

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biotechnologie

Réf :.....

Mémoire

Présenté par

MOUACI Isma et MOULAI Kahina

Master Académique

Filière : Biotechnologie

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Thème

Biosynthèse de nanostructures d'argent par voie de levures, et évaluation de leurs activités antimicrobiennes et anti-biofilm.

Soutenu le :07/07/2025

Devant le Jury composé de :

Nom et Prénom	Grade	Qualité
Mme. BOUKTIT Nadia	MAA	Présidente
Mme. DJOUDER Zina	MAA	Examinatrice
M. BARACHE Nacim	MCA	Encadrant
M. BOUDJOUAN Fares	MCA	Co-encadrant

Année Universitaire : 2024/2025

Dédicaces

C'est avec une joie que je dédie ce modeste travail accompagné d'un amour à :

**Celle qui m'a arrosée de tendresse et d'espoir, a la source d'amour
incessible, à la mère qui m'encouragée toujours et qui m'a bénie par ces prières,
pour toi Yema taÆzizt.**

**À mon cher papa, mon support dans la vie pour son amour, ses sacrifices
et son soutien inconditionnel. Ce travail est aussi le sien à Vava aÆziz.**

**À mon frère et ma sœur, Yacine et Sarah piliers discrets de mon parcours,
je vous dédie ce travail qui est le fruit de tout ce que nous partageons, les éclats
de rire, les rêves d'enfant, les épreuves surmontées et cette tendresse fraternelle
qui ne s'éteint jamais.**

**À ma chère tante Zhor qui a été toujours a mes cotes avec bienveillance,
réconfort et force silencieuse. Merci du fond du cœur.**

**À ma chère et meilleure amie Sonia, pour son amitié précieuse et son
soutien tout au long de ce parcours.**

**À mon précieux binôme MOUACI Isma, avec qui j'ai traversée les défis
de ce parcours et partagée travail acharné rires efforts et réussite. Ce mémoire
t'est dédié de tout cœur.**

**Dieu merci pour la lumière sur mon chemin, la paix dans les épreuves, et
la force dans les silences et surtout ainsi que pour ma famille, dont le soutien
constant est un trésor dans mon existence.**

Kahina

Dédicaces

Je réserve une part précieuse de ce succès pour

Mes parents dont l'amour inconditionnel, les sacrifices et les prières ont toujours été mon soutien le plus précieux.

Vous êtes la racine de mon succès, et chaque effort que vous avez fourni pour mon éducation a porté ses fruits. Que Dieu vous protège et vous accorde la santé et la sérénité

Ma sœur Djida et mon frère Mouhand, votre présences rassurantes et complices dans chaque étape de ma vie. Votre affection et votre encouragement ont toujours été une source de réconfort et de motivation.

Tous mes oncles et tentes, cousins et cousines

Un remerciement particulier à ma tante Hamida pour sa tendresse, ses conseils avisés et son soutien indéfectible. Tu as toujours été un pilier important dans mon parcours.

Ma chère amie et binôme MOULAI kahina je te dédie une partie très spéciale de ce mémoire. Ton soutien, ta rigueur, ton optimisme et ton énergie positive ont rendu ce parcours non seulement supportable, mais aussi agréable. Sans toi, ces longues heures de travail auraient été bien plus difficiles. Merci pour ta confiance et notre belle collaboration.

Enfin, à mes amies celles qui ont été présentes dans les moments de joie comme dans les périodes de doute. Votre amitié est un trésor que je chérirai toujours.

Que Dieu vous bénisse tous et toutes, et qu'il comble vos cœurs de bonheur et de réussite

Isma

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à nos deux encadrants, Monsieur BARACHE Nacim et Monsieur BOUDJOUAN Fares, pour leur accompagnement exceptionnel tout au long de ce travail. Vous avez toujours été à nos côtés, disponibles à chaque étape, présents jusqu'aux heures les plus tardives, et cela, jusqu'à la dernière minute. Votre soutien constant a été une véritable force motrice dans la réussite de ce projet.

À Monsieur BARACHE Nacim, microbiologiste de grand savoir, nous souhaitons adresser des remerciements particuliers. Grâce à vous, nous avons appris à aimer la microbiologie, et à en comprendre les subtilités. Votre exigence constante nous a poussés à donner le meilleur de nous-mêmes et a largement contribué à cette réussite.

À Monsieur BOUDJOUAN Fares chimiste passionné et profondément humain nous vous remercions pour votre encadrement généreux et inspirant, Vous nous avez appris à faire, mais surtout à être. Vos conseils avisés sur les bonnes pratiques de laboratoire, et votre rigueur scientifique ont été pour nous une source d'inspiration quotidienne. Votre accompagnement ne s'est pas limité à la science ; il a été aussi un véritable apprentissage du professionnalisme, de l'éthique et de la persévérance.

Nous tenons à remercier Monsieur ZEGHBIB Walid pour sa contribution dans la réalisation de ce travail et pour le temps qu'il a consacré afin de nous accompagner, nous orienter et partager avec nous ses précieuses connaissances tout au long de ce projet.

Nous tenons également à remercier sincèrement Madame BOUKTIT Nadia et Madame DJOUDER Zina, membres du jury, pour le temps qu'elles ont consacré à l'évaluation de notre travail. Leurs remarques constructives et leur regard éclairé ont apporté une valeur ajoutée précieuse à cette expérience.

Liste des tableaux

Tableau I:Composition des solutions de biosynthèse des NPs par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F6 et <i>Kluyveromyces. marxianus</i> GBC2et l'intervalle de temps correspondant. (BN : Bouillon nutritif, EP, Eau physiologique, ED : Eau distillée).....	12
Tableau II: Expériences d'optimisation des paramètres influençant la biosynthèse des nanostructures d'argent.	14
Tableau III : Témoins réalisés pour le test ABTS	16
Tableau IV: Témoins réalisés pour le tes FRAP	17
Tableau V : Témoins réalisés pour le test NO	17
Tableau VI : Témoins réalisés pour le test d'activité antidiabétique	20
Tableau VII: Résultats d'absorbance à la DO ₆₃₀ des souches <i>S. cerevisiae</i> F6, <i>K. marxianus</i> GBC2.	21
Tableau VIII: Résultats du dénombrement réalisé pour <i>S. cerevisiae</i> F6, <i>K. marxianus</i> GBC2.	21
Tableau IX: Diamètres des zones d'inhibition des 15 expériences réalisées. (Config : Configuration, mm : diamètre des zones d'inhibition)	24
Tableau X : résultats de l'analyse de la variance	24
Tableau XI: Résultat du défaut d'ajustement.....	25
Tableau XII: Résultats des tests d'inhibition du radical ABTS	28
Tableau XIII : Résultats des concentrations des échantillons en équivalent TROLOX pour test de FRAP.....	29
Tableau XIV : Moyenne d'inhibition de l'oxyde nitrique par les échantillons testés, <i>K. marxianus</i> V ; <i>K. marxianus</i> M ; R12 ET AgNO ₃	29
Tableau XV: Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cibles pathogènes par les nanostructures d'argent.	30
Tableau XVI : Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cibles <i>E. coli</i> (ATCC25922), <i>S. aureus</i> (ATCC 25933) et <i>C. albicans</i> (ATCC 10231) par les nanoparticules d'argent colloïdales.	32
Tableau XVII: Pourcentages d'inhibition de l'enzyme alpha-amylase	36

Liste des figures

Figure 1: Classification des nanoparticules	2
Figure 2: Méthodes de synthèse des Nanoparticules	3
Figure 3 : Mécanismes de la biosynthèse des nanoparticules métalliques.....	7
Figure 4 :Mécanismes d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent	10
Figure 5 : Résultat de l'activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par <i>S.cerevisiae</i> F6 et <i>K.marxianus</i> GBC2 dans l'ED à 72h, tel que : (a et d : <i>E. coli</i> (ATCC25922)), (b et e : <i>S. aureus</i> (ATCC25933)) et (c et f : <i>C. albicans</i> (ATCC 10231)).	22
Figure 6 : Graphique de validation du model statistique par Box Bhenken des diamètres d'inhibition des souches pathogènes (a: <i>E . coli</i> , b: <i>S. aureus</i> , c : <i>C. albicans</i> , d: <i>B.subtilis</i>).....	25
Figure 7: Spectre infrarouge de <i>K.marxianus</i> GBC2 (km) et la suspension des nanostructures (AAgNPs Km).....	27
Figure 8: analyses spectroscopiques UV-visible de <i>K.marxianus</i> GBC2 (km) et la suspension des nanostructures (AgNPs Km)	28
Figure 9 : Histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition des cibles (a) <i>C.albicans</i> (b) <i>E.coli</i> (c) <i>S.aureus</i> (d) <i>B.subtilis</i> par les nanostructures d'argent issue de <i>K.marxianus</i> . GBC2...	31
Figure 10: Activité antimicrobienne inhibitrice des nanostructures d'argents réalisée par test de puits contre <i>S.aureus</i> , <i>E.coli</i> et <i>C.albicans</i>	32
Figure 11 : Histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition des cibles (a) <i>E.coli</i> (ATCC25922),(b) <i>S.aureus</i> (ATCC 25933), (c) <i>C.albicans</i> (ATCC 10231) par les nanoparticules d'argent issue du surnageant de <i>K.marxianus</i> . GBC2.....	33
Figure 12 : Caractérisation de l'adhésion des souches pathogènes sur microplaque en polystyrène de 96 puits	35

Sommaire

INTRODUCTION.....	1
ETAT DE L'ART.....	2
I. Généralités sur les nanoparticules	2
II. Synthèse des Nanoparticules	3
II.1. Biosynthèse des nanoparticules.....	4
II.2. Biosynthèses des nanoparticules par les champignons	4
III. Propriétés physicochimiques et biologiques des nanoparticules d'argent.....	8
MATERIEL ET METHODES	11
I. Revivification et standardisation des souches microbiennes	11
II. Biosynthèse des nanostructures d'argent par <i>S. cerevisiae</i> F6 et <i>K. marxianus</i> GBC2.....	12
III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par <i>S. cerevisiae</i> F6 et <i>K. marxianus</i> GBC2 en milieux BN, ED et EP	13
IV. Optimisation des conditions de biosynthèse des nanoparticules d'argent	13
IV.1. Production de la biomasse de <i>K. marxianus</i> GBC2	13
IV.2. Optimisation par plan d'expériences.....	13
V. Caractérisation des nanostructures d'argent.....	15
V.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR.....	15
V.2. Caractérisation spectroscopique UV-Visible	15
VI. Evaluation de l'activité antioxydante	15
VI.1. Test ABTS	16
VI.2. Test FRAP.....	16
VI.3. Test de réduction d'oxide nitrique (NO)	17
VII. Activités biologiques.....	17
VII.1. Evaluation de l'activité antibactérienne	17
VII.2. Détermination de l'activité anti-biofilm.....	19
VII.3. Test antidiabétique de la Alpha amylase.....	19
RESULTAS ET DISCUSSION	21

I.	Résultat de la standardisation des levures.....	21
II.	Activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par <i>S. cerevisiae</i> F6 et <i>K. marxianus</i> GBC2 en milieux BN, ED et EP	21
III.	Résultats d'optimisation des paramètres de biosynthèse des nanostructures d'argent.....	24
IV.	Caractérisation physico-chimique des nanostructures d'argent	26
IV.1.	Analyse des spectres FTIR.....	26
IV.2.	Analyse des spectres UV-Visible.....	27
V.	Evaluation de l'activité antioxydante	28
V.1.	Test ABTS	28
V.2.	Test FRAP.....	29
V.3.	Test de NO	29
VI.	Résultats des activités biologiques.....	30
VI.1.	Activité antimicrobienne.....	30
VI.2.	Activité anti-biofilm des nanostructures d'argent	34
VI.3.	Test antidiabétique de la alpha-amylase.....	36
CONCLUSION.....		37

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANNEXE

INTRODUCTION

Introduction

Ces dernières années, le nombre de pathogènes présentant une multirésistance aux antibiotiques a connu une augmentation exponentielle. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) classe la résistance aux antibiotiques parmi les dix principales menaces pesant sur la santé mondiale (**Elshobary et al., 2025**). Un grand nombre de bactéries sont identifiées comme multirésistantes, entraînant des coûts élevés de gestion, notamment en traitements, en formation du personnel, en matériel d'isolement, ainsi que des pertes de productivité. Par exemple, aux États-Unis, le coût du traitement conventionnel de la tuberculose due à une souche sensible aux antibiotiques est estimé à 17 000 dollars, contre un coût allant jusqu'à 482 000 dollars pour le traitement d'une souche multirésistante (**Barros et al., 2018**).

