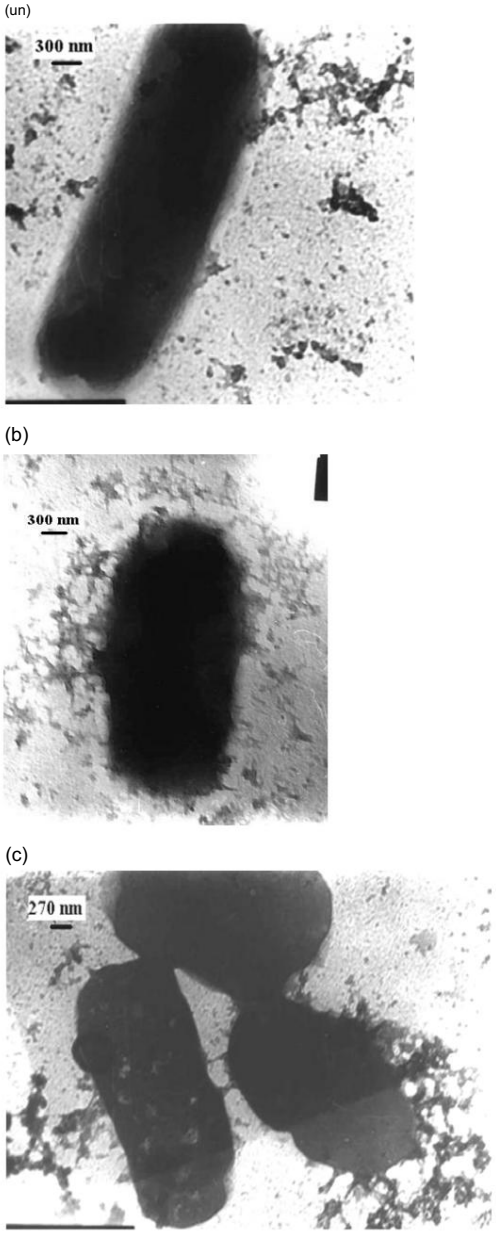

Figure 8. Microphotographies TEM montrant différentes étapes d'interaction des nanoparticules d'argent avec E.coli.

suivi d'une incubation d'une heure avec une IgG anti-souris conjuguée à la peroxydase (dilution 1:5000). Les signaux ont été visualisés par chimioluminescence améliorée.

3. Résultats et discussion

3.1. Cinétique de réduction et morphologie des nanoparticules d'argent

La réduction des ions argent était visiblement mise en évidence par les changements de couleur qui lui étaient associés. La figure 1 présente les spectres d'absorption UV-visible à différentes étapes de la réduction des précurseurs, lors de leur transformation en nanoparticules d'argent, et après différents temps de vieillissement lors de leur conservation sous atmosphère protectrice. Conditions ambiantes. Les images en médaillon montrent les changements de couleur avant (o), pendant (b) et après le processus de réduction (a). La solution de nitrate d'argent a montré un pic à environ 300 nm, qui a progressivement subi un décalage vers le rouge avec l'apparition d'une bosse à 400 nm, compatible avec la formation de nanoparticules d'argent.

Le pic prononcé à 400 nm peut être attribué à une distribution granulométrique étroite des particules formées dans la solution. Comme le montre la figure 1, les particules n'ont pratiquement pas changé de spectre d'absorption, même après un mois de vieillissement, ce qui témoigne de la grande stabilité des nanoparticules.

Français La vitesse de réaction a été optimisée pour produire des nanoparticules d'argent partiellement monodispersées de taille et de forme uniformes, comme le montre la micrographie électronique de la figure 2(a). Le diagramme de diffraction électronique à surface sélectionnée (SAED) obtenu à partir des nanoparticules représentait de l'argent ayant une structure cristallographique cubique à faces centrées (fcc) . Les différents plans de diffraction ont été indexés comme le montre la figure 2(b). La figure 2(c) montre un amas de nanoparticules d'argent à plus fort grossissement. Les particules se sont avérées être de forme sphérique ou polyédrique, avec une taille moyenne d'environ 10–15 nm. Cette forme polyédrique pourrait être attribuée à la vitesse de réaction contrôlée, entraînant la formation initiale d'un noyau et sa croissance ultérieure. La figure 2(d) représente le tracé de la distribution des tailles, suggérant que la plupart des particules étaient conformes à la plage de tailles de 10–15 nm.

