

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

جامعة 20 اوت 1955- سكيكدة

UNIVERSITE 20 AOUT 1955- SKIKDA



Faculté des Sciences

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire Présenté en Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie appliquée

Intitulé :

"Évaluation antimicrobienne des Fe/Zn-NPs d'olivier :
étude in vitro et in vivo"

Présent par

BOUZOUALEGH Rahma,, SADOON Aya, SOUILAH Manel et
ZERROUKK Asma

Membre de Jury :

Mr. Boudjellab Zine Edine (MCA)	Président	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Boucetta Sabine (MCA)	Promoteur	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Melle. Boucetta Radja Nada (Doct)	Co-Promoteur	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Mme. Agoun Asma (MCB)	Examineur	Univ. Du 20 Août 1955 – Skikda
Mr Zaid Nacer Inspecteur	Invité	Laboratoire Caq-Wilaya Skikda

Année universitaire 2024/2025

Remerciement

Avant toutes choses, nous tenons à remercier Dieu, le tout puissant, pour nous avoir donné la force et la patience, la volonté et la santé pour la réalisation de ce travail que nous espérons bénéfique.

*D'abord nous tenons, Vivement à exprimer notre profonde reconnaissance et gratitude au notre encadreur **Mme. Dr. BOUCETTA Sabine.**, (Enseignante-chercheur MCA) pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse jusqu'à la fin de ce mémoire.*

*A notre chère Co-Encadrante **Melle BOUCETTA Radja Nada.(Doctorante)**, pour avoir Co-encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, ainsi que pour sa grande patience et sa gentillesse jusqu'à la fin de ce mémoire.*

*Nous remercions également **Mr. Dr. Boudjellab Zine Dine** (Enseignant-chercheur, MCA) pour avoir accepté de présider le jury de ce travail.*

*Nos remerciements sont adressés également à **Melle. Dr.. Agoun Asma** , (Enseignante-chercheur , MCB) d'avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Nous remercions **Mme. Nouné Chahrazed** (Chef de laboratoire- GNLK-Sonatrach-Skikda), pour ses aides, ses conseils scientifiques et ses encouragements.*

*Un merci très spécial à toute l'équipe du laboratoire d'hygiène de la Willaya de Skikda spécialement à **Mr ZAYED Nacer** qui était trop généreux avec nous, C'est un honneur de travailler avec telles personnes compétentes.*

Un merci spécial à tous l'équipe du laboratoire de Baterio-Parasitologie de l'hôpital cicel pour leurs aides.

Nous remercions aussi l'équipe de laboratoire de la microbiologie université Skikda.

*Nous remercions **club blue planet** pour nous apporter la plante.*

À tous les étudiants de master de la promotion 2025.

À toute personne qui a participé de près ou de loin, directement ou indirectement, à la réalisation de ce travail.



Table des matières:

Table des matières, liste des figures et liste des tableaux.

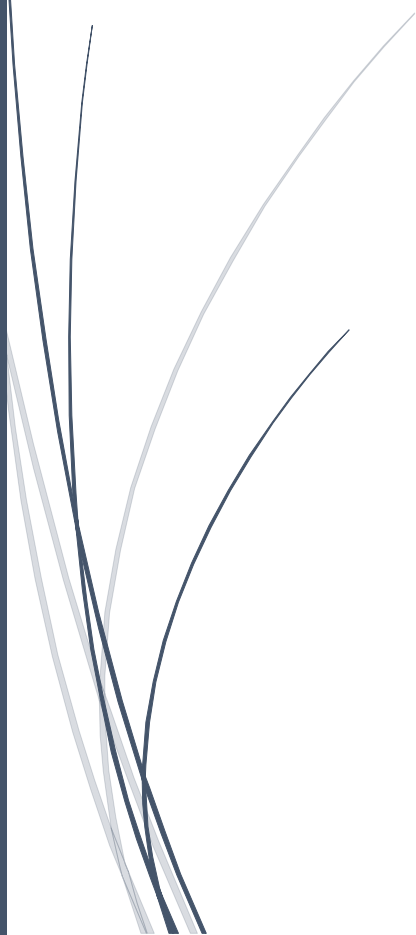


Table des matières

Résumés	
Abstract	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	01
Chapitre I : Matériel et Méthodes	
1.Plan expérimental adopté et cadre de l'étude	15
Partie I : in vitro	
2. Préparation des extraits aqueux, et synthèse verte et eco-friendly des nanoparticules... 2.1. Matériel végétal : Feuilles vertes fraîches (FOV) et Détachées(FOD) d' <i>Olea europaea</i>	17
2.2. Récoltes	18
2.3. Séchage et préparation des feuilles d'olivier.....	19
2.4.Préparation des extraits aqueux	20
3. Activité antibactérienne des nanoparticules bio synthétisées.....	24
3.1. Souches de référence (ATCC).....	25
3.2. Méthode de diffusion en puits.....	25
3.3. Test comparatif par antibiogramme.....	27
3.4. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI).....	27
3.5. Détermination de la concentration minimale bactéricide (CMB).....	28
Partie II : In Vivo	
4.Contrôle de qualité microbiologique alimentaire de la chair d' <i>Oreochromis</i> sp et de l'eau d'aquariums expérimentaux.....	29
4.1. Contrôle de qualité microbiologique alimentaire de la chair d' <i>Oreochromis</i> sp.....	31
4.1.1Méthode de préparation de la solution mère	31
4.1.2. Recherches et dénombrement de la flore totale aérobie mésophiles FTAM.....	34
4.1.3.Recherche et dénombrement de coliformes thermo tolérants (CTT).....	35
4.1.4. Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.1.6. Recherche des <i>Salmonella spp.</i> dans les tissus de poisson (<i>Oreochromis sp.</i>).....	40
4.2.Contrôle microbiologique de l'eau des aquariums expérimentaux (<i>Oreochromis sp.</i>)... 4.2.1.Échantillonnage et transport.....	43
4.2.2. Recherche et dénombrement des coliformes par la méthode NPP	44
4.2.3. Contrôle microbiologique de l'eau : recherche et dénombrement des streptocoques (méthode NPP).....	46
Chapitre II : Résultats et discussion	
1.Masse et rendement de biosynthèse des nanoparticules Fe/Zn-NPs (FOD) et Fe/Zn-NPs (FOV).....	48
2.Caractérisation macroscopique des souches étudiées.....	50
3.Caractérisation microscopique des souches étudiées.....	51
4.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes aux Nano particules.....	52
4.1Résultats de l'antibiogramme des concentrations maximales de Fe/Zn-NPs (FOV) d'<i>O. europaea</i>	52
4.2.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes au Nanoparticules Fe/Zn-NPs (FOV) d'<i>O. europaea</i>	54
4.3.Résultats de l'antibiogramme des concentrations maximales de Fe/Zn-NPs (FOD) d'<i>O. europaea</i>	60