Cette crise souligne l'urgence de mettre en œuvre une utilisation responsable et rationnelle des antibiotiques, de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques et de poursuivre les recherches afin de limiter la propagation de la résistance aux antimicrobiens. Les nanostructures d'argent biosynthétisées peuvent-elles être une alternative et pallier ce problème ?

Des auteurs tel que **Rodrigues et al.,(2024)**, ont rapporté que les nanoparticules d'argent (AgNP) sont décrites dans la littérature comme possédant un large spectre biocide, couvrant les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, les champignons, les virus et les mycobactéries.

La synthèse verte de nanoparticules à base de microorganismes et de plantes est une nouvelle approche respectueuse de l'environnement, caractérisée par une réduction de la consommation d'énergie et de produits chimiques. Cette approche est préférée aux méthodes chimiques et physiques conventionnelles (**Răut et al.,2024**), et contribue également à réduire significativement leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules saines (**Salem et al. 2020**).

Parmi les microorganismes utilisés dans la biosynthèse des nanoparticules, les levures en particulier les souches probiotiques suscitent un intérêt croissant de la part des chercheurs. Ces microorganismes peuvent produire une grande quantité de nanoparticules, en raison de leur vitesse de croissance rapide. Ceci permet d'obtenir un meilleur rendement en biomasse et en protéines, favorisant ainsi un potentiel de biosynthèse par voie extra et intracellulaire et une meilleure stabilité (**Fath-Alla et al.,2024**).

Notre manuscrit est scindé en trois chapitres, structurés comme suit: le premier chapitre aborde les différents travaux qu'ont traité à la synthèse des nanoparticules. Quant au deuxième chapitre, la méthodologie scientifique ainsi que le matériel utilisé dans le cadre de cette étude ont été présentés afin de répondre à la problématique posée. Enfin, dans le dernier chapitre les résultats obtenus ont été discutés et comparés à d'autres travaux scientifiques.

Chapitre I

Etat de l'art

Etat de l'art

I. Généralités sur les nanoparticules

Les nanoparticules constituent l'unité de base dans la fabrication des nanostructures. (Horikoshi et Serpone,2013).Ce sont des structures définies comme des dispersions particulières solides de dimensions nanométriques, généralement comprises entre 1 et 100 nanomètres (Gahlawat et Choudhury.,2019).Elles présentent une grande diversité de forme, de taille et de structure, pouvant être sphériques, cylindriques, coniques, tubulaires, à cœur creux, en spirale ou encore de formes irrégulières (Anu Mary Ealia et Saravanakumar 2017). À cette échelle, les nanoparticules présentent des propriétés physicochimiques et biologiques uniques, distinctes de celles observées à des tailles plus grandes. Ces caractéristiques incluent un rapport surface/volume spécifique élevée, une activité catalytique, et des propriétés optiques, magnétiques ou électroniques uniques. Ce qui les rend particulièrement intéressantes pour de nombreuses applications, notamment en biotechnologie, en médecine, dans les secteurs pharmaceutique et agricole (Joudeh et Linke 2022).

Ces nanostructures peuvent être classées selon leur morphologie, dimension, degré d'uniformité, leur tendance à s'agglomérer ainsi que leur composition (Roychoudhury 2020).Selon cette dernière on distingue trois catégories principales de nanoparticules : organiques, inorganiques et à base de carbone comme le montre la **Figure 1** chacune présentant des avantages et des inconvénients spécifiques (Eker et al.,2024).

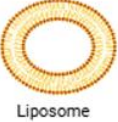
Nanoparticules organiques	Nanoparticules inorganiques	Nanoparticules à base de Carbone
 Liposome	 Silice	 Fullerène
 Lipide solide	 Oxyde de zinc / dioxyde de zirconium	 Point quantique
 Polymerique	 Oxyde de fer	 Graphène
 A base de protéines	 Oxyde de titane	 Carbone noir
 A base de glucides	 Or	
 Transporteur lipidique nanostructuré	 Argent	
Avantage : Libération contrôlée. Inconvénient : Résistance thermique et chimique limitée.	Avantage : Activité catalytique. Inconvénient : Problème de toxicité.	Avantage : Stabilité chimique. Inconvénient : Défis d'agrégation et de dispersion.

Figure 1: Classification des nanoparticules[Source : traduite à partir de Eker et al.,2024)]

Parmi les nanoparticules inorganiques, les nanoparticules d'argent (AgNPs) occupent une place particulière grâce à leurs propriétés physicochimiques (Liu et al.,2021), anti-inflammatoires bien établies (Kaler et al 2013)et aussi par rapport au faible coût de leur synthèse, leur durabilité

environnementale, et le plus remarquable, est leur activité antimicrobienne à l'égard des microorganismes multirésistants aux antibiotiques tout en étant non cytotoxiques à faible concentration vis-à-vis des cellules saines de l'hôte. Les applications des AgNPs se sont étendues à des domaines innovants tels que le domaine énergétique (Klau Joergr *et al.*, 2001) et même dans le traitement des eaux usées et des déchets biologiques (Abbas *et al.*, 2024; Krishna *et al.*, 2024).

II. Synthèse des Nanoparticules

La **Figure 2** présente les différentes méthodes de synthèse de nanoparticules. L'approche physique est également appelée approche top-down (de haut en bas), tandis que les approches chimiques et biologiques sont regroupées sous le terme d'approche bottom-up (de bas en haut) (Altammar 2023). Les approches « top-down », consistent à transformer des matériaux massifs en petites particules, qui ont l'avantage de produire de grandes quantités de nanoparticules, mais nécessitent beaucoup d'énergie ainsi que des investissements coûteux en équipements (Jiang et al. 2022) Dans l'approche bottom-up (de bas en haut), les nanoparticules peuvent être synthétisées à l'aide de méthodes chimiques et/ou biologiques par l'auto-assemblage d'atomes pour former de nouveaux noyaux, qui se développent ensuite en particules de taille nanométrique (Ahmed *et al.*, 2016)

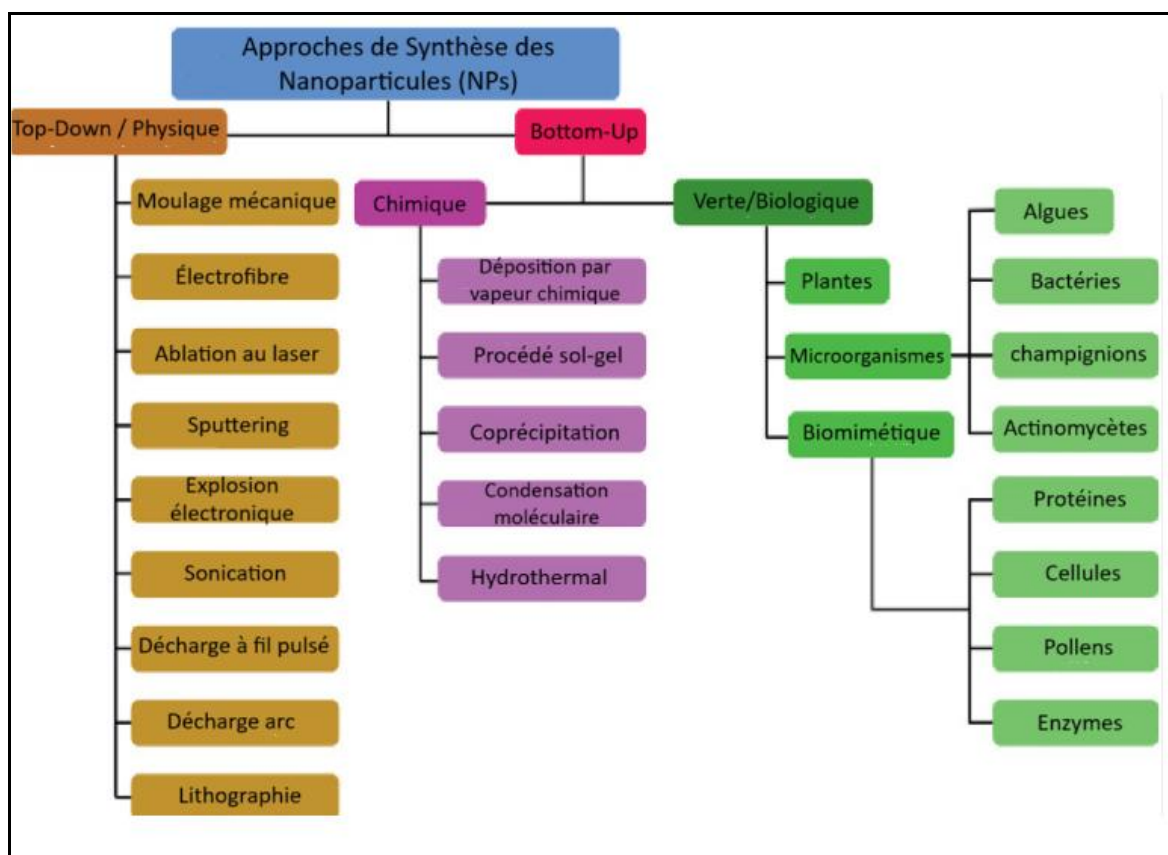


Figure 2: Méthodes de synthèse des Nanoparticules [Source : traduite à partir de Altammar 2023]

II.1. Biosynthèse des nanoparticules

Bien que les méthodes de synthèse chimique et physique des nanoparticules d'argent (AgNPs) soient largement utilisées, la toxicité et la pollution causées par les produits chimiques doivent être soulignées, et une attention plus grande devrait leur être accordée (**Xu et al.,2020**). Ces approches de synthèse nécessitent l'utilisation d'agents réducteurs, stabilisants ainsi que des réactifs toxiques. Cependant, en raison de la toxicité qui leur est associée, ils affectent négativement les organismes vivants ainsi que l'environnement, posant ainsi diverses limitations à leur utilisation (**Jain et al., 2021**). C'est pour cela l'approche de la chimie verte est d'une importance capitale pour l'avenir des nanomatériaux. Ce domaine devrait aboutir au développement de nanoparticules (NPs) sûres et écologiques et largement acceptées dans le domaine de la nanotechnologie(Gour et Jain 2019).

La synthèse verte est définie comme l'utilisation d'éléments biologiquement respectueux de l'environnement, tels que les plantes, les bactéries et les champignons...etc., pour la synthèse de nanoparticules. Ces approches biologiques innovantes sont dépourvues d'inconvénients associés aux méthodes conventionnelles de synthèse (**Asif et al.,2022**).

De nombreux chercheurs ont exploités cette approche notamment **Tran Khac et al.(2023)**qui ont mis en évidence la synthèse écologique de nanoparticules d'argent à partir d'extraits de thé vert, illustrant leur potentiel en tant qu'agents antibactériens puissants et respectueux de l'environnement, tout en offrant une solution innovante pour la dépollution des eaux contaminées par des colorants organiques tels que le bleu de méthylène, issu.de l'industrie de textile.

Un autre exemple de biosynthèse des nanoparticules d'argent (AgNPs) à partir des déchets est présenté par **Santhosh et al. (2021)** qui ont réussi à synthétiser des AgNPs à partir des épluchures d'oignon qui présentent une activité remarquable à l'égard de l'espèce *Staphylococcus aureus*, sans avoir recours à aucun matériel toxique.

De nombreuses études ont montrés que les microorganismes comme les bactéries, peuvent produire diverses nanoparticules inorganiques notamment des AgNPs (**Cekuolyte et al., 2023; Punjabi et al., 2017,Karageorgou et al., 2022**). Il a été rapporté que des nanoparticules d'argent très stables et bien dispersées (de 40 à 50 nm) pourraient être synthétisées à l'aide du surnageant de culture d'une bactérie non pathogène, *Bacillus licheniformis* (**Iravani et al., 2014**).

II.2. Biosynthèses des nanoparticules par les champignons

En plus des bactéries et les plantes, les champignons sont aussi largement utilisés et considérés comme étant une excellente source de nombreuses enzymes extracellulaires qui sont impliqués dans la biosynthèse des nanoparticules (**Torimiro et al., 2021**).Ce qui a été confirmé par les travaux de (**Räut et al., 2024**) en utilisant des champignons tels que *Cladosporium*, *Penicillium*,

qui ont permis d'obtenir des AgNPs stables et efficaces contre plusieurs pathogènes tels que *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* avec un potentiel thérapeutique important.