3.2. Effet des nanoparticules d'argent sur la croissance bactérienne

Des plaques d'agar LB incorporant des concentrations croissantes de nanoparticules d'argent ont été inoculées avec 106 UFC provenant de différentes souches bactériennes. Dans le cas d' E. coli non résistant

Une inhibition de 60 % de la croissance bactérienne a été observée dans les plaques supplémentées avec 5 µg ml−1 de nanoparticules. L'ampleur de l'inhibition a augmenté à 90 % dans les plaques avec 10 µg ml−1 de nanoparticules, tandis que la concentration de 25 µg ml−1 a assuré une inhibition complète de la croissance bactérienne (figure 3(a)).

Français Dans le cas d' E. coli résistant à l'ampicilline et de souches multirésistantes de S. typhi, une inhibition de 70 à 75 % de la croissance a été observée dans les plaques supplémentées avec 10 µg ml−1 de nanoparticules, tandis qu'une concentration de 25 µg ml−1 ou plus de nanoparticules a provoqué une inhibition de 100 % de la croissance des bactéries (figures 3(b) et (c)). Il est intéressant de noter qu'aucune des doses de nanoparticules d'argent n'a eu pratiquement aucun effet sur la croissance de S. aureus (gram-positif) (figure 3(d)).

Dans d'autres expériences, des souches de bactéries Gram-négatives et Gram-positives ont été inoculées dans un milieu LB liquide additionné de nanoparticules d'argent. L'augmentation de la concentration de nanoparticules a progressivement inhibé la croissance des E. coli non résistants (figure 4(a)). La phase de latence s'est avérée plus longue que celle décrite dans les rapports précédents [11].

Cela pourrait être dû à la plus grande stabilité des nanoparticules utilisées dans cette étude. La concentration de 25 µg ml−1 s'est avérée fortement inhibitrice pour les bactéries, car il a fallu environ 8 h pour initier une croissance notable. Des résultats similaires ont été obtenus avec des souches résistantes ou non résistantes d'autres bactéries.

bactéries à Gram négatif étudiées (figures 4(b) et (c)).

En revanche, les nanoparticules d'argent se sont avérées avoir un effet moins significatif sur la croissance des bactéries Gram-positives (S. aureus). Aucune réduction de la croissance bactérienne n'a été observée jusqu'à ce que la concentration de nanoparticules atteigne 25 µg ml−1, tandis que la , concentration de 100 µg ml−1 n'a provoqué qu'une

Machine Translated by Google

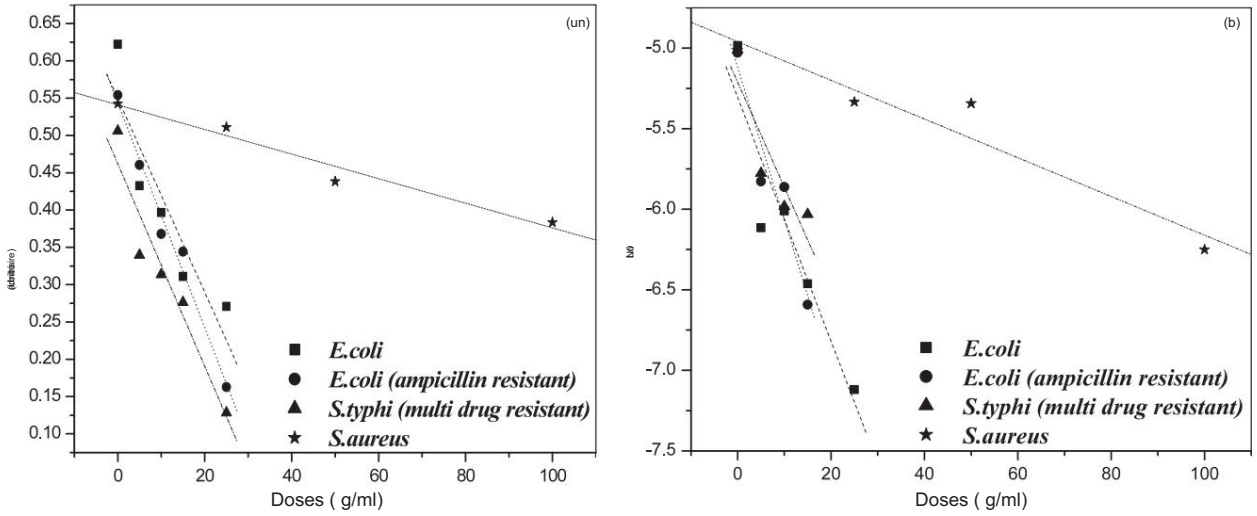

Figure 9. Effet des nanoparticules d'argent sur la constante de vitesse de croissance bactérienne (μ) (a) et le nombre initial de cellules (L0) (b).

inhibition partielle de la croissance (figure 4(d)). Une phase de latence plus courte était associée à la croissance des bactéries Gram-positives traitées avec des nanoparticules, ce qui contrastait avec celle des souches Gram-négatives (figure 5).