4.5.Résultats du test de sensibilité des souches bactériennes à des nanoparticules Fe/Zn-NPs (FOD) d' <i>O.europaea</i>	61
5.Concentrations minimales inhibitrices (CMI) et Bactéricides (CMB) des nanoparticules	75
5.1. CMI Méthodologie appliquée.....	68
5.1.1.Méthode 1 : Repiquage systématique des zones d'inhibition.....	68
5.2.2.Méthode 2 : Repiquage ciblé (approche simplifiée).....	68
5.2.Résultats CMI/CMB de nanoparticules Fe/Zn-NPs (FOV).....	69
5.3.Résultats CMI/CMB des Fe/Zn-NPs (FOD).....	71
7.Résultats de Contrôle de qualité alimentaire d' <i>Oreochromis</i> sp « supplémenté par l'extrait des nanoparticules ».....	75
7.1.Flore aérobie mésophile totale (FTAM).....	75
7.1.1. Coliforme thermo tolérants (CTT).....	77
7.1.2.Recherche de <i>staphylococcus aureus</i> dans les tissus d' <i>Oreochromis</i> sp.....	80
7.1.3.Recherche de <i>salmonella</i> sp dans les tissus d' <i>Oreochromis</i> sp.....	82
7.2.Résultats des analyses microbiologiques de l'eau des aquariums.....	89
Discussion Générale	98
Conclusion et perspectives	112
Références Bibliographique	I

Liste des abréviations

MDR	menace des bactéries multi-résistantes
XDR	les bactéries ultrarésistantes aux médicaments
PDR	les pan drug résistantes
IDSA	infectious Diseases Society of America
OMS	l'Organisation mondiale de la santé
FAO	l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
PAA	l'acide peracétique
ATB	Antibiotiques
BCPL	le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol
CMB	Concentration minimale bactéricide
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CTT	les coliformes thermo tolèrent
E. coli	Escherichia coli
EP	Eau physiologique
EPT	Eau peptone tamponnée
FAO	Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture.
FMAT	Flore mésophile aérobie totale
GN	Gélose nutritive
H	heur
JORA	Journal Officiel Algérie
Lt	longueur totale
Min	Minute
MH	Muller Hinton
NPP	Nombre le plus probable
OMS	Organisation Mondial de la Santé
PCA	Giolitti Cantoni, Plate Count Agar
FOD	Feuilles d'Olivier détachées
FOV	Feuilles d'Olivier verts
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
SFB	Bouillon Sélénite- cystéiné
SM	Solution mère
TSE	Tryptone sel eau
TSI	Triple Sugar Iron
UFC	Unité Formant Colonie
VF	Viande foie
VRBL	Milieu lactose biliée au cristal violet
VRBG	Gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre
BMH	Bouillon Muller Hinton
Aq pov C	Aquarium Posidonie vert C
AqPOD C	Aquarium Posidonie déchets C
Aq pov b	Aquarium Posidonie vert b
AqPOD b	Aquarium Posidonie déchets b
Wt	Poids totale
C°	Degré Celsius
C	Centimètre

g	gramme
Kg	Kilogramme
mg	milligramme
ml	millilitre
mm	millimètre
%	Pour cent

Résumés :

Résumés : Français, Anglais et Arabe

Résumé

Dans un contexte de lutte contre la résistance antimicrobienne et de recherche de solutions durables en aquaculture, cette étude s'inscrit dans une démarche de valorisation biotechnologique des ressources naturelles végétales pour la synthèse verte de nanoparticules métalliques à double composante (Fe/Zn-NPs). Plus précisément, l'objectif central a été de comparer l'efficacité biologique de deux formulations innovantes obtenues à partir de feuilles d'olivier (*Olea europaea*) à des stades physiologiques distincts : les **feuilles vertes (FOV)** et les **feuilles déposées au sol (FOD)**.

Les résultats **in vitro** ont révélé une activité antibactérienne marquée des **Fe/Zn-NPs (FOV)**, avec les diamètres d'inhibition décroissant : *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) : **23,5 ± 0,4 mm**, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) : **22,8 ± 0,3 mm**, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) : **21,1 ± 0,7 mm**, *Escherichia coli* (ATCC 8739) : **17,7 ± 0,5 mm**, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) : **15,4 ± 0,2 mm**. Ces inhibitions sont associées à des **CMI aussi faibles que 0,125 mg/mL**, avec des **ratios CMB/CMI ≤ 4** pour *S. aureus* et *L. monocytogenes*, traduisant un **effet bactéricide prononcé**. En comparaison, les **Fe/Zn-NPs (FOD)** ont présenté une activité plus modérée, avec des diamètres d'inhibition classés comme suit : *S. aureus* (ATCC 29213) : **19,2 ± 0,6 mm**, *L. monocytogenes* (ATCC 7644) : **17,9 ± 0,3 mm**, *E. coli* (ATCC 8739) : **14,1 ± 0,7 mm**, *K. pneumoniae* (ATCC 700603) : **12,6 ± 0,8 mm**, *P. aeruginosa* (ATCC 9027) : **10,5 ± 0,4 mm**. Les CMI étaient comprises entre **0,25 et 0,5 mg/mL**, avec des **CMB/CMI > 4**, témoignant d'un **effet majoritairement bactériostatique**, notamment envers les souches Gram⁻.

Les résultats obtenus ont mis en évidence une **efficacité antibactérienne significativement supérieure des Fe/Zn-NPs (FOV)**, traduite par des diamètres d'inhibition plus élevés (jusqu'à 23,5 ± 0,4 mm contre *S. aureus*) et des **valeurs de CMI aussi faibles que 0,125 mg/mL**, avec des ratios CMB/CMI ≤ 4 indiquant un effet bactéricide réel sur les souches Gram⁺. En revanche, les **Fe/Zn-NPs (FOD)** ont montré une activité plus restreinte, avec une efficacité ciblée sur les bactéries Gram⁺ (CMI de 0,25 à 0,5 mg/mL) et un effet bactériostatique prédominant (CMB/CMI > 4) contre les bactéries Gram⁻.

Sur le plan **in vivo**, les deux formulations ont contribué à : i) Une réduction significative des charges microbiennes totales (FMAT), coliformes totaux et fécaux ; ii) L'absence de *Salmonella* et *S. aureus* coagulase positive ; et iii) Une meilleure survie des poissons traités, avec un taux de mortalité inférieur à 10 % sur 30 jours.

Ces résultats confirment le potentiel des **Fe/Zn-NPs (FOV)** comme agents antibactériens efficaces, stables et biocompatibles, particulièrement adaptés aux systèmes de production aquacole à haute densité. À l'issue de cette étude, deux **notices technico-vétérinaires expérimentales**, respectivement intitulées **Nano²Veto-FOV®** et **Nano²Veto-FOD®**, ont été développées par l'équipe de recherche, en vue de leur intégration dans une stratégie **"antibiotic-free"** en biotechnologie bleue.

Mots-clés : *Olea europaea*, Fe/Zn-NPs (FOV), Fe/Zn-NPs (FOD), antibiogramme, CMI, CMB, ZOI, *Oreochromis sp.*, biotechnologie bleue.

Title: Antimicrobial Evaluation of Olive-Based Fe/Zn-NPs: In Vitro and In Vivo Study

Specialty: Applied Microbiology-Master2

Authors: BOUZOUALEGH Rahma, SADOUN Aya, SOUILAH Manel et ZERROUK Asma

Year: 2024-2025

Summary

In the context of rising antimicrobial resistance and the pursuit of sustainable solutions in aquaculture, this study explores the biotechnological valorization of natural plant resources through the green synthesis of dual-component metallic nanoparticles (Fe/Zn-NPs). The central objective was to compare the biological effectiveness of two innovative formulations derived from *Olea europaea* leaves at distinct physiological stages: freshly harvested green leaves (FOV) and senescent fallen leaves (FOD).