Comme les moisissures, les levures font aussi l'objet d'études de plusieurs travaux en ce qui concerne la biosynthèse des NPs. Elles se distinguent par leurs croissances rapides, ainsi que la plupart des levures sont écologiques, non toxique, et possèdent une capacité de bioaccumulation intéressante pour la production des nanoparticules avec une efficacité élevée et cout réduit. De plus, les levures utilisent divers mécanismes pour la synthèse et la stabilisation des nanoparticules ce qui entraîne des différences en termes de taille et de forme (**Fath-Alla et al., 2024**).

Les cellules de levures s'adaptent aux conditions de toxicité métallique en utilisant divers mécanismes de détoxification telle que la bio-précipitation, la chélation et le piégeage intracellulaire (**Gahlawat et Choudhury 2019**). Ces caractéristiques uniques des levures ont attiré l'attention de plusieurs chercheurs et ils ont mis l'accent sur l'utilisation des levures probiotiques à l'exemple de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) et *Kluyveromyces marxianus* (*K. marxianus*), qui ont été définies actuellement comme « des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés à des charges appropriées, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte » (**Manshin et al., 2025**). Bien que *K. marxianus* n'a pas reçu autant d'attention que d'autre espèces de *Kluyveromyces* mais elle possède un potentiel biotechnologique considérable (**Kazemi et al. 2025**). Elle a été identifiée pour la première fois comme une levure appartenant au genre *Saccharomyces* et a été nommée *Saccharomyces .marxianus*. L'espèce a ensuite été transférée au genre *Kluyveromyces* et depuis, 45 espèces ont été classées dans ce genre (**Ahasanul Karim et al., 2020**). Des recherches suggèrent que *K. marxianus* produit une large gamme de métabolites distincts qui peuvent être utiles aux secteurs de l'alimentation et de la biotechnologie, et qu'elle peut être tolérante à l'acide gastrique et à la bile, lui permettant de survivre dans le tube digestif et d'atteindre les intestins (**Tullio 2024**). De plus, cette levure est remarquable par sa croissance extrêmement rapide, pouvant atteindre une vitesse de croissance allant jusqu'à 0,99/h à 40°C, ce qui dépasse largement celle de nombreuses autres cellules eucaryotes de plus sa thermotolérance lui confère la faculté de se développer efficacement à des températures allant de 40°C à 50°C, permettant la réduction de risque de contamination (**Reina-Posso et Gonzales-Zubiate 2025**).

Les nanoparticules d'argent biosynthétisées ont démontrées une forte activité antimicrobienne contre des pathogènes multi-résistants comme *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) et *Candida albicans* (*C. albicans*) illustrant leur potentiel en nanomédecine (**Ashour 2014**). Contrairement à *K. marxianus*, *S. cerevisiae* est le modèle le plus étudié que ce soit dans la synthèse extra ou intracellulaire des nanoparticules d'argent. Pour la synthèse extracellulaire des études ont été faites par **Colleselli et al. (2024)**, en utilisant les extraits de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* DSM 1333 qui offrent plusieurs avantages, notamment la simplicité de

purification et la réduction des efforts liés à la lyse cellulaire. D'autres chercheurs ont aussi réalisé une biosynthèse des nanoparticules d'argent, en utilisant le surnageant contenant les métabolites sécrétés par la levure *S. cerevisiae* ou la biosynthèse a été révélée par un changement de couleur (Kthiri *et al.* 2021).

II.2.1. Mécanisme de biosynthèse des nanoparticules d'argent

La biosynthèse des nanoparticules métalliques n'est pas présente chez tous les microorganismes, en raison de leur voie de synthèse métabolique où intervient des enzymes cellulaires spécifiques dont certains microorganismes ne les possèdent pas. Par ailleurs, la synthèse de nanoparticules métalliques dépend de la capacité des microorganismes à tolérer les métaux lourds (Bahrulolum *et al.* 2021).

La biosynthèse de ces nanoparticules, comme illustré sur la **Figure 3**, peut être réalisée soit au niveau extracellulaire ou bien intracellulaire du microorganisme (Mohd Yusof *et al.*, 2019). La voie intracellulaire, implique des systèmes de transport uniques où la paroi cellulaire joue un rôle important en raison de sa charge négative qui attire par interactions électrostatiques les ions métalliques chargés positivement et les introduit par la suite à l'intérieur de la cellule pour qu'ils subissent une réduction par des enzymes telles que la nitrate réductase pour former des nanoparticules métalliques (MtNPs). Ces NPs accumulés dans l'espace périplasmique peuvent ensuite être transportées à travers la paroi cellulaire et sortir vers l'environnement extérieur (Tiquia-Arashiro et Rodrigues 2016). Contrairement à la voie intracellulaire, la voie extracellulaire implique le piégeage des ions métalliques par l'enzyme réductase qui est une enzyme dépendante de nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) et qui peut se retrouver au niveau de la paroi cellulaire ou bien sécrétée à l'extérieur afin de les réduire en forme métallique et former des nanoparticules métalliques (Nain *et al.*, 2025).

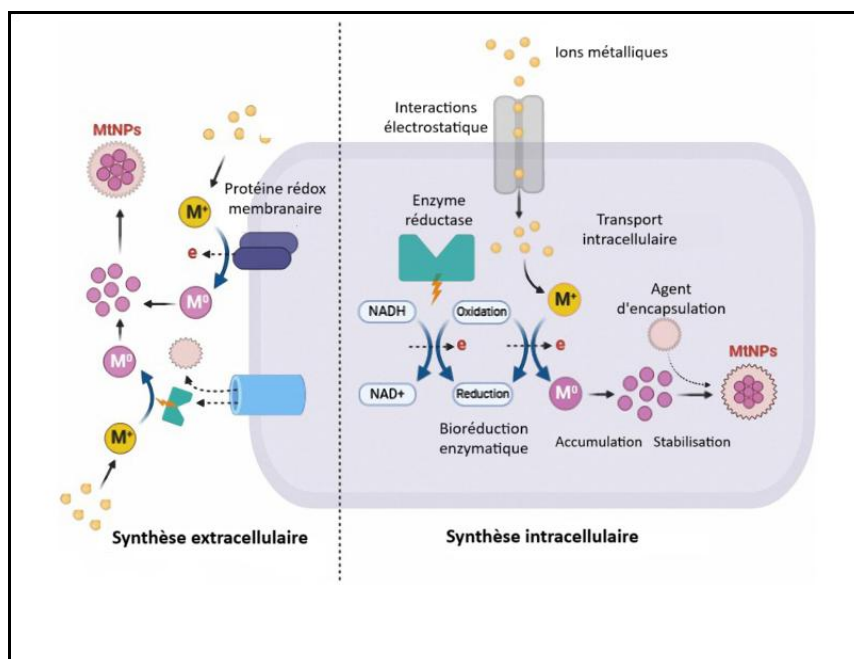


Figure 3 : Mécanismes de la biosynthèse des nanoparticules métalliques [Source : traduite à partir de **Bahrulolum et al. 2021**].

Les AgNPs sont principalement produites par réduction de sels d'argent tels que le perchlorate d'argent (AgClO_4) et le tétrafluoroborate d'argent (AgBF_4) le nitrate d'argent (AgNO_3), (Swebocki et al. 2023), ce dernier est couramment utilisé comme précurseur dans la biosynthèse des nanoparticules d'argent en raison de sa solubilité élevée dans l'eau et de sa capacité à libérer facilement des ions d'argent (Ag^+). Ces ions sont essentiels à la formation des AgNPs, car ils sont réduits en atomes d'argent (Ag^0) par des agents réducteurs d'origine biologique, tels que les extraits de plantes, les microorganismes ou leurs métabolites qui s'agrègent finalement pour former des nanoparticules d'argent (**Almatroudi 2020**). Plusieurs études ont montré qu'une concentration élevée en AgNO_3 entraînait une augmentation de la taille des cristallites et de la taille des AgNPs (**Htwe et al., 2019**).

II.2.2. Paramètres influençant la biosynthèse des AgNPs

Il existe plusieurs facteurs environnementaux influençant la croissance et les métabolites des microorganismes notamment les levures. Afin d'avoir un taux élevé de croissance et un bon rendement de biosynthèse d'AgNPs avec de meilleures caractéristiques biologiques, morphologiques et biochimiques, plusieurs paramètres ont été optimisés. Spécifiquement, la concentration en nitrate d'argent, qui joue le rôle de précurseur, ainsi que le pH et la température d'incubation lors de la biosynthèse des AgNPs (**Saleem et al., 2020**).

Alves et Murray (2022), ont conclu qu'une température élevée comme 90°C augmente la vitesse de synthèse, ce qui favorise la formation de nanoparticules plus petites et plus uniformes, mais doit être utilisée avec précaution pour éviter la dégradation des métabolites bioactifs. Selon

Deirram et al.(2019), le pH joue un rôle crucial dans la biosynthèse des nanoparticules d'argent. Il est mentionné que la variation de ce dernier influence l'état d'ionisation des biomolécules réductrices, ce qui affecte leur capacité à réduire les ions d'argent (Ag^+) en nanoparticules d'argent (Ag^0). À pH basique, la réduction est facilitée en raison de la déprotonation des groupes fonctionnels, favorisant la formation de nanoparticules plus petites et homogènes. En revanche, à pH acide, la protonation limite l'activité réductrice, ce qui peut conduire à des particules plus grosses ou moins stables.

Concernant l'étude menée par **Sobczak-Kupiec et al. (2011)**, ils ont pu constater que l'augmentation de la concentration en AgNO_3 , le taux de nucléation des particules d'argent atteint un niveau optimal. Il a également été observé que les nanoparticules d'argent ont tendance à s'agréger pour former des particules plus grandes, en raison de l'augmentation de la fréquence des collisions lorsque la teneur en sel d'argent croît.

III. Propriétés physicochimiques et biologiques des nanoparticules d'argent

Plusieurs propriétés physicochimiques peuvent être identifiées notamment: la taille des AgNPs qui influence de manière significative le rapport surface-volume des atomes constituant ces nanoparticules, ce qui détermine leur réactivité physico-chimique et leur activité antibactérienne (**Abbas et al., 2024 ;Duman et al., 2024**).

En plus des propriétés physicochimiques, leurs propriétés optiques occupent une place centrale, notamment en raison de leur capacité à absorber la lumière sur une large gamme de longueurs d'onde, ce qui les rend utiles dans de nombreuses applications (**Mohamed Fahmy et al.,2019**).

En parallèle, les propriétés biologiques sont aussi prometteuses notamment l'activité antibactérienne, antifongique, anti-biofilm, et autres. Actuellement, les nanoparticules d'argent sont largement utilisées comme agents antibactériens grâce à leur efficacité contre un grand nombre de bactéries (**Bamal et al., 2021**), ainsi contre les cellules fongiques qui absorbent facilement les nanoparticules d'argent en raison de leur petite taille ,ce qui perturbe leurs parois cellulaires et provoque leur lyse (**Koduru et al., 2018**).De plus les nanoparticules d'argent sont devenues des candidates importantes comme agents antiviraux, cela rend crucial le développement d'alternatives sûres et efficaces aux traitements antiviraux courants (**Bamal et al., 2021**).

Ces nanoparticules peuvent former un nanocomposite, qui est décrit comme un matériau composé de plusieurs phases, dont au moins une d'elles possède une structure à l'échelle nanométrique, ce qui lui confère des propriétés uniques et le rendent un concurrent potentiel contre divers agents thérapeutiques synthétiques (**Raza et al., 2021**).

Les nanocomposites métalliques suscitent un grand intérêt, non seulement en raison de leur polyvalence, mais aussi pour leur biodégradabilité et leur biocompatibilité (**Al-Jumaili et al., 2019**). Les nanocomposites à base de nanoparticules d'argent et de chitosan présentent une activité antimicrobienne significative, notamment contre des bactéries pathogènes telles que *Enterococcus faecalis*. De plus, leur faible toxicité pour les cellules mammifères, comme les fibroblastes NIH/3T3, suggère qu'ils peuvent être utilisés en tant que nanomédicaments ou vecteurs de livraison de médicaments, tout en étant sûrs pour l'organisme (**Raza et al., 2021**).