Nous avons ensuite cherché à savoir si l'effet antibactérien des nanoparticules était dû à la simple présence de ces particules dans le milieu de croissance ou s'il résultait de leur interaction avec les composants cellulaires bactériens. Les cellules ont été cultivées pendant 60 minutes en présence de nanoparticules d'argent, puis sédimentées et remises en culture dans un milieu frais sans nanoparticules. Les cellules témoins ont été traitées de manière similaire, mais sans exposition aux nanoparticules. Un retard significatif de la croissance des bactéries Gram-négatives remises en culture, et non des bactéries Gram-positives, a été observé dans le milieu frais après leur exposition initiale aux nanoparticules (figure 6). Les cellules témoins présentaient des caractéristiques de croissance normales. Ces observations étaient cohérentes avec une interaction soutenue entre les nanoparticules et les composants cellulaires des bactéries Gram-négatives, car sinon les courbes de croissance des bactéries remises en culture auraient été comparables à celles des cellules témoins.

3.3. Effet des nanoparticules d'argent sur le profil phosphotyrosine des protéines bactériennes

Afin d'étudier l'effet potentiel des nanoparticules sur la transduction du signal bactérien affectant la croissance, nous avons examiné la teneur en phosphotyrosine de protéines dérivées de bactéries Gram positives et négatives à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique. La phosphorylation de divers substrats protéiques est désormais bien établie chez les espèces bactériennes [19] et influence la transduction du signal bactérien [20]. Le profil des protéines phosphorylées sur tyrosine n'a pratiquement pas changé chez S. aureus après traitement par des nanoparticules d'argent (figure 7(a)). Cependant, une déphosphorylation notable de deux peptides de masses relatives de 150 et 110 kDa a été observée chez E. coli (figure 7(b)) et S. typhi (non représenté) exposés aux nanoparticules. La phosphorylation sur tyrosine chez les bactéries entraînerait l'activation de diverses protéines. substrats comme les facteurs sigma de l'ARN polymérase et les UDP-glucose déshydrogénases [21], une phosphorylation diminuée peut refléter une inhibition de l'activité de ces enzymes avec des implications critiques sur la croissance bactérienne. Un rapport récent a décrit la phosphorylation de la tyrosine des protéines bactériennes de liaison à l'ADN simple brin (BsSSB), molécules omniprésentes se liant à l'ADN à diverses étapes fonctionnelles comme la réplication et la recombinaison [22]. Une voie de phospho-signalisation s'est également avérée essentielle à la progression du cycle cellulaire bactérien [23]. L'identité des peptides substrats et celle des tyrosine phosphatases putatives responsables de la déphosphorylation observée chez les bactéries à Gram négatif, telles que décrites dans ce rapport, restent à établir et peuvent faire l'objet de recherches futures. Les présents résultats, ainsi que les interactions rapportées des nanoparticules d'argent avec des enzymes riches en thiols et l'ADN génomique bactérien [13], peuvent expliquer l'effet inhibiteur des nanoparticules sur la croissance des bactéries à Gram négatif. Il est intéressant de noter que la phosphorylation des protéines tyrosine kinases impliquées dans la biosynthèse et le transport des exopolysaccharides et des polysaccharides capsulaires a été rapportée chez un certain nombre de bactéries Gram-négatives et Gram-positives [24].

3.4. Microscopie électronique à transmission

Les différentes étapes de l'interaction entre les bactéries Gram-négatives et les nanoparticules d'argent sont illustrées par des microphotographies électroniques à transmission (figure 8). Aux premiers stades de l'interaction, des amas de nanoparticules se sont ancrés à la paroi bactérienne (figure 8(a)), probablement à des sites riches en groupes fonctionnels chargés négativement. Plus tard, les nanoparticules parviennent à pénétrer dans la cellule bactérienne (figure 8(b)).