In vitro antibacterial activity of Fe/Zn-NPs (FOV) was found to be significant, with inhibition zones observed in descending order as follows: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213): **23.5 ± 0.4 mm**, *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603): **22.8 ± 0.3 mm**, *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644): **21.1 ± 0.7 mm**, *Escherichia coli* (ATCC 8739): **17.7 ± 0.5 mm**, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027): **15.4 ± 0.2 mm**. These inhibitory effects were associated with minimal inhibitory concentrations (MICs) as low as **0.125 mg/mL**, and CMB/MIC ratios ≤ 4 for *S. aureus* and *L. monocytogenes*, indicating a pronounced bactericidal effect.

In contrast, Fe/Zn-NPs (FOD) exhibited more moderate activity, with inhibition zones ranked as follows: *S. aureus* (ATCC 29213): **19.2 ± 0.6 mm**, *L. monocytogenes* (ATCC 7644): **17.9 ± 0.3 mm**, *E. coli* (ATCC 8739): **14.1 ± 0.7 mm**, *K. pneumoniae* (ATCC 700603): **12.6 ± 0.8 mm**, *P. aeruginosa* (ATCC 9027): **10.5 ± 0.4 mm**.

MIC values ranged between **0.25 and 0.5 mg/mL**, with CMB/MIC ratios > 4 , suggesting a predominantly bacteriostatic effect, especially against Gram-negative strains.

The **in vivo** assessment in *Oreochromis sp.* under intensive aquaculture conditions confirmed the therapeutic potential of both nanoparticle formulations. The main outcomes were: (i) a significant reduction in total mesophilic aerobic flora (FMAT), total and fecal coliforms; (ii) the complete absence of *Salmonella* spp. and coagulase-positive *S. aureus*; (iii) improved survival rates, with mortality remaining below 10% over 30 days of exposure.

These findings confirm the superior efficacy of Fe/Zn-NPs (FOV) as stable, bioactive, and biocompatible antibacterial agents, ideally suited for high-density aquaculture systems. As a result of this research, two experimental veterinary product sheets — **Nano²Veto-FOV®** and **Nano²Veto-FOD®** — were developed by the research team to support their integration into an **antibiotic-free blue biotechnology strategy**.

Keywords: *Olea europaea*, Fe/Zn-NPs (FOV), Fe/Zn-NPs (FOD), antibiogram, MIC, MBC, ZOI, *Oreochromis sp.*, blue biotechnology.

ملخص

في ظل تصاعد مقاومة البكتيريا للمضادات الحيوية والبحث عن حلول مستدامة في مجال تربية الأحياء المائية، تهدف هذه الدراسة إلى تبيين الموارد النباتية الطبيعية من خلال التخليق الأخضر لجسيمات نانوية معدنية مزدوجة (Fe/Zn-NPs). وقد تمحور الهدف الرئيسي حول مقارنة الفعالية البيولوجية لصيغتين مبتكرتين مستخلصتين من أوراق شجرة الزيتون (*Olea europaea*) في حالتين فيزيولوجيتين مختلفتين: أوراق خضراء طازجة (FOV) مقابل أوراق متساقطة ومتحللة طبيعياً (FOD).

أظهرت النتائج في المختبر أن Fe/Zn-NPs (FOV) تمتلك نشاطاً مضاداً للبكتيريا واضحاً، حيث تم تسجيل أقطار مناطق التثبيط تنازلياً كالتالي: 23.5 ± 0.4 (ATCC 29213): *Staphylococcus aureus* مم، 22.8 ± 0.3 (ATCC 700603): *Klebsiella pneumoniae* مم، 21.1 ± 0.3 (ATCC 7644): *Listeria monocytogenes* مم، 17.7 ± 0.5 (ATCC 8739): *Escherichia coli* مم، 15.4 ± 0.2 (ATCC 9027): *Pseudomonas aeruginosa* مم. وقد ارتبط هذا النشاط القوي بقيمة منخفضة للتركيز المثبط الأدنى (CMI) بلغت 0.125 ملغ/مل، مع نسب $CMB/CMI \leq 4$ ضد *S. aureus* و *L. monocytogenes*، مما يدل على تأثير قاتل للبكتيريا. بالمقابل، أظهرت جسيمات Fe/Zn-NPs (FOD) نشاطاً متوسطاً، حيث تم تسجيل الأقطار التالية لمناطق التثبيط: 19.2 ± 0.6 (ATCC 29213): *S. aureus* مم، 17.9 ± 0.3 (ATCC 7644): *L. monocytogenes* مم، 14.1 ± 0.7 (ATCC 8739): *K. pneumoniae* مم، 12.6 ± 0.8 (ATCC 700603): *P. aeruginosa* مم، 10.5 ± 0.4 (ATCC 9027): *E. coli* مم. تراوحت قيم CMI بين 0.25 و 0.5 ملغ/مل، مع نسب CMB/CMI أكبر من 4، مما يشير إلى تأثير تثبيطي (بكتيري-ساكن) خاصة ضد السلالات سالبة الغرام.

أما في التجارب الحيوية (*in vivo*)، فقد أكدت النتائج فعالية التركيبين عند استخدامهما كمكملات غذائية لأسماك البلطي (*Oreochromis sp.*) تحت ظروف تربية مكثفة. وتمثلت النتائج الأساسية فيما يلي: (i) انخفاض كبير في الحمل البكتيري الكلي والقولونيات الكلية والبرازية؛ (ii) غياب تام لكل من *Salmonella spp.* و *S. aureus* موجبة التخثر؛ و (iii) تحسين معدل البقاء على قيد الحياة للأسماك بنسبة وفيات أقل من 10% خلال 30 يوماً.

تؤكد هذه النتائج أن Fe/Zn-NPs (FOV) تشكل عوامل مضادة للبكتيريا فعالة، مستقرة ومتوافقة حيويًا، مما يؤهلها لتكون خيارًا واعدًا في أنظمة الاستزراع السمكي ذات الكثافة العالية. وكنتيجة لهذا العمل، تم تطوير نُشيرتين تقنيتين بيطريتين تجريبتين بعنوان Nano²Veto-FOV® و Nano²Veto-FOD®، بهدف دمجهما في استراتيجية مبتكرة قائمة على "البيوتكنولوجيا الزرقاء بدون مضادات حيوية".

الكلمات المفتاحية: *Olea europaea*، Fe/Zn-NPs (FOV)، Fe/Zn-NPs (FOD)، اختبار الحساسية، CMI، CMB، ZOI، *Oreochromis sp.*، البيوتكنولوجيا الزرقاء.



Introduction Générale

Introduction :

La **biosynthèse des nanoparticules** constitue aujourd'hui un axe prioritaire au carrefour de la **nanotechnologie** et de la **biotechnologie**, en réponse à la nécessité croissante de développer des **technologies respectueuses de l'environnement** pour la fabrication de matériaux fonctionnels (Bhattacharya & Gupta, 2005). Cette approche dite « verte » repose sur l'utilisation d'organismes biologiques – principalement les **micro-organismes, les champignons, les algues et les extraits végétaux** – capables de réduire les ions métalliques en **nanoparticules stables**, dans des conditions douces, sans solvants toxiques ni énergie excessive.