Bien que la propriété antimicrobienne des nanoparticules d'argent soit la plus étudiée, leur mécanisme d'action reste encore en partie non élucidé (**Vanlalveni et al. 2024**). La littérature soutient principalement trois mécanismes, illustrés dans la **Figure 4**, qui ont été observés ensemble ou séparément, par lesquels les AgNPs exercent leurs actions antibactériennes. Le premier postule que ces nanoparticules s'accumulent au sein de la membrane et diffusent également à l'intérieur des cellules, provoquant une dénaturation des membranes ou de la paroi bactérienne (**Abada et al., 2024**), augmentant ainsi la perméabilité de la membrane et induisant une fuite du contenu cellulaire et par conséquent sa lyse. Le deuxième mécanisme propose que les protéines soufrées puissent s'attacher à la membrane cytoplasmique et à la paroi cellulaire en raison de leur attraction électrostatique et de leur affinité pour les ions d'argent. Ces ions liés augmentent la perméabilité de la membrane cytoplasmique, entraînant la rupture de la cellule bactérienne. Ensuite, après l'absorption des ions d'argent libres par la cellule, les enzymes respiratoires peuvent être désactivées, entraînant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi qu'une interruption de la production d'adénosine triphosphate (ATP) (**Vanlalveni et al. 2024**). En outre, les AgNPs auront une affinité pour interagir avec des groupes soufrés ou phosphorés, présents dans le contenu intra cellulaire tels que l'ADN et les protéines modifiant leur structure et leurs fonctions. Alors que le troisième mécanisme consiste à l'effet synergique des deux derniers (**Bruna et al., 2021**).

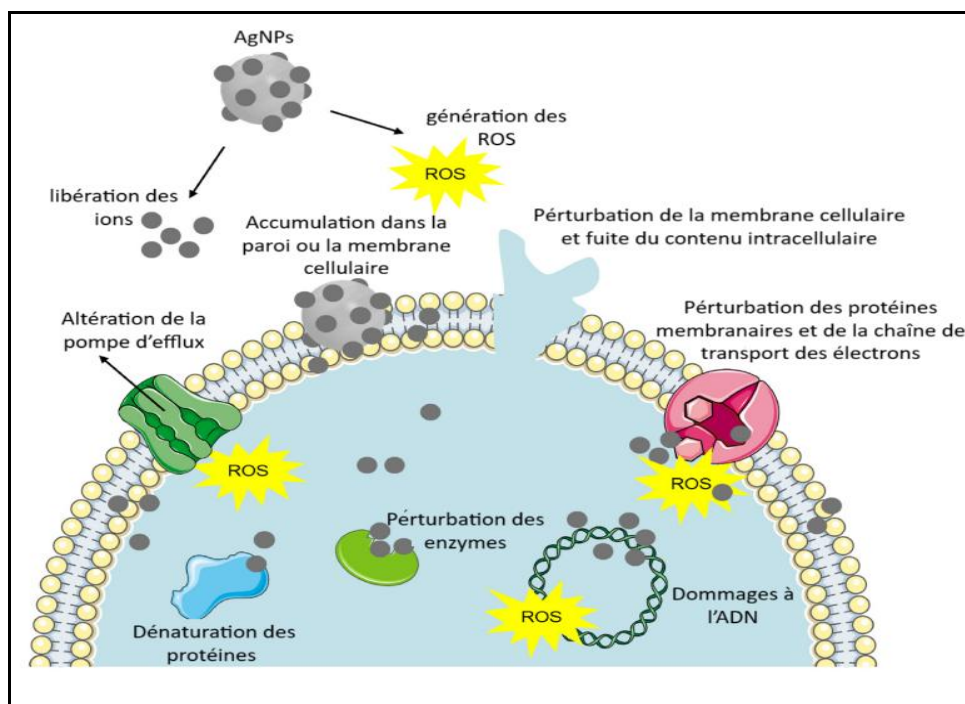


Figure 4 : Mécanismes d'activité antibactérienne des nanoparticules d'argent [Source : traduite à partir de **Sani Aliero et al., 2025**].

En effet, la charge surfacique des AgNPs peut jouer un rôle dans la capacité de ces dernières à diffuser à travers la matrice du biofilm ce qui leur permet d'atteindre les cellules bactériennes et de les inhiber (**Qiao et al., 2019**). Le mécanisme clé de l'activité anti-biofilm des AgNPs est la génération des ROS qui induisent un stress oxydatif intracellulaire en augmentant leur niveau, ce qui endommage l'ADN, les lipides membranaires et les protéines, compromettant ainsi la viabilité cellulaire et la formation de biofilms (**Kaweeteerawat et al. 2017**). Aussi, les AgNPs ont montré une activité antimicrobienne en perturbant l'intégrité de la membrane cellulaire bactérienne menant à la fuite de contenu cellulaire et à la mort cellulaire comme elles exercent leur activité d'anti-biofilm en empêchant l'adhésion de cellules bactériennes sur des surfaces ou en endommageant les forces intermoléculaires. Il a également été prouvé que les AgNPs pouvaient inhiber le quorum sensing (**Swidan et al., 2022**).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Revivification et standardisation des souches microbiennes

Dans cette étude, les souches utilisées pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent sont *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2, isolées respectivement à partir des figues fraîches et de grenades. Ces levures font partie de la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA), et ont été préalablement caractérisées pour leur potentiel probiotique (**Barache et al. 2024**). La revivification des souches de levures a été réalisée à partir de cultures conservées dans du bouillon Sabouraud (Equiprolab, Algérie) à 20% de glycérol à -80°C. Un volume de 200 µL de chaque souche ont été transférés dans des tubes contenant 9 mL de bouillon Sabouraud et incubés à 37°C pendant 48h. Ensuite, les suspensions de levures ont été repiquées sur gélose Sabouraud chloromphénicol (Equiprolab, Algérie) et incubées à 37°C pendant 48h.

En ce qui concerne les souches pathogènes, une revivification a été également effectuée en introduisant un volume de 200µl dans 9mL du bouillon nutritif (BN) (TM MEDIA, Inde). Par la suite, un repiquage a été réalisé sur les géloses appropriées, selon les modalités suivantes : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25933) sur gélose Chapman (Equiprolab, Algérie); *Escherichia coli* (ATCC 25922) gélose Eosine Méthylène Bleu (EMB) (Equiprolab, Algérie), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) sur gélose nutritive (Liofilchem, Italie) et *Candida albicans* (ATCC 10231) dans du Sabouraud chloromphénicol (Equiprolab, Algérie). Par la suite les boîtes de Pétri ont été incubées à 37°C pendant 48h.

Après incubation, une observation microscopique a été réalisée. Pour les bactéries une coloration de Gram a été effectuée, tandis qu'une coloration au bleu de méthylène a été utilisée pour les levures. Les préparations ont ensuite été observées au microscope optique à un grossissement de $\times 100$ afin de vérifier la pureté des souches. Une fois la pureté des souches *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 est confirmée, une standardisation est réalisée par deux méthodes, dénombrement à partir d'une série de dilutions décimales et par la mesure de l'absorbance. Pour cela, des cultures de 18 h, ont été préparées en ensemençant une colonie de chaque souche *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 dans des tubes de 10 mL du bouillon Sabouraud, ensuite incubés à 37 °C pendant 18 h. Après incubation, l'absorbance des tubes des solutions mères jusqu'aux dilutions 10^{-3} pour chaque souche a été mesurée à une longueur de 630nm en commençant par la dilution la moins chargée vers la plus chargée. En parallèle, la suspension de *K. marxianus* GBC2 a servi de solution mère pour réaliser des dilutions décimales en série jusqu'à 10^{-6} . Un volume de 100 µL de chaque dilution a été ensemencé en masse dans la gélose Sabouraud chloromphénicol à raison de deux boîtes de Pétri par tube.

Afin d'évaluer la charge initiale, un dénombrement des colonies est effectué et le résultat est donné par la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + (0.1 \times n_2)d)} \text{ UFC/mL}$$

Avec:

N: Nombre de colonies viable

C: colonies

V: volume de la dilution

n₁: Nombre de boîtes de la 1^{ère} dilution

n₂: Nombre de boîtes de la 2^{ème} dilution

d: Dilution

UFC / mL: Unités formant colonies par millilitre.

II. Biosynthèse des nanostructures d'argent par *S. cerevisiae*F6 et *K. marxianus* GBC2

Pour préparer les cultures, 9 tubes contenant 10 mL du bouillon nutritif ont été préparés pour chaque souche (*S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2), et chaque tube a étéensemencé avec une colonie de la souche correspondante. Ensuite les tubes ont été incubés à 37 °C pendant 18 h. Après incubation, une première centrifugation a été réalisée à 9000 rpm pendant 5 min à 4 °C. Le surnageant a été éliminé, et un lavage du culot a été effectuée en ajoutant 1mL d'eau physiologique afin d'éliminer toute trace du milieu de culture, suivi d'une centrifugation dans les mêmes conditions pour récupérer les cellules, ces dernières ont été resuspendues dans trois milieux de synthèse : bouillon nutritif, eau physiologique et eau distillée.

Après homogénéisation, une solution de nitrate d'argent (AgNO₃) à 0,1M a été préparée, puis rajoutée à raison de 10 mL par tube selon un rapport volumique de (2 :1) pour (AgNO₃ : eau distillée) respectivement, pour obtenir un mélange réactionnel. Les tubes ont été maintenus à l'abri de la lumière tout au long de la biosynthèse et incubés à différents intervalles de temps comme indiqué dans le tableau I.

Tableau I: Composition des solutions de biosynthèse des NPs par *Saccharomyces cerevisiae* F6 et *Kluyveromyces. marxianus* GBC2 et l'intervalle de temps correspondant. (BN : Bouillon nutritif, EP, Eau physiologique, ED : Eau distillée).

Souche	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> F6/ <i>Kluyveromyces marxianus</i> GBC2		
Mélange réactionnel	5mL de BN+ 10mL AgNO ₃ à 0.1M. 3 tubes incubés à 24, 48 et 72h	5mL de EP+ 10mL AgNO ₃ à 0.1M. 3 tubes incubés à 24, 48 et 72h	5mL de ED+ 10mL AgNO ₃ à 0.1M. 3 tubes incubés à 24, 48 et 72h

III. Evaluation de l'activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 en milieux BN, ED et EP

L'activité antibactérienne a été évaluée par la méthode des puits décrite par (Ceugniet *et al.*, 2015) avec quelques modifications. Vingt millilitres de gélose Mueller-Hinton (Biolab Hangrie) ont été préalablement coulés dans des boîtes de Pétri, puisensemencées en surface par des cultures de 18h des suspensions microbiennes d'*E. coli* (ATCC 25922) de *S. aureus* (ATCC 25933) et de *C. albicans* (ATCC 10231), ajustées à une densité optique (DO_{630}) comprise entre 0,08 et 0,1, correspondant à une concentration d'environ $1,5 \times 10^7$ UFC/mL. Des puits ont été creusés dans la gélose, puis remplis avec un volume de 50 μ L du mélange réactionnel issu de la biosynthèse des nanostructures d'argent (AgNPs), récoltés après 24, 48 et 72h. Après une diffusion à 4°C pendant 2h, les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24h. En parallèle, l'activité antimicrobienne des deux levures *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 a également été évaluée afin de savoir si elles ont une activité à l'égard des souches cibles testées.

IV. Optimisation des conditions de biosynthèse des nanoparticules d'argent

IV.1. Production de la biomasse de *K. marxianus* GBC2

Suite à la sélection de *K. marxianus* GBC2 comme souche la plus performante pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent, une culture a été mise en place afin d'obtenir une biomasse suffisante pour les étapes d'optimisation. Une culture de 18h de *K. marxianus* GBC2 a été préparée dans du bouillon Sabouraud (Equiprolab Algerie) puis 10mL de cette culture ont été transférés dans un Erlenmeyer contenant 990mL du même bouillon. L'incubation a été réalisée pendant 24h à 37°C, sous agitation à 120rpm dans un shaker (GFL type 3033, Allemagne). Après incubation, la biomasse produite a été récupérée par plusieurs centrifugations successives à 5000rpm, suivies de lavage à l'eau physiologique afin d'éliminer toute trace résiduelle de milieu de culture. Le culot cellulaire obtenu a été récupéré, puis séché dans une étuve à 50°C. Une fois déshydratée, la poudre d'une masse de 1,9g a été conservée à 4°C en attendant son utilisation.