Dans une autre micrographie (figure 8(c)), on a observé que les nanoparticules ancraient la cellule à plusieurs endroits et créaient perforations dans la membrane, qui pourraient entraîner une lyse cellulaire. L'interaction des nanoparticules avec les organismes Gram positifs s'est avérée bien moindre (non illustré). Au cours des phases ultérieures de l'expérience, des débris noirs ont été observés précipités. Ceux-ci pourraient être composés du contenu de la cellule et de nanoparticules et représenter un mécanisme de défense visant à épuiser localement la concentration en argent. L'effet cumulatif

Machine Translated by Google

L'absence de ces facteurs entraînerait un retard dans la croissance bactérienne, mais pas une annihilation complète.

3.5. Prédiction de la croissance bactérienne en présence de concentrations variables de nanoparticules d'argent

Le taux de croissance dynamique d'une espèce bactérienne est représenté par l'équation

$$\ln N = \ln L0 + \mu t \quad (1)$$

où N est le nombre de cellules bactériennes à l'instant t, L0 est le nombre initial de cellules et μ est la constante de taux de croissance des bactéries. Les données expérimentales ont été tracées selon une échelle logarithmique afin de déduire les valeurs de μ et de ln L0 correspondant aux différentes doses de nanoparticules (x) étudiées. Les relations linéaires entre x et μ (figure 9(a)) et x et L0 (figure 9(b)) ont été déduites pour chacune des espèces bactériennes étudiées, comme indiqué ci-dessous :

$$\mu = -ax + b \quad (2)$$

$$\ln L0 = -cx - d \quad (3)$$

où a, b, c et d sont les constantes des bactéries respectives comme ci-dessous.

Nom du bactérie	a	b	c	d
E. coli	0,0649	0,5494	0,3783	5,3061
E. coli (résistant à l'ampicilline)	0,0753	0,5435	0,4727	5,1190
S. typhi (multirésistant aux médicaments)	0,0678	0,4618	0,3263	5,2115
S. aureus	0,0082	0,541	0,0601	4,9598

Des relations similaires, bien que sous des formes complexes, ont été proposées pour plusieurs espèces chimiques affectant la croissance bactérienne [25].

Ainsi, en remplaçant les valeurs de μ et ln L0, l'équation (1) peut être réécrite comme

$$\ln N = (bt - d) - (at + c)x. \quad (4)$$

L'équation (4) représente le taux de croissance dynamique des bactéries en présence de différentes concentrations de nanoparticules d'argent dans le milieu. On constate que les pentes des droites de tendance des bactéries Gram-positives sont inférieures d'un ordre de grandeur à celles des souches Gram-négatives (figures 9(a) et (b)), ce qui concorde avec la diminution de la croissance observée chez les bactéries Gram-négatives en présence de nanoparticules d'argent.

3.6. Mécanisme possible de l'action antibactérienne des nanoparticules d'argent

Les différences entre les bactéries Gram positives et Gram négatives résident essentiellement dans la structure de leurs parois cellulaires respectives. Les bactéries Gram négatives possèdent une couche externe de lipopolysaccharide, suivie en dessous d'une fine couche (environ 7 à 8 nm) de peptidoglycane [26]. Bien que les lipopolysaccharides soient composés de lipides et de polysaccharides liés de manière covalente, ils manquent de résistance et de rigidité. Négatives les charges sur les lipopolysaccharides [28] sont attirées vers les charges positives faibles disponibles sur les nanoparticules d'argent [29].

En revanche, la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif est principalement composée d'une épaisse couche (environ 20 à 80 nm) de peptidoglycane, constituée de chaînes polysaccharidiques linéaires réticulées par de courts peptides pour former une structure tridimensionnelle rigide [27]. Cette rigidité et cette réticulation prolongée confèrent non seulement aux parois cellulaires moins de sites d'ancrage pour les nanoparticules d'argent, mais les rendent également difficiles à pénétrer.