De nombreux travaux ont été consacrés à la **biosynthèse de matériaux inorganiques**, notamment les **nanoparticules métalliques**, en utilisant soit des micro-organismes, soit des plantes (Mohanpuria et al., 2007 ; Farooqui et al., 2010). Ces dernières offrent l'avantage d'être **abondantes, renouvelables, peu coûteuses**, et riches en métabolites secondaires (phénols, flavonoïdes, alcaloïdes) capables de jouer à la fois le rôle d'**agents réducteurs** et d'**agents capping** (stabilisants). Cette dualité fonctionnelle rend la **phytosynthèse** particulièrement attractive pour la production de nanoparticules destinées à des applications **biomédicales, aquacoles et environnementales**.

L'**aquaculture** constitue aujourd'hui l'un des **secteurs agroalimentaires les plus dynamiques**, mais sa croissance est freinée par la **recrudescence des maladies infectieuses**, la **dégradation de la qualité de l'eau** et la **nécessité d'apports nutritionnels durables** (El-Saadony et al., 2021). Parmi les solutions émergentes figure l'utilisation de **micronutriments essentiels** comme le **fer (Fe)** et le **zinc (Zn)**, administrés sous **forme conventionnelle ou nanométrique**, ces dernières offrant une **biodisponibilité et une efficacité nettement supérieures** (Gao et al., 2019).

Le **fer** stimule l'**hématopoïèse**, le **développement cellulaire** et la **résistance aux infections**, tandis que le **zinc** intervient dans la **synthèse enzymatique**, le **métabolisme protéique** et la **régulation hormonale**, contribuant ainsi au **renforcement des défenses immunitaires** (Kumar et al., 2019). En plus de leur rôle nutritionnel, les **Fe-NPs et Zn-NPs** présentent une **activité antimicrobienne intrinsèque** : elles perturbent les **membranes cellulaires** de pathogènes aquacoles majeurs tels que *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*

ou *Escherichia coli* multirésistante, notamment par la **génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)** (Mohd Yusof et al., 2020).

Ces nanoparticules représentent une **alternative non antibiotique prometteuse**, capable de **limiter l'émergence de résistances** tout en assurant la **santé des élevages piscicoles**. Elles contribuent également à **prolonger la conservation des produits halieutiques** via leur **action antibiofilm et antifongique**, en particulier lorsqu'elles sont intégrées dans des **revêtements biodégradables ou emballages actifs**.

Dans cette optique, la **synthèse verte** constitue une stratégie innovante et respectueuse de l'environnement, évitant l'usage de solvants toxiques. Les **feuilles d'olivier (*Olea europaea*)**, riches en polyphénols (oléuropéine, hydroxytyrosol, flavonoïdes), jouent un double rôle : **agents réducteurs** et **agents de stabilisation**, donnant naissance à des **nanoparticules stables, biocompatibles et bioactives** (Benavente-García et al., 2000 ; Lee-Huang et al., 2003). Ces extraits végétaux ont déjà permis de produire des **nanoparticules d'argent et de ZnO** aux propriétés **antimicrobiennes et antioxydantes** reconnues.

Cependant, à ce jour, **aucune étude n'a systématiquement exploré les nanoparticules bimétalliques Fe/Zn** synthétisées à partir de **feuilles d'olivier** ni évalué leurs effets **in vitro et in vivo** en aquaculture. La présente recherche se propose donc de combler cette **lacune scientifique**, en développant une **approche innovante algérienne** reposant sur une **nanotechnologie verte appliquée à la nutrition et à la santé des espèces aquatiques**.

1. Applications de la nanotechnologie en pisciculture : avantages et limites

L'application de la **nanotechnologie en aquaculture** représente une avancée stratégique pour surmonter diverses contraintes affectant la productivité des élevages piscicoles. En particulier, l'**incorporation de minéraux et vitamines sous forme de nanoparticules** – notamment le **sélénium**, le **zinc**, le **fer** ou la **vitamine C** – a démontré une amélioration significative des **performances de croissance**, de la **conversion alimentaire** et de la **résistance immunitaire** chez de nombreuses espèces aquatiques (El-Saadony et al., 2021 ; Ibrahim et al., 2022).

Par ailleurs, les **nanoparticules** jouent un rôle crucial dans la **reproduction** et la **santé piscicole**. Elles sont utilisées comme **agents antimicrobiens**, **vecteurs de médicaments**, outils de **nano-vaccination**, ou encore pour le **diagnostic rapide des maladies** (Rather et al., 2011 ; Yang et al., 2021). Leur contribution s'étend également à la **dépollution** et à la **purification de l'eau**, ainsi qu'au **conditionnement intelligent des produits halieutiques**, renforçant la **sécurité sanitaire** et prolongeant la **durée de conservation** (Nguyen et al., 2024).

Cependant, malgré ces bénéfices notables, certaines nanoparticules présentent des **effets toxiques** potentiels en raison de leur **taille nanométrique**, leur **forte réactivité chimique** et leur **perméabilité biologique accrue**. Ces caractéristiques peuvent altérer des **fonctions physiologiques clés**, induire une **cytotoxicité**, causer des **dommages à l'ADN**, et entraîner des **lésions histopathologiques** (Gao et al., 2019 ; Mohd Yusof et al., 2020). L'usage intensif de ces nanomatériaux pourrait également introduire de **nouveaux polluants secondaires** dans l'environnement aquatique, impactant la **santé des poissons** ainsi que celle des **organismes environnants** (Baranwal et al., 2018).

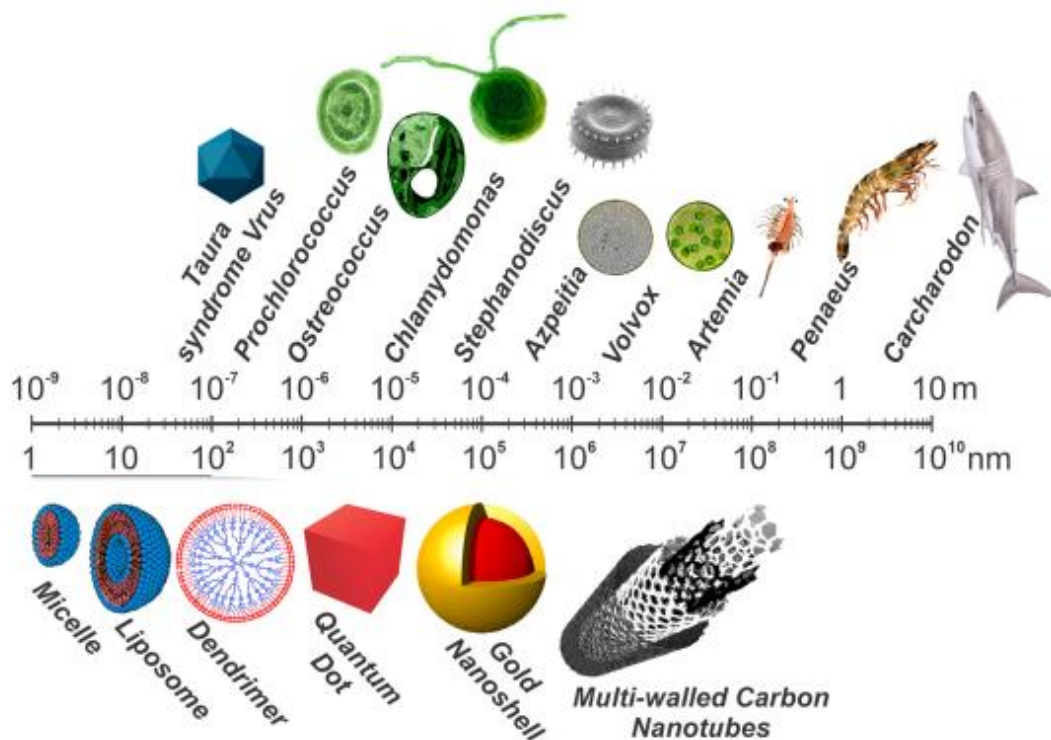
Ainsi, bien que les **nanotechnologies permettent des gains importants en productivité** et en **prophylaxie**, leur **toxicité potentielle**, leur **biodisponibilité élevée**, et leur **tendance à la bioaccumulation** soulèvent des préoccupations majeures quant à leur **sécurité écologique** (Handy, 2012 ; Toyokawa et al., 2008).