IV.2. Optimisation par plan d'expériences

Afin d'optimiser les paramètres influençant la biosynthèse des nanostructures d'argent, notamment la concentration en nitrate d'argent $AgNO_3$, le pH du milieu réactionnel et la température d'incubation, une série de quinze (15) expériences (**Tableau II**) ont été établies à l'aide de la dixième édition du logiciel JMP (John's Macintosh Project 10). Dans chacun des quinze réacteurs, une masse fixe de 0,1g de *K. marxianus* GBC2 a été introduite dans un volume de 100mL d'eau distillée. Ces cultures ont été incubées pendant 24h à 37°C.

Pour déterminer l'optimum de la production des AgNPs synthétisées dans chaque expérience, l'activité antimicrobienne des quinze réacteurs à l'égard de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *C. albicans* (ATCC 10231) et *B. subtilis* (ATCC 6633) a été testée selon la méthode des puits décrite précédemment dans la **section III (Evaluation de l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent synthétisées)**, ainsi que l'activité antimicrobienne de trois témoins constitués respectivement de *K. marxianus* GBC2 (0,1 g incubé dans 100 mL d'eau distillée à 37 °C), d'une solution de nitrate d'argent (AgNO₃, 0,1 M) dans 100 mL d'eau distillée incubée à 60 °C, et d'une solution similaire incubée à 83 °C a été évaluée. Les données relatives aux zones d'inhibition mesurées ont été analysées à l'aide du logiciel statistique selon un modèle de type Box-Behnken permettant d'identifier les paramètres expérimentaux optimaux pour la biosynthèse des nanoparticules désignées sous le nom de R12.

Les données sont analysées à l'aide de la technique de régression multiple du modèle Box-Behnken. Une équation polynomiale de second degré doit être appliquée pour ajuster les réponses des données expérimentales aux variables codées, comme suit :

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^n \beta_i X_i + \sum_{i=1}^n \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i < j}^n \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon$$

Avec : Y : fonction de réponse

$\beta_0, \beta_i, \beta_{ii}$: constante polynomiale qui exprime l'effet moyen général

β_{ij} : coefficients des effets linéaires, quadratiques.

X_i, X_j ; représentent les variables codées indépendantes affectant la réponse

Ce type de méthodologie permet de déterminer ; les erreurs de prévision, le coefficient de corrélation R^2 et la probabilité p , en vue de caractériser la configuration optimale des AgNPs (Sivagnanam et al., 2017).

Tableau II: Expériences d'optimisation des paramètres influençant la biosynthèse des nanostructures d'argent.

Expérience	Concentration d'AgNO ₃	pH	Température °C
1	0,1	3,5	37
2	0,1	10,5	37
3	0,05	7	37
4	0,15	7	37
5	0,05	3,5	60
6	0,05	10,5	60
7	0,15	3,5	60
8	0,15	10,5	60
9	0,1	7	60
10	0,1	7	60
11	0,1	7	60
12	0,1	3,5	83
13	0,1	10,5	83
14	0,05	7	83
15	0,15	7	83

V. Caractérisation des nanostructures d'argent

Afin de caractériser les nanoparticules d'argent (AgNPs), deux méthodes ont été utilisées notamment la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et l'UV-Vis.

V.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier FTIR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) repose sur l'analyse de l'absorption et de la transmission du rayonnement infrarouge par un échantillon qui peut être liquide solide ou gazeux afin de déterminer les groupements fonctionnels présents dans les nanostructures d'argent (AgNPs) synthétisées. Des pastilles de bromure de potassium (KBr) ont été préparées en appliquant une pression de 10 kg/cm² pendant environ 30 s. Une pastille de KBr pur a servi de témoin pour la soustraction du bruit de fond. Un balayage spectroscopique compris entre les nombres d'onde 4000 et 400 cm⁻¹ a été effectué par spectrophotomètre (FTIR) de marque IRAffinity-1 (Shimadzu, Japan).

V.2. Spectroscopie UV-Visible

La spectroscopie UV-visible constitue une méthode à la fois fiable et largement utilisée pour évaluer la synthèse et la stabilité des nanoparticules d'argent. Grâce à leurs propriétés optiques particulières, les AgNPs interagissent fortement avec certaines longueurs d'onde de la lumière (**Bamal et al. 2021**). Un balayage spectrophotométrique entre les longueurs d'onde de 200 nm à 900 nm, a été effectué sur deux cuves en quartz contenant, respectivement, 2,5 mL de la solution *K. marxianus* GBC2 et 2,5 mL des nanostructures du réacteur R12 contre un blanc (eau distillée).

VI. Evaluation de l'activité antioxydante

Afin de déterminer les propriétés antioxydantes des nanostructures d'argent plusieurs tests ont été utilisés, notamment les tests Ferric reducing antioxidant power (FRAP), réduction d'oxide nitrique (NO[•]) et piégeage du radical libre d'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS^{•+}). Durant ces tests quatre échantillons ont été évalués quant à leur potentiel antioxydant, qui sont :

- Suspension des nanostructures (R12)
- Une solution de nitrate d'argent à 0,1 M (AgNO₃)
- Une suspension de *K.marxianus* GBC2 traitée à 83°C (*K. marxianus* M)
- Une suspension vivante de *K.marxianus* GBC2 (*K. marxianus* V)

VI.1. Test ABTS

Le test consiste à mettre en contact les quatre échantillons préalablement cités avec la solution de l'ABTS afin d'évaluer leur capacité antioxydante à réduire les radicaux libres de l'ABTS⁺ en ABTS⁻. Le protocole suivi est celui de **(Boudjouan et al., 2022)** avec modification. Pour cela une solution mère d'ABTS a été préparée en mélangeant le même volume du réactif ABTS (7mM) et d'une solution de persulfate de potassium (2,4mM) sous agitation constante. La solution obtenue est stockée à l'abri de la lumière à température ambiante. Avant utilisation, la solution a été diluée à l'éthanol pour atteindre une absorbance de $0,700 \pm 0,02$ à 734nm.

Les échantillons ont été testés trois fois en mélangeant 100 µL de chaque échantillon avec 1ml de la solution ABTS. Les témoins ont été comme le montre le **Tableau V**. Après 7 minutes d'incubation à températures ambiante, l'absorbance a été mesurée à 734nm et, le pourcentage d'inhibition a été calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left(\frac{\text{Moyenne de l'Abs des contrôles} - \text{Abs de l'extrait}}{\text{Moyenne de l'Abs des contrôles}} \right) \times 100$$

Abs: absorbance.

Tableau III : Témoin réalisés pour le test ABTS

Témoin	Composition
Témoins	100ul d'eau distillé et 1ml de solution ABTS
Le blanc	100ul d'eau distillé et 1ml d'éthanol

VI.2. Test FRAP

Les quatre échantillons ont été testés pour évaluer leurs capacités à réduire les ions ferriques (Fe³⁺) en ions ferreux (Fe²⁺) en présence d'un réactif spécifique, qui est le TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine) suivant le protocole établi par **(Boudjouan et al., 2022)**.

Ce protocole consiste à mélanger un volume de 50µL de chaque échantillon avec 950µL de la solution FRAP préalablement préparée. Cette dernière a été obtenue en mélangeant trois solutions: (une solution tampon d'acétate de sodium (C₂H₃NaO₂, Sigma-Aldrich) à une concentration de 300mM dont le pH a été ajusté à 3,7; à 10mM avec du TPTZ dissout dans du HCl (40mM), plus une solution de FeCl₃ 6H₂O (20mM)), avec (10 :1 :1) respectivement. Le mélange a été incubé pendant 30 min à l'obscurité puis centrifugé (MIKRO120 VEP SCIENTIFICA, Italie) pendant 1min à 14000rpm avant de mesurer l'absorbance à 593 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BIOTECH ENGINEERING MANAGEMENT CO.LTD.(UK)). Toutes les

expériences ont été répétées cinq fois contre des témoins qui sont présentés dans le **Tableau III**. Les résultats ont été exprimés par rapport à une courbe d'étalonnage de TROLOX présentée dans **l'annexe (A)**

Tableau IV: Témoins réalisés pour le tes FRAP

Témoins	Composition
Blanc échantillon	50µL de l'extrait et 950µL d'eau distillée
Blanc commun	50µL d'eau distillée et 950µL de la solution FRAP

VI.3. Test de réduction d'oxide nitrique (NO)

Pour réaliser ce test, le protocole décrit par (**Boudjouan et al., 2022**), a été suivi, en mettant en contact un volume de 450µL de la solution SNP (nitroprussiate de sodium) préalablement préparée ; en dissolvant ce dernier dans du tampon phosphate (100mM, pH=7), avec 450µL d'extrait ; suivie d'une incubation pendant 60min sous lumière uniforme et 950µL du réactif Griess (0,15g sulfamide + 0,15g NED (N-(1-naphtyl) éthylènediamine, dichloride) +15mL tampon phosphate) est ensuite rajoutés, le tout incubées à l'obscurité pendant 10min et l'absorbances des échantillons a été mesurée à 562nm en parallèle, des témoins ont été réalisés selon le **Tableau IV** et le pourcentage d'inhibition a été calculé par la formule suivante:

$$\% \text{ d'inhibition} = \left(\frac{\text{Moyenne d'Absorbance des contrôles} - \text{Absorbance de l'extrait}}{\text{Moyenne d'Absorbance des contrôles}} \right) \times 100$$

Tableau V : Témoins réalisés pour le test NO

Témoin	Composition
Blanc échantillon	450µL d'extrait +450µL SNP +450µL tampon phosphate
Témoin	450uL d'eau distille +450uL SNP+450 uL Griess
Blanc commun	450 µLSNP+450µL tampon phosphate

VII. Activités biologiques

VII.1. Evaluation de l'activité antibactérienne

VII.1.1. Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) avec et sans centrifugation de la solution des nanostructures d'argent

La détermination de la CMI des nanostructures d'argent a été réalisée selon la méthode de dilution en milieu liquide, adaptée au protocole proposé par **Swebocki et al.,(2023)** Une microplaque de 96 puits a été préalablement remplie avec 100µL du bouillon Tryptic Soy Broth (TSB)(Equiprolab,Algerie) auxquels ont été ajoutés 50µL de suspensions microbiennes correspondant aux souches suivantes *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *C. albicans* (ATCC 10231) et *B. subtilis* (ATCC 6633) ajustées à une DO₆₃₀ comprise entre 0,08 et 0,1 suivant un plan de microplaque présenté dans l'**Annexe (B)**. Parallèlement, à partir de la solution mère R12, une série de dilutions a été effectuée jusqu'à 1/256. Un volume de 50µL de ces dilutions a été ajouté à des puits bien déterminés selon un plan de microplaque établi auquel des témoins ont été additionnés. Ce test a été réalisé trois fois. Ensuite, les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 24h, et une lecture des absorbances a été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaques à une DO₆₃₀ (BioTeck Instruments, Inc, USA). Les résultats des CMI ont été exprimés par un pourcentage d'inhibition selon la formule suivante :

$$\% d'inhibition = \frac{(Abs\ cible - (Abs\ test - Abs\ témoin\ test))}{Abs\ cible} \times 100$$

Avec:

Abs cible : moyenne des absorbances de la cible

Abs test : moyenne des absorbances du test

Abs témoin test : moyenne des absorbances des témoins test

En plus, de la détermination de la CMI sur milieu liquide, cette dernière a été évaluée par la méthode des puits précédemment décrite dans la **section III (Evaluation de l'activité antimicrobienne des nanoparticules d'argent synthétisées)**.

La CMI des nanoparticules colloïdales récupérées par centrifugation à 5600 rpm pendant 5min à température ambiante a été déterminée par les deux méthodes détaillées plus haut : la méthode des puits et la méthode de dilution en milieu liquide sur microplaque à 96 puits.