L'ampleur de l'inhibition de la croissance bactérienne rapportée dans cette étude dépendait de la concentration de nanoparticules dans le milieu. L'interaction entre les nanoparticules et la paroi cellulaire des bactéries serait facilitée par l'abondance relative des charges négatives sur les bactéries Gram-négatives, ce qui concorde avec le fait que la croissance des bactéries Gram-négatives était plus profondément affectée par les nanoparticules d'argent que celle des organismes Gram-positifs. Comme démontré par microscopie électronique, l'interaction avec les nanoparticules a entraîné des perforations de la paroi cellulaire, contribuant à leurs effets antibactériens. Les conclusions des expériences de reculture étaient cohérentes avec l'entrée des nanoparticules à l'intérieur des cellules bactériennes et/ou une forte association avec les composants cellulaires bactériens. Une fois à l'intérieur de la cellule, les nanoparticules interféreraient avec la voie de signalisation de la croissance bactérienne en modulant la phosphorylation de la tyrosine de substrats peptidiques putatifs essentiels à la viabilité et à la division cellulaires.

4. Conclusion

Français Les nanoparticules d'argent synthétisées et analysées dans ce rapport se sont avérées avoir une puissance antibactérienne plus forte que celles décrites dans les rapports précédents [11, 13]. L'effet était dose-dépendant et était plus prononcé contre les organismes Gram-négatifs que Gram-positifs. L'effet antibactérien des nanoparticules était indépendant de l'acquisition de résistance par les bactéries aux antibiotiques. Le principal mécanisme par lequel les nanoparticules d'argent ont manifesté des propriétés antibactériennes était l'ancrage et la pénétration de la paroi cellulaire bactérienne, et la modulation de la signalisation cellulaire par la déphosphorylation de substrats peptidiques clés putatifs sur les résidus de tyrosine. Cependant, des études supplémentaires doivent être menées pour vérifier si les bactéries développent une résistance aux nanoparticules et pour examiner la cytotoxicité [30] des nanoparticules sur les cellules humaines avant de proposer leur utilisation thérapeutique.

Remerciements

Cette recherche a été financée par le Conseil indien de la recherche médicale (ICMR) et l'unité DST sur les nanosciences et technologies (DST-UNANST) de l'Université de Mumbai. Nous remercions sincèrement le Dr G.K. Dey du Centre de recherche atomique de Bhaba, à Mumbai, pour avoir réalisé l'analyse TEM des nanoparticules, ainsi que le professeur O.N. Srivastava pour ses encouragements. TB remercie également le professeur S. Lele et le Dr RK Mandal de l'Université de Mumbai pour leurs précieux échanges et leurs encouragements.

Références

[1] Gleiter H 2000 Matériaux nanostructurés, concepts de base et microstructure Acta Mater. 48 1–12 [2] Curtis A et

Wilkinson C 2001 Nanotechniques et approches en biotechnologie Tendances Biotechnol. 19 97–101

Machine Translated by Google

[3] Waren CW et Nie S 1998 Bioconjugués à points quantiques pour la détection non isotopique ultra-sensible Science 281 2016–8 [4] Vaseashta A et Dimova-Malinovska D 2005 Dispositifs, capteurs et détecteurs nanostructurés et à l'échelle nanométrique Sci. Technol. Adv. Mater. 6 312–8

[5] Langer R 2001 Administration de médicaments : médicaments ciblés Science 293 58–9 [6] Roy K, Mao HQ, Huang SK et Leong KW 1999 L'administration orale de gènes avec des nanoparticules de chitosane-ADN génère une protection immunologique dans un modèle murin d'allergie aux arachides Nat. Med. 5 387–91

[7] Sachlos E, Gotora D et Czernuszka JT 2006 Collagène échafaudages renforcés par des cristaux d'hydroxyapatite nano-substitués par carbonate composite biomimétique et façonnés par prototypage rapide pour contenir des microcanaux internes Tissue Eng. 12 2479–87 [8] Xu ZP, Zeng QH, Lu GQ et Yu AB 2006 Inorganique nanoparticules comme vecteurs pour une administration cellulaire efficace Chem. Sciences ing. 61 1027–40

[9] Farokhzad OC, Cheng J, Teply BA, Sherifi I, Jon S, Kantoff PW, Richie JP et Langer R 2006 Bioconjugués nanoparticules-aptamères ciblés pour la chimiothérapie anticancéreuse in vivo Proc. Natl Acad. Sci. USA 103 6315–20

[10] Stoimenov PK, Klinger RL, Marchin GL et Klabunde KJ 2002 Nanoparticules d'oxyde métallique comme agents bactéricides Langmuir 18 6679–86

[11] Sondi I et Salopek-Sondi B 2004 Nanoparticules d'argent comme agent antimicrobien : une étude de cas d' E. coli comme modèle pour les bactéries à Gram négatif J. Colloids Interface Sci. 275 177–82