Selon la **National Nanotechnology Initiative (NNI)** des États-Unis, la nanotechnologie se définit comme « la compréhension et le contrôle de la matière à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire entre environ **1 et 100 nm**, où des phénomènes uniques permettent des **applications nouvelles** » (NNI, 2024) (**Fig.1**).

La **nanotechnologie possède un potentiel immense** pour **améliorer les systèmes aquacoles** : elle permet de **réduire les coûts de production**, **d'accroître l'efficacité des traitements**, et de **limiter l'impact environnemental**, contribuant ainsi à répondre aux besoins alimentaires d'une population mondiale dépassant **les 8 milliards d'habitants** (Ramsden, 2018 ; He et al., 2019).

La **Chine**, notamment, s'est illustrée comme **leader mondial dans le développement rapide de la nanotechnologie** dans les secteurs de l'agriculture et de l'agroalimentaire, avec des produits respectant les critères de **qualité, de durabilité, de coût abordable** et de **sécurité sanitaire** (Chena & Yadab, 2011).

Aujourd'hui, la nanotechnologie est une **industrie à plusieurs milliards de dollars**, en **croissance rapide**, avec plus de **1 000 produits commerciaux** contenant des nanomatériaux déjà disponibles sur le marché mondial. Plus de **300 produits alimentaires nanoformulés** ont été mis sur le marché au cours de la dernière décennie, et l'impact économique global des industries nanotechnologiques a été estimé à **3 000 milliards de dollars en 2020**, avec environ **6 millions d'emplois** générés dans le monde (He et al., 2019 ;



Ramsden, 2018).

Figure 1. Taille relative des nanoparticules comparée à celle de divers organismes aquatiques.

La nanotechnologie est une discipline transversale impliquant la **physique, la chimie, la biotechnologie et le génie des matériaux** (Chandra, 2016). Elle opère à l'échelle du **nanomètre (1–100 nm)**, là où apparaissent des propriétés physicochimiques nouvelles en raison de la taille extrêmement réduite des matériaux. Les **nanomatériaux** peuvent être classés selon leurs dimensions : **zéro dimension** (nanoparticules, nanoclusters, quantum dots),

une dimension (nanotubes de carbone), **deux dimensions** (graphène, films ultraminces) et **trois dimensions** (matériaux nanostructurés).

Parmi les nombreuses formes utilisées, on trouve les **dendrimères** (Wu et al., 2015a), **nanocapsules** (Torchilin, 2006), **nanosphères** (Donbrow, 1991) et **nanotubes** (Reilly, 2007).

Ces nanomatériaux présentent plusieurs avantages majeurs, notamment : **le ciblage tissulaire spécifique, la réduction des doses et de la toxicité, l'augmentation de la biodisponibilité**, ainsi qu'une **efficacité thérapeutique améliorée avec moins d'effets secondaires** (Shah & Mraz, 2019 ; Toyokawa et al., 2008 ; Xu et al., 2018a). Ces propriétés uniques expliquent **l'expansion rapide de leurs applications**, allant de **la conservation alimentaire au traitement de l'eau**, en passant par des usages en **santé humaine** (Baranwal et al., 2018 ; Ogunkalu, 2019).

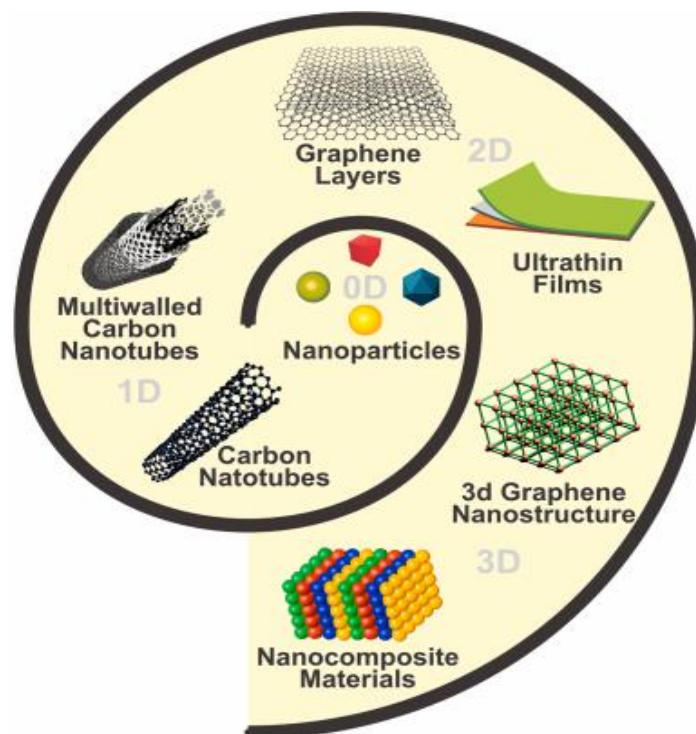


Figure 2. Représentation schématique des différentes dimensions des nanomatériaux actuellement développés, incluant : les structures à zéro dimension (nanoparticules, quantum dots), une dimension (nanotubes), deux dimensions (graphène, films ultraminces), et trois dimensions (matériaux nanostructurés complexes). Ces configurations influencent fortement les propriétés physico-chimiques et biologiques des nanomatériaux. (ex. : *Adapté de Chandra, 2016*)

2. Administration médicamenteuse pour la gestion sanitaire

Les **épidémies de maladies** demeurent l'un des **principaux freins à la durabilité** et au développement de l'aquaculture moderne (Rather et al., 2011 ; Sibaja-Luis et al., 2019 ; Yang et al., 2021). Face à cette problématique, la **nanotechnologie ouvre de nouvelles perspectives** en matière de **diagnostic rapide** et de **gestion thérapeutique** des pathologies aquacoles (Handy, 2012).

Parmi les approches innovantes figure l'usage de **systèmes de délivrance médicamenteuse à cœur solide**, dans lesquels une **nanoparticule est encapsulée par une enveloppe lipidique** (généralement à base d'acides gras) permettant de **protéger le principe actif** contre la dégradation. Cette méthode est particulièrement **efficace pour les molécules sensibles à la chaleur ou instables** (Mitchell & Trivedi, 2010).