VII.1.2. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB

Dans le but de déterminer la CMB des nanostructures d'argent, le protocole décrit par **Swebocki et al.,(2023)** a été adapté et modifié en fonction des conditions expérimentales spécifiques de cette étude. Une microplaque de 96 puits a été préalablement remplie avec 100µL du bouillon TSB auxquels ont été ajoutés 50µL de suspensions microbiennes correspondant aux souches cibles, *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *C. albicans* (ATCC 10231) et *B. subtilis* (ATCC 6633) ajustées à une DO₆₃₀ comprise entre 0,08 et 0,1 suivant un plan de microplaque présenté dans l'**Annexe (C)**. Ultérieurement, les microplaques ont été incubées à 37°C/24h. Après incubation, un volume de 50µL de la suspension R12 et de ses dilutions allant à

1/256 a été ajouté aux puits selon un plan de microplaque établi auquel des témoins ont été additionnés. Ce test a été réalisé trois fois. Par la suite, les microplaques ont été incubées à 37°C pendant 2 et 6h. À l'issue de l'incubation, le contenu de chaque puits a été ensemencé en masse sur gélose nutritive à raison de deux boîtes de Pétri par puits et incubées pendant 24 à 48h à 37°C.

Après incubation la CMB a été déterminée comme étant la dernière dilution qui présente une inhibition de la cible à 100%.

VII.2. Détermination de l'activité anti-biofilm

L'activité anti-biofilm des nanostructures d'argent a été testée à l'égard des cibles pathogènes *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *C. albicans* (ATCC 10231) et *B. subtilis* (ATCC 6633), dans une microplaque de 96 puits, selon la méthode décrite par **Ait Ouali et al., (2014)**. Dans un premier temps, un volume de 50µL des différentes souches cibles, d'une DO₆₃₀ située entre 0,08 et 0,1, a été rajouté à un volume 100µL de TSB stérile, suivi de l'ajout de 50µL de R12 et de ses dilutions successives jusqu'au facteur 1/256.

La microplaque a été ensuite incubée à 37°C pendant 24h. A l'issue de l'incubation, le milieu de culture a été éliminé et les puits ont été lavés deux fois avec un volume de 200 µL d'eau physiologique (9g de NaCl/L) afin d'éliminer les cellules non adhérentes ainsi toute trace du milieu de culture. Ensuite, 200µL d'éthanol à 95% ont été rajoutés pour mieux fixer les cellules adhérentes, suivi d'une agitation à 140rpm pendant 10 min sur un agitateur microplaque (Heidolph VIBRAMAX 100, Allemagne). Une fois le temps écoulé, la microplaque a été séchée à l'étuve afin d'évaporer l'éthanol résiduel. En vue d'effectuer la coloration des cellules fixées, un volume de 100µL du cristal violet à 0,1% a été ajouté dans chaque puits, ainsi une agitation a été réalisée dans les mêmes conditions. Après l'élimination du colorant deux lavages avec l'eau physiologique ont été effectués. Ensuite, le colorant a été solubilisé par l'ajout d'un volume de 200µL d'éthanol, et la microplaque a été soumise à une agitation. La lecture a été effectuée à l'aide d'un lecteur de microplaques a une longueur d'onde de 630nm. L'adhésion des souches a été classée en quatre catégories suivant la classification de **Stepanovic et al. (2000)**. En considérant l'absorbance du bouillon TSB stérile comme témoin (A_c) et l'absorbance de l'échantillon (A), les interprétations suivantes ont servi tout au long de cette expérience : $A \leq A_c$, non adhérent (non producteur de biofilm) ; $2A_c \geq A > A_c$, faiblement adhérent (faible producteur de biofilm) ; $4A_c \geq A > 2A_c$, modérément adhérent (producteur de biofilm modéré) ; et fortement adhérent (fort producteur de biofilm), $A > 4A_c$.

VII.3. Test antidiabétique de l'enzyme Alpha amylase.

Le centre d'intérêt actuel des médicaments anti hyperglycémiant se tourne vers l'inhibition des enzymes intestinales telle que l' α -amylase; ce qui permettrait de réduire l'élévation du taux de glucose dans le sang (**Wahab, Bhatti, et John 2022**). Le test de l' α -amylase a pour but d'évaluer l'activité antidiabétique potentielle des échantillons, en mesurant leur capacité à inhiber l'enzyme α -amylase et pour cela le protocole décrit par (**Barache *et al.* 2024**) a été suivi.

Tout d'abord un volume de 200 μ L de chaque échantillon a été mélangés avec 200 μ L d'une solution d'amidon préparée en dissolvant 0,25g de ce dernier dans 25 ml de tampon phosphate à (0,02M, pH 6,9), le mélange a été incubé pendant 10 min à 37°C à l'obscurité. Ensuite 200 μ L de l' α -amylase (1mg/mL) a été ajouté à la solution suivis d'une autre incubation dans les mêmes conditions. Après réaction, 400 μ L du réactif DNS (1%, m/v) a été ajouté et le mélange a été incubé au bain marie (BENSEN Spain) pendant 5 min à 100°C afin d'arrêter la réaction enzymatique en parallèle, des témoins ont été réalisés dans les mêmes conditions expérimentales et décrits dans le **Tableau VI**.

Tableau VI : Témoins réalisés pour le test d'activité antidiabétique

Témoin	Composition
Positif (Acarbose)	200 μ L d'acarbose + 200 μ L α -amylase à 0,5mg/mL + 400 μ L DNS
Blanc échantillon	200 μ L extrais + 200 μ L tampons phosphate pH de 6,9 + 400 μ L DNS,
Blanc commun	400 μ L eau distillée + 200 μ L amidon à 0,1% + 200 μ L DNS
Témoin	200 μ L tampon + 200 μ L amidon à 0,1% + 200 μ L α -amylase à 0,5mg/mL + 400 DNS

Avant la mesure de l'absorbance, une dilution des échantillons a été effectuée en mélangeant 200 μ L de chaque solution avec 800 μ L d'eau distillée, suivie d'une centrifugation pendant 1 min à 14000 rpm. L'absorbance finale a été mesurée à 440nm et le pourcentage d'inhibition a été calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ d'inhibition} = \left(\frac{\text{Moyenne de l'Absorbance des contrôles} - \text{Absorbance de l'extrait}}{\text{Moyenne de l'Absorbance des contrôles}} \right) \times 100$$

Chapitre III

Résultats et discussion

Resultas et discussion

I. Résultat de la standardisation des levures

Dans le but de standardiser les suspensions levériennes utilisées pour la biosynthèse, les valeurs d'absorbance des différentes dilutions décimales ont été présentées dans le **tableau VII**.

Tableau VII: Résultats d'absorbance à la DO_{630} des souches *S. cerevisiae* F6, *K. marxianus* GBC2.

La souche	Solution mère (SM)	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
<i>S. cerevisiae</i> F6	1.350	0.234	0.066	0.061
<i>K. marxianus</i> GBC2	1.072	0.312	0.077	0.064

Les boîtesensemencées ont été dénombrées et les résultats ont été présentés dans le **tableau VIII** D'après le dénombrement des boîtes retenues, la charge des levures est de $2,8 \cdot 10^7$ et $8,45 \cdot 10^7$ UFC/mL pour *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 respectivement.

Tableau VIII: Résultats du dénombrement réalisé pour *S. cerevisiae* F6, *K. marxianus* GBC2.

Souche	<i>S. cerevisiae</i> F6		<i>K. marxianus</i> GBC2	
Boîte	1	2	1	2
10^{-1}	IND	IND	IND	IND
10^{-4}	IND	IND	IND	IND
10^{-6}	29	27	98	71

IND: indénombrable

II. Activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 en milieux BN, ED et EP

Les nanostructures d'argent synthétisées dans les milieux BN, EP et ED par *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 ont montrées une activité antimicrobienne contre *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC25933) et *C. albicans* (ATCC 10231), elle est mise en évidence par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits. En revanche, *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 n'ont montrées aucune activité contre les trois souches cibles, comme le montre la (**figure 5**) et les résultats de la survie des levures productrices de nanostructures d'argent ont été négatifs pour les différents intervalles de temps (24/48 et 72h) et milieu de culture (BN/EP/ED).

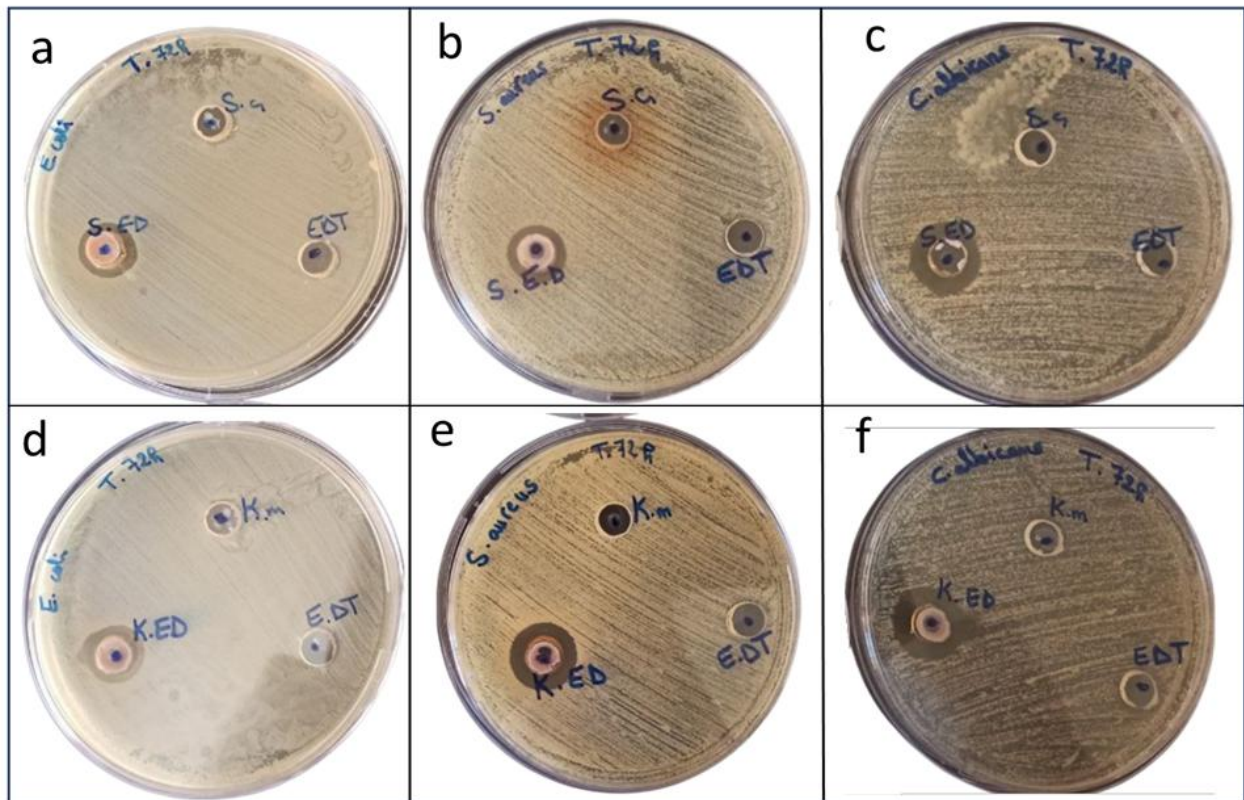


Figure 5 : Résultat de l'activité antimicrobienne des nanostructures d'argent synthétisées par *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2 dans l'ED à 72h, tel que : (a et d : *E. coli* (ATCC25922)), (b et e : *S. aureus* (ATCC25933)) et (c et f: *C. albicans* (ATCC 10231)).

Les résultats des mesures des zones d'inhibition sont regroupés dans l'**annexe (D)**. Les nanostructures synthétisées par *S. cerevisiae* F6 dans les milieux de cultures BN et EP pour les trois intervalles de temps montrent une activité antimicrobienne modérée contre *E. coli* (ATCC 25922) (diamètre des zones d'inhibition entre 11 et 14 mm), *S. aureus* (ATCC 25933) et *C. albicans* (ATCC 10231) avec une légère différence par rapport aux témoins EP et BN, suggérant un effet similaire à celui de ces derniers. En revanche, pour toutes les cibles il n'y a aucune activité inhibitrice du témoin ED, ce qui confirme que toute inhibition observée en condition "test" est due aux nanostructures biosynthétisées.