[12] Panacek A, Kvitek L, Prucek R, Kolar M, Vecerova R, Pizurova N, Sharma VK, Nevecna T et Zboril R 2006 Nanoparticules colloïdales d'argent : synthèse, caractérisation et leur activité antibactérienne J. Phys. Chem. B 110 16248–53 [13] Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT et Yacaman MJ 2005 L'effet bactéricide des nanoparticules d'argent Nanotechnologie 16 2346–53 [14] Baker C, Pradhan A, Pakstis L, Pochan DJ et Shah SI 2005 Synthèse et propriétés antibactériennes des nanoparticules d'argent J. Nanosci. Technol. 5 244–9 [15] Holladay R, Moeller W, Mehta D, Brooks J, Roy R et Mortenson M 2006 Argent/eau, gels d'argent et compositions à base d'argent ; et leurs procédés de fabrication et d'utilisation Numéro de demande WO2005US47699 20051230 européen Office des brevets

[16] Li P, Li J, Wu C, Wu Q et Li J 2005 Effets antibactériens synergiques de l'antibiotique β-lactamine combiné à des nanoparticules d'argent Nanotechnologie 16 1912–1917

[17] Jain P et Pradeep T 2005 Potentiel de la mousse de polyuréthane recouverte de nanoparticules d'argent comme filtre à eau antibactérien Biotechnol. Bioeng. 90 59–63

[18] Li Y, Leung P, Yao L, Song QW et Newton E 2006 Effet antimicrobien des masques chirurgicaux recouverts de nanoparticules J. Hosp. Infec. 62 58–63 [19] Deutscher J et Saier MH 2005 Protéine Ser/Thr/Tyr Phosphorylation chez les bactéries — longtemps négligée, désormais bien établie J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9 125–31 [20] Kirstein J et Turgay K 2005 Un nouveau mécanisme de phosphorylation de la tyrosine impliqué dans la transduction du signal chez Bacillus subtilis J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9 182–8

[21] Mijakovic I, Petranovic D, Bottini N, Deutscher J et Ruhdal Jensen P 2005 Phosphorylation de la tyrosine des protéines chez Bacillus subtilis J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 9 189–97

[22] Mijakovic I, Petranovic D, Macek B, Cepo T, Mann M, Davies J, Jensen PR et Vujaklija D 2006 Les protéines de liaison à l'ADN simple brin bactérien sont phosphorylées sur la tyrosine Nucleic Acids Res. 34 1588–96 [23] Iniesta AA, McGrath PT, Reisenauer A, McAdams HH et Shapiro L 2006 Une voie de signalisation du phosphore contrôle la localisation et l'activité d'un complexe essentiel à la progression du cycle cellulaire bactérien Proc. Natl Acad. Sci. USA 103 10935–40

[24] Grangeasse C, Obadia B, Mijakovic I, Deutscher J, Cozzone AJ et Doublet P 2003 L'autophosphorylation de la kinase Wzc d'Escherichia coli régule la phosphorylation de la tyrosine d'Ugd, une UDP-glucose déshydrogénase J. Biol. Chem. 278 39323–39 [25] Nostro PL, Ninham BW, Nostro AL, Pesavento G, Fratoni L et Baglioni P 2005 Effets d'ions spécifiques sur les taux de croissance de Staphylococcus aureus et de Pseudomonas aeruginosa Phys. Biol. 2 1–7 [26] Madigan M et Martinko J 2005 Brock Biologie de Microorganismes 11e éd. (Englewood Cliffs, NJ : Prentice Salle)

[27] Baron S 1996 Medical Microbiology 4e éd. (Galveston : (Branche médicale de l'Université du Texas)

[28] Salton MRJ et Kim KS 1996 Structure Baron's Medical Microbiologie 4e éd. (Galveston : Université du Texas) (branche médicale)

[29] Sui ZM, Chen X, Wang LY, Xu LM, Zhuang WC, Chai YC et Yang CJ 2006 Effet de coiffage du CTAB sur les nanoparticules d'Ag chargées positivement Physica E 33 308–14 [30] Braydich-Stolle L, Hussain S, Schlager JJ et Hofmann MC 2005 Cytotoxicité in vitro des nanoparticules dans les cellules souches germinales de mammifères Toxicol. Sci. 88 412–9