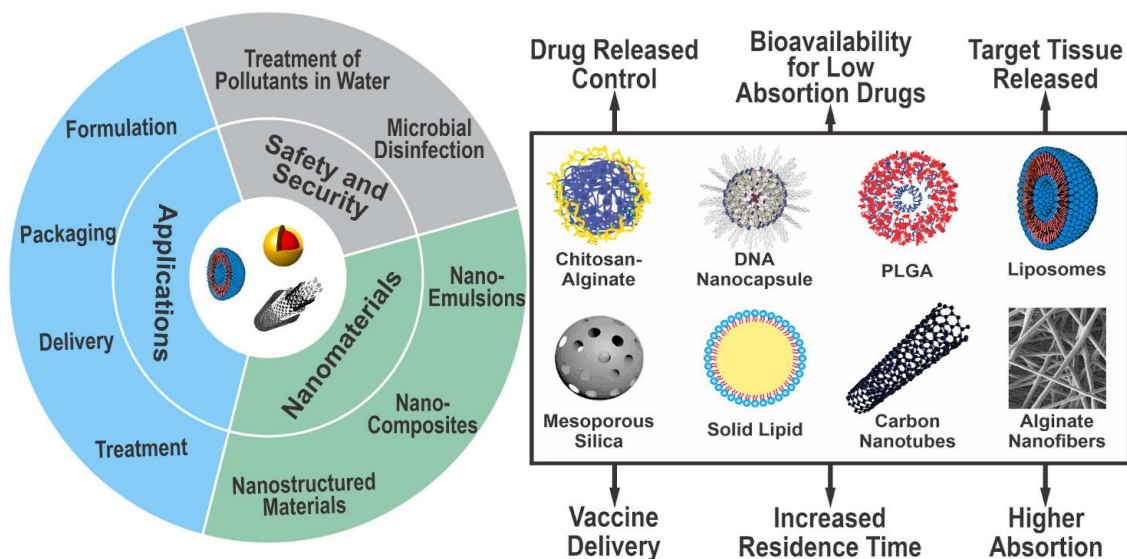


Figure. 3. Applications majeures actuelles de la nanotechnologie dans l'industrie aquacole.

En complément, certains **nanomatériaux poreux**, comme les **particules de silice mésoporeuse**, peuvent être utilisés en tant que **matrices pour la libération contrôlée** de médicaments (Stromme et al., 2009). Ces technologies visent à **optimiser l'efficacité thérapeutique** tout en réduisant les doses nécessaires. Les **systèmes oraux de nano-administration** se sont également développés, avec des objectifs multiples (**Fig.3**) : i) **Améliorer le contrôle de la libération** des substances actives (Eldridge et al., 1990), ii) **Cibler les tissus infectés** de manière spécifique (Jani et al., 1990), et iii) **accroître la biodisponibilité** des médicaments faiblement absorbés par voie digestive (Florence et al., 1995).

3. Nanotechnologie et effet antibactérien dans la gestion sanitaire en santé aquacole

La gestion sanitaire en aquaculture constitue un enjeu critique face à la recrudescence des maladies infectieuses et à l'émergence de **souches bactériennes multirésistantes**. Les infections peuvent être d'origine **pathogène ou opportuniste**, affectant sévèrement les rendements piscicoles. Si plusieurs traitements antimicrobiens sont disponibles, **l'usage excessif d'antibiotiques** dans les élevages aquacoles a conduit à une **résistance accrue** des pathogènes, compromettant l'efficacité des thérapies conventionnelles (Sibaja-Luis et al., 2019 ; Yang et al., 2021).

Des études ont notamment rapporté **l'isolation de souches résistantes d'Aeromonas hydrophila** dans les fermes de tilapia, présentant une **résistance à la tétracycline, à la streptomycine et à l'érythromycine** (El-Saadony et al., 2021). D'autres espèces pathogènes identifiées dans les systèmes aquacoles, telles que **Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline (SARM), Edwardsiella spp., Photobacterium damsela, Yersinia ruckeri, Listeria monocytogenes et certaines souches de Vibrio spp.**, posent également des défis majeurs pour la santé animale (Beaver et al., 2017 ; Skalny et al., 2021).

Dans ce contexte, la **nanotechnologie appliquée à l'aquaculture** apparaît comme une **approche novatrice et prometteuse** pour **limiter la dépendance aux antibiotiques et lutter contre la résistance bactérienne** (Rather et al., 2011 ; Handy, 2012). Les **nanoparticules métalliques**, telles que celles à base d'**argent (AgNPs), d'or (AuNPs), d'oxyde de zinc (ZnO-NPs) ou de dioxyde de titane (TiO₂-NPs)**, possèdent des **propriétés antimicrobiennes remarquables** liées à leur **forte réactivité de surface**, leur **taille nanométrique** et leur **capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS)** (Xu et al., 2018a ; Baranwal et al., 2018). Plus précisément, ces nanomatériaux peuvent être utilisés pour :

- Créer des **revêtements antibactériens ou antifongiques** grâce à des **nanostructures poreuses** ;
- Développer des **nanosenseurs** pour une **détection précoce** des agents pathogènes dans l'eau ;
- Favoriser la **délivrance ciblée de médicaments via l'alimentation**, augmentant la **biodisponibilité** et réduisant les effets secondaires ;
- Servir de **vecteurs fiables pour les vaccins**, notamment grâce aux **nanoparticules à base de chitosane**, connues pour leur **biocompatibilité** et leur **adhésion aux muqueuses intestinales** (Mitchell & Trivedi, 2010 ; Shah & Mraz, 2019).

En somme, les **nanoparticules antimicrobiennes** représentent une **alternative durable** pour le **contrôle des infections aquacoles** tout en répondant aux préoccupations liées à la **biosécurité**, à la **durabilité environnementale** et à la **réduction de la pression antibiotique**.

Tableau. 1. Comparaison référentielles des Propriétés antimicrobiennes de différentes nanoparticules utilisées en aquaculture