Les nanostructures d'argent synthétisées dans le BN et l'EP par *K. marxianus* GBC2 dans les trois intervalles de temps ont une activité équivalente à celle des témoins correspondant contre les trois cibles *E. Coli* (ATCC 25922) (diamètre des zones d'inhibition entre 12 et 13 mm), *S. aureus* (ATCC 25933) et *C. albicans* (ATCC 10231). L'activité des deux témoins est due à leur composition chimique, pour le bouillon nutritif (BN) ce sont les sucres réducteurs qui réduisent les ions d'argent (Ag^+) en argent métallique (Ag^0) qui sont stables dans le temps et connus pour leurs propriétés antimicrobiennes (Durmazel et al., 2019).

En ce qui concerne l'eau physiologique (EP), bien qu'elle ne contienne pas d'agents réducteurs à proprement dit, sa faible teneur en chlorure de sodium (NaCl) peut interagir avec les ions d'argent (Ag^+) pour former du chlorure d'argent (AgCl), une réaction limitée par le Cl^- (en raison du phénomène de saturation) ce qui implique qu'une partie des ions d'argent (Ag^+) reste libre dans le milieu reconnue pour leur activité antimicrobienne (**Pernas-Pleite et al., 2025a**).

Néanmoins dans l'ED l'activité est meilleure (diamètres des zones d'inhibition entre 12 et 19 mm) par rapport à son témoin correspondant qui ne présente aucune activité. Cette absence d'activité est probablement liée à la composition de l'eau distillée qui lors de son auto-ionisation spontanée donne des ions hydronium H_3O^+ et hydroxyde OH^- qui interagissent avec les ions Ag^+ pour former des AgOH qui ne présentent pas d'activité antimicrobienne (**Ali et al., 2025**).

Les résultats obtenus indiquent que *C. albicans* (ATCC 10231) présente une sensibilité plus élevée aux nanostructures synthétisées par les deux levures *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2, comme en témoignent les diamètres des zones d'inhibition (13mm jusqu'à 24mm), qui sont supérieurs à ceux observés pour les autres cibles testées. Les zones obtenues sont proches de celles décrites dans l'étude de **Kim et al. (2015)** où une biosynthèse efficace et extracellulaire de nanoparticules d'argent ont été testées contre plusieurs pathogènes y compris *C. albicans* et les zones d'inhibition obtenues ont un diamètre de $24 \pm 1.4\text{mm}$.

En comparant entre les résultats d'inhibition des tests et témoins issus de la biosynthèse des nanostructures d'argent par *S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2, on constate que cette dernière montre une activité antimicrobienne plus importante et meilleure pour toutes les cibles.

D'après les résultats des différents intervalles de temps d'incubation établis lors de la biosynthèse des nanostructures d'argent, aucune amélioration de l'activité antimicrobienne n'a été mise en évidence, pour cela un temps de 24h a été choisi pour la biosynthèse comme il a été aussi choisi dans l'étude faite par (**A. Mohamed, Zahran, et El-Rafie 2017**) lors de la biosynthèse de nanoparticules d'argent (AgNPs) en utilisant *Saccharomyces cerevisiae* afin d'obtenir une solution d'AgNPs stable.

III. Résultats d'optimisation des paramètres de biosynthèse des nanostructures d'argent

Les diamètres des zones d'inhibition ont été mesurés et insérés dans le logiciel et les résultats sont présentés dans le **tableau IX**.

Tableau IX: Diamètres des zones d'inhibition des 15 expériences réalisées. (Config : Configuration, mm : diamètre des zones d'inhibition)

Config	[AgNO ₃] (M)	pH	T (°C)	<i>E. coli</i> (mm)	<i>S. aureus</i> (mm)	<i>C. albicans</i> (mm)	<i>B. subtilis</i> (mm)
– – 0	0,05	3,5	60	14,9	14,5	27	16,2
– + 0	0,05	10,5	60	14,25	14,87	25,9	18,8
+ – 0	0,15	3,5	60	13,8	13,4	28,8	13,5
0	0,15	10,5	60	14,65	14,05	27,3	16,6
0 – –	0,1	3,5	37	14,85	14,68	26,9	16,4
0 – +	0,1	3,5	83	16,2	16,7	27,26	16,4
0 + –	0,1	10,5	37	14,75	14,75	25,7	17,4
0 + +	0,1	10,5	83	15,45	15,45	25,9	17,1
– 0 –	0,05	7	37	13,85	14,4	26	16,6
+ 0 –	0,15	7	37	12,92	12,59	29,01	13,9
– 0 +	0,05	7	83	15,1	14,95	29,75	16,2
+ 0 +	0,15	7	83	14,9	14,65	25,3	16,75
0	0,1	7	60	14,9	13,75	29,25	10,9
0	0,1	7	60	14,25	14,15	28,3	11,85
0	0,1	7	60	14,5	13,75	29,2	11,1

La méthode Box-Behnken Design a permis de déterminer les conditions optimales de synthèse des nanoparticules d'argent. Le **tableau X** présente les résultats de l'analyse de la variance indiquant que le modèle de régression quadratique est statistiquement significatif.

Tableau X : résultats de l'analyse de la variance

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F
Modèle	9	7,6150650	0,846118	7,6923
Résidus	5	0,5499750	0,109995	Prob. > F
Total	14	8,1650400		0,0185*

*: résultat significatif (P<0,05)

Le model est considéré comme significatif lorsque la valeur de Prob>F est inférieure à 0,0185 pour les quatre souches cibles. La valeur F du modèle (7,6923) pour le diamètre des zones d'inhibitions indique une forte signification statistique. Ainsi la valeur de R^2 prédite pour chaque souche est supérieure à 0,90 comme représentée dans **la Figure 6**, et de R^2 0,9737 figuré dans le **tableau XI** sont proches de 1 ce qui montre un bon ajustement du model aux données expérimentales. Le profileur de prévision présenté dans **la Figure 6** qui conclue qu'une concentration d'AgNO₃ à 0,1M, un pH de 3,5 et une température d'incubation de 83°C sont les paramètres les plus adéquats pour la biosynthèse des nanoparticules d'argent.

Tableau XI: Résultat du défaut d'ajustement

Source	Degrés de liberté	Somme des carrés	Carré des moyennes	Rapport F
Défaut d'ajustement	3	0,33497500	0,111658	1,0387
Erreur pure	2	0,21500000	0,107500	Prob. > F 0,5247
Erreur totale	5	0,54997500	R^2 0,9737	

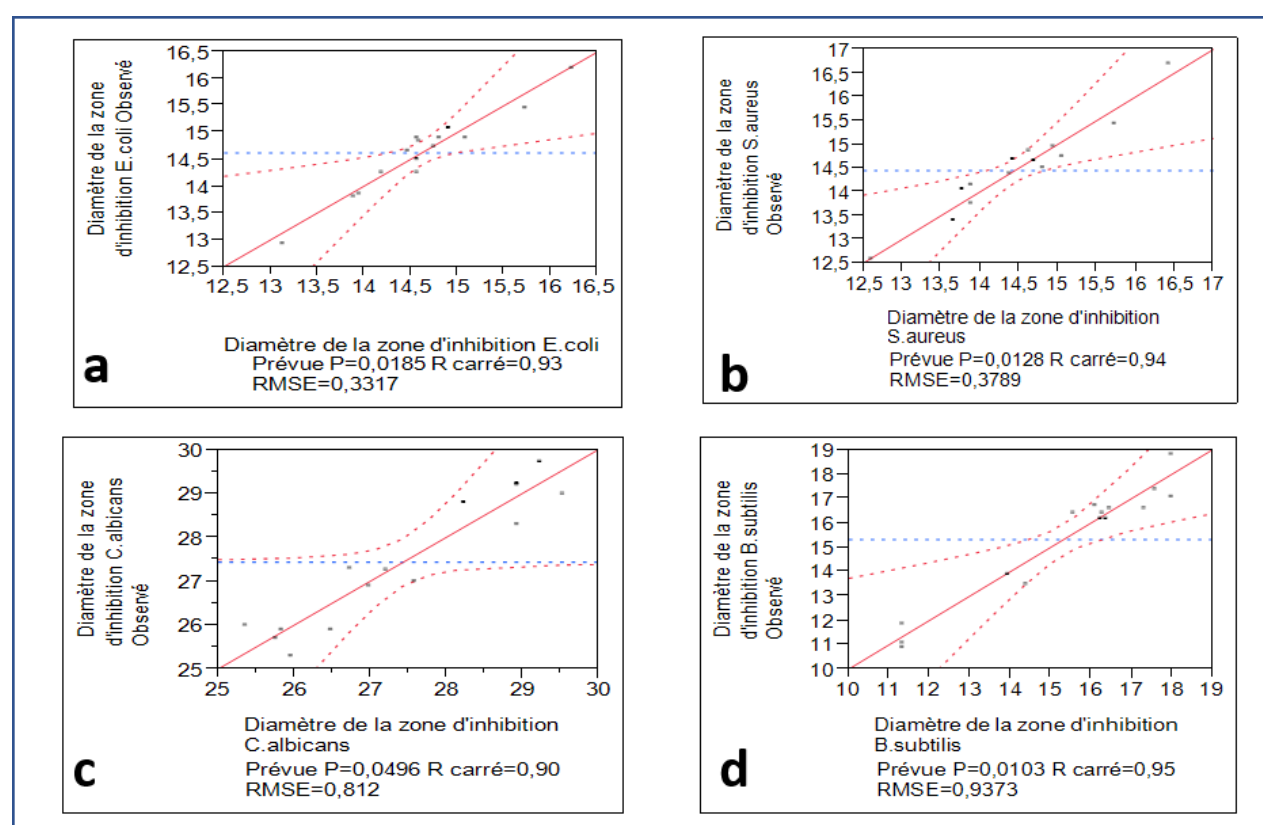


Figure 6: Graphique de validation du model statistique par Box Bhenken des diamètres d'inhibition des souches pathogènes (a: *E. coli*, b : *S. aureus*, c : *C. albicans*, d : *B. subtilis*)

Les nanostructures synthétisées à partir des paramètres optimaux ont été séchées et pesées afin de déterminer le rendement de la biosynthèse qui est estimé à 98%.

Caractérisation physico-chimique des nanostructures d'argent

III.1. Analyse des spectres FTIR

L'analyse des spectres infrarouges des nanostructures d'argent (R12) et la poudre de la souche *K. marxianus* GBC2 déshydratée seule (Km) (**figure 7**), a permis l'identification des groupements fonctionnels présents. L'indexation des bandes est établie sur la base des travaux de **Pereyra et al. (2025)**. Une bande centrée autour de 3600 cm^{-1} qui correspond aux vibrations des liaisons hydroxyles (-OH) a été observée. Un large pic est présent, pour l'échantillon *K. marxianus* GBC2 (Km), vers 3500 cm^{-1} caractéristique aux composés hétérocycliques tels que les protéines (**Othman et al., 2019**). Ce qui représente la présence des groupements amine (NH). Ce dernier est moins intense pour la solution (AgNPS-*K. marxianus* GBC2), ce qui est peut-être dû à l'établissement de liaisons entre ces groupements avec les nanoparticules d'argent afin de les encapsuler et les stabiliser. Selon **Punjabi et al., (2017)**, les protéines possèdent une capacité plus forte de liaison avec les métaux, suggérant ainsi qu'elles pourraient probablement recouvrir les nanoparticules afin d'éviter leur agglomération et, par conséquent, les stabiliser. Une bande d'environ 2800 cm^{-1} pour la levure *K. marxianus* GBC2, caractéristique des groupements méthylène (CH_2) indiquant la présence des chaînes carbonées probablement issues des sucres. En revanche, cette bande est atténuée dans le spectre des AgNPs, ce qui est probablement dû à la participation des sucres dans la réduction des nanoparticules d'argent (**Durmazel et al. 2019**).

Deux bandes intenses observées à 1600 cm^{-1} et 1500 cm^{-1} correspondent principalement aux vibrations des groupements Amide I ($\text{C}=\text{O}$) et Amide II ($\text{C}-\text{N}$). Ces résultats sont en adéquation avec les travaux de (**EL-Zawawy et al. 2023a**), qui confirme la présence de la chitine et des peptides. Néanmoins ces deux bandes sont réduites en intensité qui est probablement due à l'implication de la chitine dans l'encapsulation des nanoparticules d'argent. Une autre bande nette à 1400 cm^{-1} typique aux liaisons ($\text{C}-\text{H}$) présente dans les deux spectres qui font référence aux lipides. Le pic autour de 1200 cm^{-1} dans la courbe de *K. marxianus* GBC2 correspond aux vibrations des groupements éthers ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) typiques aux polysaccharides. Par contre cette bande a été atténuée dans le spectre correspondant à AgNPs-*K. marxianus* GBC2, cette atténuation est peut-être explicable par le phénomène de convolution des deux bandes correspondant aux ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) et ($\text{C}-\text{H}$) (**Dzhagan et al. 2022**). La dernière bande autour de 1000 cm^{-1} représentative des groupements hydroxyle ($\text{C}-\text{OH}$), propre aux molécules d'eau qui sont présentes dans les spectres, mais elles sont moins intenses dans la solution des nanostructures.