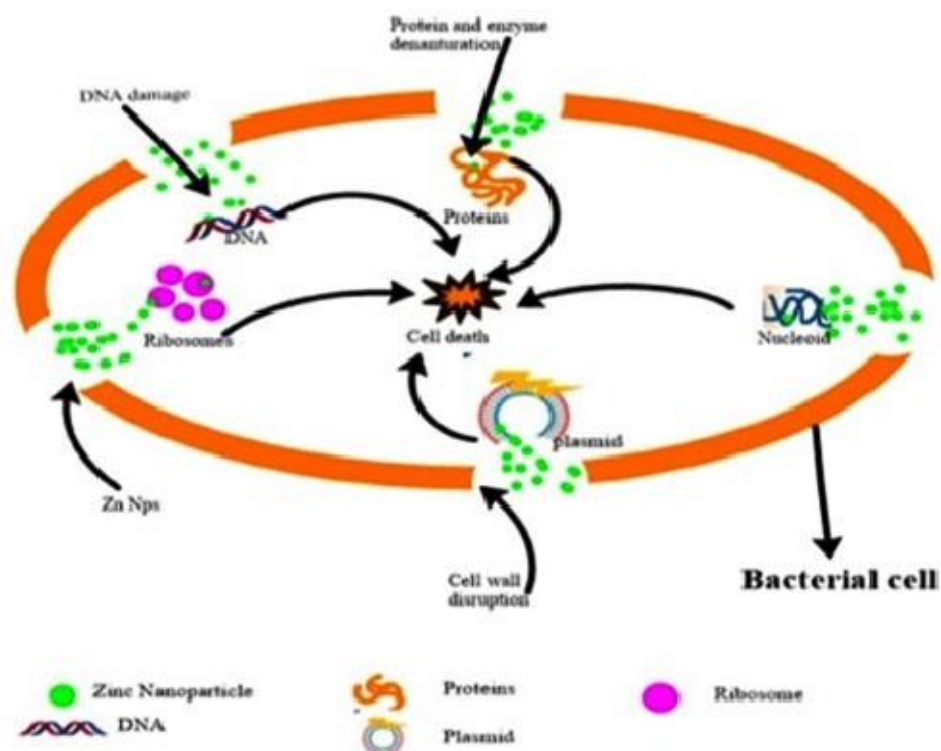
Type de nanoparticule	Voie de synthèse / Source	Activité antimicrobienne démontrée	Références
Nanoparticules d'argent (AgNPs)	<ul style="list-style-type: none"> • Réduction verte au jus de citron (<i>Citrus limon</i>) • Biosynthèse à partir de bourgeons foliaires de <i>Rhizophora mucronata</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition d'<i>Aeromonas fluorescens</i> et <i>Flavobacterium</i> • Réduction de 71 % de la mortalité chez <i>Fenneropenaeus indicus</i> infectés par <i>Vibrio harveyi</i> • Activité antifongique contre <i>Candida</i> spp. et dermatophytes 	Anjebam et al., 2014 ; El-Saadony et al., 2021 ; Mohanpuria et al., 2007 ; Yousefi et al., 2022
Nanoparticules d'or (AuNPs)	<ul style="list-style-type: none"> • Synthèse colloïdale classique • Voies biologiques utilisant des extraits végétaux ou bactériens 	<ul style="list-style-type: none"> • Vecteurs non toxiques de médicaments et d'ADN • Activité antibactérienne contre <i>E. coli</i> et <i>Salmonella Typhi</i> • Fongicidie accrue (effet taille-dépendant) contre <i>Candida</i> spp. 	Baranwal et al., 2018 ; Farooqui et al., 2010 ; Wu et al., 2015
ZnO NPs & TiO₂ NPs	<ul style="list-style-type: none"> • Méthodes sol-gel, hydrothermales ou biosynthétiques • Dopage par Fe₃O₄ pour synergie d'action 	<ul style="list-style-type: none"> • ZnO NPs : rupture membranaire et génération d'ROS chez <i>Aeromonas</i>, <i>Vibrio</i> • TiO₂-Fe NPs : effet bactéricide synergique contre souches aquacoles multirésistantes 	Ibrahim et al., 2022 ; El-Saadony et al., 2021 ; Xu et al., 2018a

Les **nanoparticules de zinc (ZnNPs)** ont démontré une **forte activité antibactérienne** contre plusieurs bactéries pathogènes et se sont révélées **efficaces pour réduire la charge bactérienne** dans les tissus vitaux des poissons tels que **la peau, l'intestin et les muscles** (El-Saadony et al., 2021).

L'intégration de zinc dans l'alimentation piscicole améliore la **résistance des poissons aux pathogènes infectieux**. Le zinc est en effet un **élément essentiel à l'activité antibactérienne**, jouant un rôle clé dans la **prévention des infections bactériennes** (Kumar et al., 2019).

Le **mécanisme d'action des ZnNPs** repose sur la **perturbation de la membrane cellulaire bactérienne**, comme illustré à la **figure 4** (Gao et al. 2019a, b ; Mohd Yusof et al., 2020).

Les **nanoparticules de zinc (ZnNPs)** ont démontré une **forte activité antibactérienne** contre plusieurs bactéries pathogènes et se sont révélées **efficaces pour réduire la charge bactérienne** dans les tissus vitaux des poissons tels que **la peau, l'intestin**



et les muscles (El-Saadony et al., 2021).

Figure.4. Mécanisme du potentiel antibactérien des nanoparticules de zinc (Gao et al. 2019a)

L'intégration de zinc dans l'alimentation piscicole améliore la **résistance des poissons aux pathogènes infectieux**. Le zinc est en effet un **élément essentiel à l'activité antibactérienne**, jouant un rôle clé dans la **prévention des infections bactériennes** (Kumar et al., 2019).

Le **mécanisme d'action des ZnNPs** repose sur la **perturbation de la membrane cellulaire bactérienne**, comme illustré à la **figure 4** (Gao et al., 2019a, b ; Mohd Yusof et al., 2020). Ajoutant à cela, il a été démontré que **les FeNPs améliorent significativement**

l'absorption digestive, favorisent **l'hématopoïèse** et renforcent **la réponse immunitaire** des poissons exposés à divers stress environnementaux. Leur **taille nanométrique facilite la pénétration cellulaire** et **optimise la biodisponibilité du fer**, ce qui permet d'obtenir des effets biologiques marqués à **des doses plus faibles** que les formes conventionnelles. Plusieurs travaux ont ainsi rapporté une **augmentation des taux d'hémoglobine**, des **globules rouges**, ainsi qu'une **amélioration des paramètres immunitaires** chez différentes espèces piscicoles ayant reçu un régime enrichi en FeNPs. Ces observations soutiennent l'idée que **les nanoparticules de fer représentent une voie prometteuse** pour améliorer **la résilience sanitaire** et **les performances de croissance** en aquaculture durable (Thangapandiyan & Monika, 2020 ; Khalil et al., 2022).

4. Synthèse verte des nanoparticules : une alternative écologique et durable

Traditionnellement, les **nanoparticules (NPs)** sont synthétisées à l'aide de méthodes **physiques et chimiques**, telles que la **réduction en solution** (Guzmán et al., 2009), la **décomposition thermique** (Navaladian et al., 2007), la **synthèse assistée par micro-ondes** (Sreeram et al., 2008), ou encore la **synthèse médiée par laser** (Zamiri et al., 2011). Bien que performantes, ces techniques nécessitent souvent une **consommation énergétique élevée**, utilisent des **agents réducteurs toxiques**, et génèrent des **résidus potentiellement nocifs** pour l'environnement et les organismes vivants (Tolaymat et al., 2010).

Face à ces limites, la **synthèse verte** s'est imposée comme une **approche innovante, éco-responsable** et de plus en plus prisée dans le domaine de la nanotechnologie. Cette stratégie repose sur la **réduction biologique** de sels métalliques par des extraits d'**organismes vivants** (plantes, champignons, bactéries, algues), riches en **métabolites secondaires** tels que les **phénols, flavonoïdes, tanins, enzymes et protéines** (Sastry et al., 2003). Ces molécules agissent simultanément comme **agents réducteurs** et **agents de stabilisation**, permettant la production de **nanoparticules biocompatibles, monodispersées et fonctionnalisées** dans des conditions opératoires douces, sans catalyseurs chimiques ni sous-produits toxiques.

Dans ce contexte, la **synthèse verte des nanoparticules de fer et de zinc (Fe/Zn-NPs)** suscite un intérêt croissant. Non seulement cette méthode respecte les exigences de **sécurité biologique** et d'**éco-conception**, mais elle permet également d'obtenir des NPs dotées de **propriétés bioactives renforcées**, notamment **anticancéreuses**, **antimicrobiennes** et **antioxydantes** (Bhattacharya & Gupt, 2005 ; Farooqui et al., 2010 ; Tolaymat et al., 2010). Ces caractéristiques ouvrent des perspectives prometteuses pour des applications en **aquaculture**, **santé humaine** et **biotechnologie**. Plus récemment, cette approche a été intégrée dans la fabrication de **nanoparticules métalliques à usage aquacole** (Ag, ZnO, Fe, Se), utilisées comme **agents antimicrobiens**, **vecteurs de nutriments**, ou encore **stimulateurs de croissance**. Elle permet, en outre, d'exploiter les **molécules végétales bioactives** contenues dans les extraits pour **potentialiser l'efficacité biologique** des nanoparticules synthétisées.

5. Intérêt pharmacologique des feuilles d'olivier (*Olea europaea*) dans la synthèse verte de nanoparticules

L'olivier (*Olea europaea*), plante emblématique du bassin méditerranéen, est depuis l'Antiquité reconnu non seulement pour sa valeur nutritionnelle, mais aussi pour ses vertus thérapeutiques. Le premier usage médicinal documenté de l'**extrait de feuilles d'olivier (OLE)** remonte à 1854, lorsqu'il fut employé avec succès dans le traitement des fièvres et du paludisme (Hanbury, 1854). Depuis, de nombreuses études ont mis en évidence les **propriétés antimicrobiennes puissantes de l'OLE**, notamment contre les **bactéries pathogènes**, les **champignons** et les **mycoplasmes** (Juven & Henis, 1970 ; Aziz et al., 1998 ; Bisignano et al., 1999 ; Furneri et al., 2002).

Par ailleurs, l'OLE possède une **activité antioxydante marquée** (Benavente-García et al., 2000 ; Caruso et al., 1999 ; Lee et al., 2009 ; Ziogas et al., 2010), ainsi qu'une **action anti-inflammatoire** démontrée (Visioli et al., 1998 ; de la Puerta et al., 2000). Il a également été montré que l'OLE **inhibe la réplication du VIH-1**, en bloquant à la fois la transmission cellulaire et l'infection aiguë (Lee-Huang et al., 2003), ce qui ouvre des perspectives intéressantes en virologie.

La richesse pharmacologique de l'OLE réside dans la présence de **composés phénoliques bioactifs**, en particulier l'**oléuropéine**, principal principe actif, et ses dérivés tels que l'**hydroxytyrosol**, le **tyrosol**, l'**acide caféique**, l'**acide p-coumarique**, l'**acide vanillique**, la **vanilline**, ainsi que plusieurs flavonoïdes (luteoline, diosmétine, rutine, luteoline-7-glucoside,

apigénine-7-glucoside et diosmétine-7-glucoside) (Bianco & Uccella, 2000 ; Farag et al., 2003). Ces molécules, par leur pouvoir antioxydant, chélateur et antibactérien, confèrent à l'OLE un **rôle clé dans la biotransformation et la stabilisation des nanoparticules métalliques**, notamment celles à base de fer et de zinc (Fe/Zn-NPs).

6. Cadre conceptuel et objectifs de l'étude

Dans le contexte actuel de lutte contre les infections multirésistantes en aquaculture, cette étude propose une approche innovante basée sur la **synthèse verte de nanoparticules de fer dopées au zinc (Fe/Zn-NPs)**, à partir d'extraits aqueux de **feuilles d'olivier (Olea europaea)**. Deux types de biomasse végétale ont été valorisés : les **feuilles vertes fraîches (FOV)** et les **feuilles déposées ou séchées (FOD)**.

Cette stratégie repose sur la capacité naturelle des **composés phénoliques** présents dans les feuilles d'olivier – notamment l'**oléuropéine**, l'**hydroxytyrosol** et divers **flavonoïdes** – à agir simultanément comme **agents réducteurs** et **agents stabilisants** des ions métalliques. Cela permet la formation contrôlée de **nanoparticules dopées, sans recourir à des substances chimiques nocives**.

Le choix du **dopage du fer par le zinc** vise à **améliorer les propriétés physicochimiques et biologiques** des NPs obtenues, en augmentant leur **biodisponibilité cellulaire**, leur **activité antimicrobienne**, ainsi que leur **stabilité colloïdale**. Le **zinc** est en effet reconnu pour son rôle central dans la **régulation enzymatique**, le **renforcement des défenses immunitaires** et le **maintien de l'intégrité membranaire**. Ainsi, la **synergie Fe/Zn** ouvre de nouvelles perspectives en matière de **biosécurité aquacole durable**.

Cette **nanosstructuration végétale**, développée ici **pour la première fois dans un contexte algérien**, constitue une **valeur ajoutée scientifique et environnementale**, en permettant de **valoriser les déchets végétaux de l'oléiculture** au sein d'une démarche de **bioéconomie circulaire**. Elle vise également à renforcer l'autonomie sanitaire des élevages piscicoles face aux pathogènes multirésistants.

7. Objectifs de l'étude

Le présent travail, intitulé « **Évaluation antimicrobienne des Fe/Zn-NPs d'olivier : étude in vitro et in vivo** », a pour objectifs de :

- **Synthétiser des nanoparticules bimétalliques Fe/Zn par réduction verte** à partir d'extraits de **FOV** et de **FOD**, et **caractériser** leurs propriétés physicochimiques (taille, morphologie, potentiel zêta, ratio Fe/Zn).
- **Évaluer leur activité antimicrobienne in vitro** contre des bactéries pathogènes aquacoles majeures (*Aeromonas hydrophila*, *Vibrio harveyi*, *E. coli*), via des tests de **zones d'inhibition, CMI, CMB, cinétiques de croissance, et tests antibiofilm**.
- **Analyser leur efficacité in vivo** chez *Oreochromis sp* soumis à un stress infectieux, en mesurant les **paramètres de croissance**, les **réponses hématologiques**, les **marqueurs de stress oxydatif**, les **lésions histologiques intestinales**, ainsi que les **résidus dans les tissus comestibles**.
- **Comparer les effets des NPs FOV et FOD**, afin de déterminer l'influence du type de biomasse végétale sur les propriétés biologiques des nanoparticules obtenues.

8. Problématique et justification

Malgré les progrès réalisés, plusieurs **zones d'ombre scientifiques** subsistent :

1. **Quel est le comportement synergique ou antagoniste du couple Fe/Zn sous forme nano** ? Si les formes isolées ont montré des effets bénéfiques, leur association pourrait induire des interactions **redox** complexes ou des effets **additifs ou inhibiteurs**, nécessitant une optimisation fine du ratio bimétallique.
2. **Quels facteurs influencent la synthèse verte** ? La nature de la biomasse végétale (fraîche ou séchée), les **paramètres physico-chimiques** (pH, température, concentration en polyphénols) modifient la **morphologie**, la **stabilité** et les **fonctions biologiques** des NPs.
3. **Quels résultats in vivo tangibles** ? La majorité des recherches restent **limitées à des essais in vitro**, sans validation chez l'animal ni données sur la **toxicocinétique**, l'**innocuité alimentaire** ou les effets sur la **santé piscicole**.