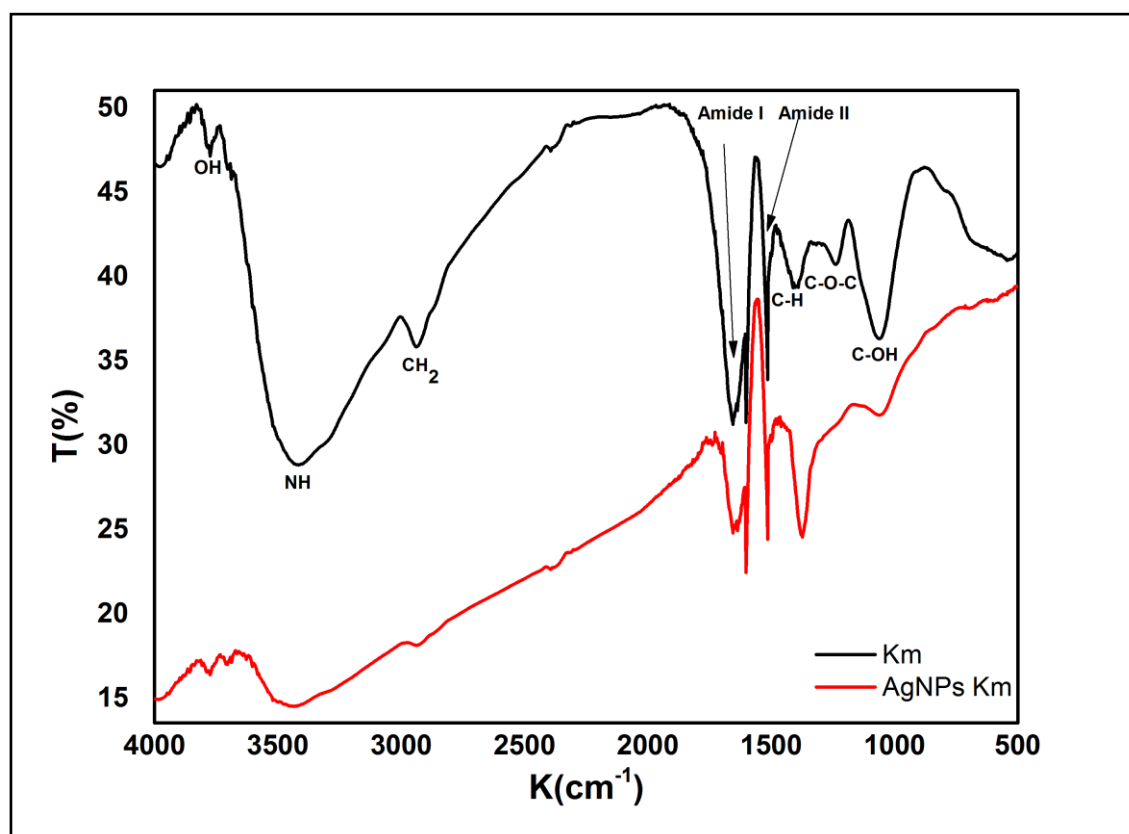


Figure 7: Spectre infrarouge de *K. marxianus* GBC2 (km) et la suspension des nanostructures (AgNPs *K. marxianus* GBC2)

III.2. Analyse des spectres UV-Visible

Les résultats de l'analyse UV-visible présentée dans la **Figure 8** fournissent des informations cruciales sur la biosynthèse des nanoparticules d'argent à partir de *K. marxianus* GBC2.

La courbe correspondante à l'échantillon (K.m) présente une absorption maximale à 294nm typique aux acides aminés aromatique (Fohely et Suardi 2018). En revanche, la courbe de la solution des nanostructures d'argent (R12) montre une bande d'absorption à 415nm au lieu de 420nm ce qui est caractéristique de la résonance plasmonique de surface des nanoparticules d'argent ce qui est rapportée par EL-Zawawy *et al.* (2023), ce déplacement vers les basses longueurs d'ondes également appelé (Blue shift), traduisant une diminution significative de la taille des nanostructures d'argent. Ce décalage spectral indique que les nanostructures formées sont de très petite taille ce qui modifie leurs propriétés optiques (Mogensen et Kneipp., 2014). Ainsi une caractérisation par UV-visible des AgNPs synthétisées par *K. marxianus* GBC2 a été réalisée par Ashour (2014) qui a mis en évidence un pic intense entre 400 et 430nm, ce qui confirme la réussite de la biosynthèse des nanoparticule d'argent. Un décalage de la bande de 294 nm vers

350nm a été observé qui peut être due aux interactions entre les protéines avec les AgNPs afin de les stabiliser (Punjabi *et al.* 2017)

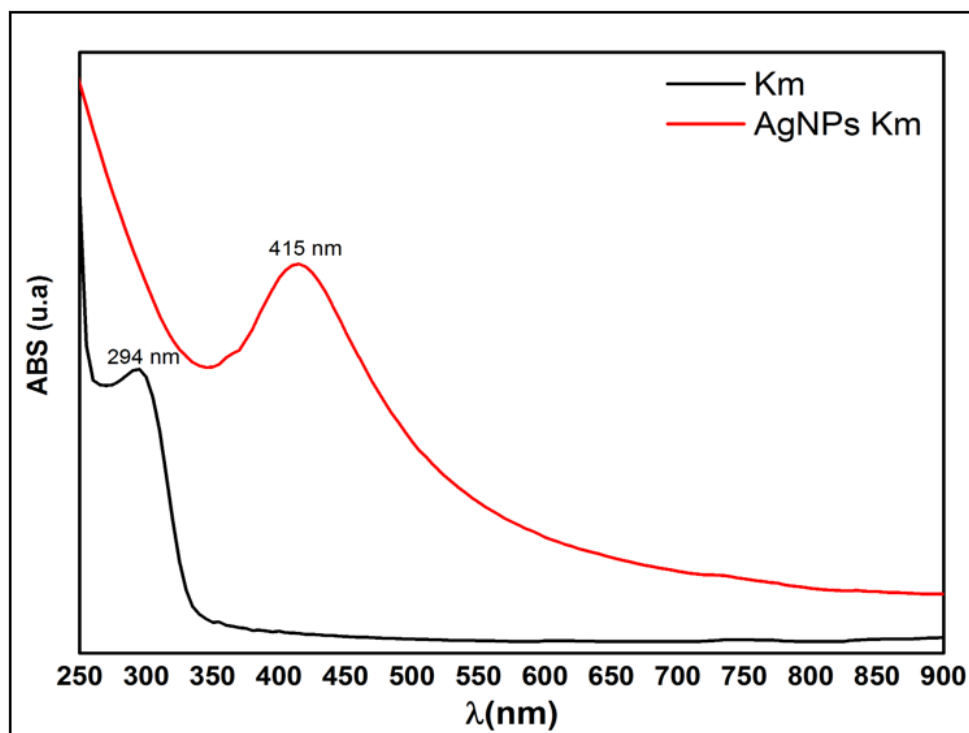


Figure 8: Analyses spectroscopiques UV-visible de *K. marxianus* GBC2 (km) et la suspension des nanostructures d'argent (AgNPs Km)

IV. Evaluation de l'activité antioxydante

IV.1. Test ABTS

Afin d'évaluer le potentiel antioxydant des nanostructures le test ABTS a été réalisé, cette méthode repose sur la génération d'un radical $ABTS^+$ par le persulfate de potassium, (Bedlovičová *et al.*, 2020). Les résultats sont regroupés dans le **tableau XII**

Tableau XII: Résultats des tests d'inhibition du radical ABTS

Echantillon	% R12	%K. m v	% K. m .m	AgNO ₃
% d'inhibition	60,99±0,68	0,53±2,91	17,98±4,37	0±1,22

Les résultats montrent que le radical $ABTS^+$ a été inhibé de façon significative par les nanostructures envient de 61%, ainsi qu'une inhibition modérée par *K. marxianus* GBC2 traitée avec un pourcentage d'inhibition de 38%. Par contre l'AgNO₃ et *K. marxianus* vivante ne présente aucune activité inhibitrice de radical $ABTS^+$. Par ailleurs des études ont montrées que l'activité

antioxydante des nanoparticules d'argent est dû à la présence de groupements fonctionnels tel que les groupements hydroxyle (OH^-) qui sont capables de donner des électrons au radical libre comme l'ABTS⁺, conduisant ainsi à un phénomène de piégeage (scavenging) (Moosavyet *al.* 2023). La présence de ces groupements hydroxyle a été confirmée par l'analyse infrarouge dont l'interaction des (OH) présents dans la biomasse de *K. marxianus* GBC2 avec les nanoparticules d'argent a augmenté l'activité antioxydante de ces dernières.

IV.2. Test FRAP

Les résultats représentés dans **Le tableau XIII** met en évidence la capacité des échantillons à réduire les ions ferriques (Fe^{3+}) en ions ferreux (Fe^{2+}). Il a été observé que le nitrate d'argent AgNO_3 seul et les cellules mortes de *K. marxianus* GBC2 présentent une faible activité antioxydante (1,260 mg E T /g AgNO_3 ; 2,724 mg E T /g K.m) respectivement cependant lorsque ces deux composants sont combinées lors du processus de biosynthèse menant à la solution des nanostructures (R12), une augmentation significative de l'activité antioxydante a été enregistrée avec une valeur de (27,64 mg E T /g K.m).

Tableau XIII : Résultats des concentrations des échantillons en équivalent TROLOX pour test de FRAP

Echantillon	R12	K. m V	K. m .M	AgNO_3
Concentration	27,64±2,27	0,001±0,00	2,724±0,420	1,260±0,130

IV.3. Test de NO

Les résultats de l'oxyde nitrique (NO) des quatre échantillons ont été représentés dans **le tableau XIV**. En analysant les valeurs, le nitrate d'argent n'a aucune activité inhibitrice suggérant qu'il n'inhibe pas le NO seul dans ces conditions. En présence de *K. marxianus* morte (K. m M) et vivante (K. m V) dans l'échantillon testé, une activité modérée (28 à 35%) a été présentée. En revanche le R12 a montré un taux d'inhibition élevé, avoisinant 58% indiquant une forte activité antioxydante à l'égard du NO.

Tableau XIV : Moyenne d'inhibition de l'oxyde nitrique par les échantillons testés, *K. marxianus* V ; *K. marxianus* M ; R12 ET AgNO_3

Echantillon	R12	K. m V	Km .M	AgNO_3
% d'inhibition	58,00±2,29	35,34±0,67	28,10±1,16	0,00±0,00

V. Résultats des activités biologiques

V.1. Activité antimicrobienne

V.1.1. Concentration minimale inhibitrice CMI

➤ Sans centrifugation

Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cibles *E. coli*, (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *C. albicans* (ATCC 10231) et *B. subtilis* (ATCC 6633) ont été calculés d'après les résultats obtenus de la lecture des microplaques réalisées pour les quatre cibles pathogènes et sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau XV: Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cibles pathogènes par les nanostructures d'argent.

Suspension testée	% d'inhibition <i>E. coli</i> (ATCC25922)	% d'inhibition <i>S. aureus</i> (ATCC 25933)	% d'inhibition <i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	% d'inhibition <i>B. subtilis</i> (ATCC 6633)
Solution mère	100%	100%	100%	100%
1/2	100%	100%	100%	100%
1/4	100%	100%	100,00%	100%
1/8	100%	100%	100,00%	99,78%
1/16	100%	100%	100,00%	99,52%
1/ 32	100%	100%	100,00%	99,66%
1/64	99%	100%	81,01%	87,59%
1/128	95%	95,27%	75,24%	83,98%
1/256	72%	94,63%	7,73%	83,90%
<i>K. marxianus</i> GBC2	0%	0%	0%	0%

Les pourcentages présentés dans le tableau précédent ont été représentés par des histogrammes dans la **figure 9**.

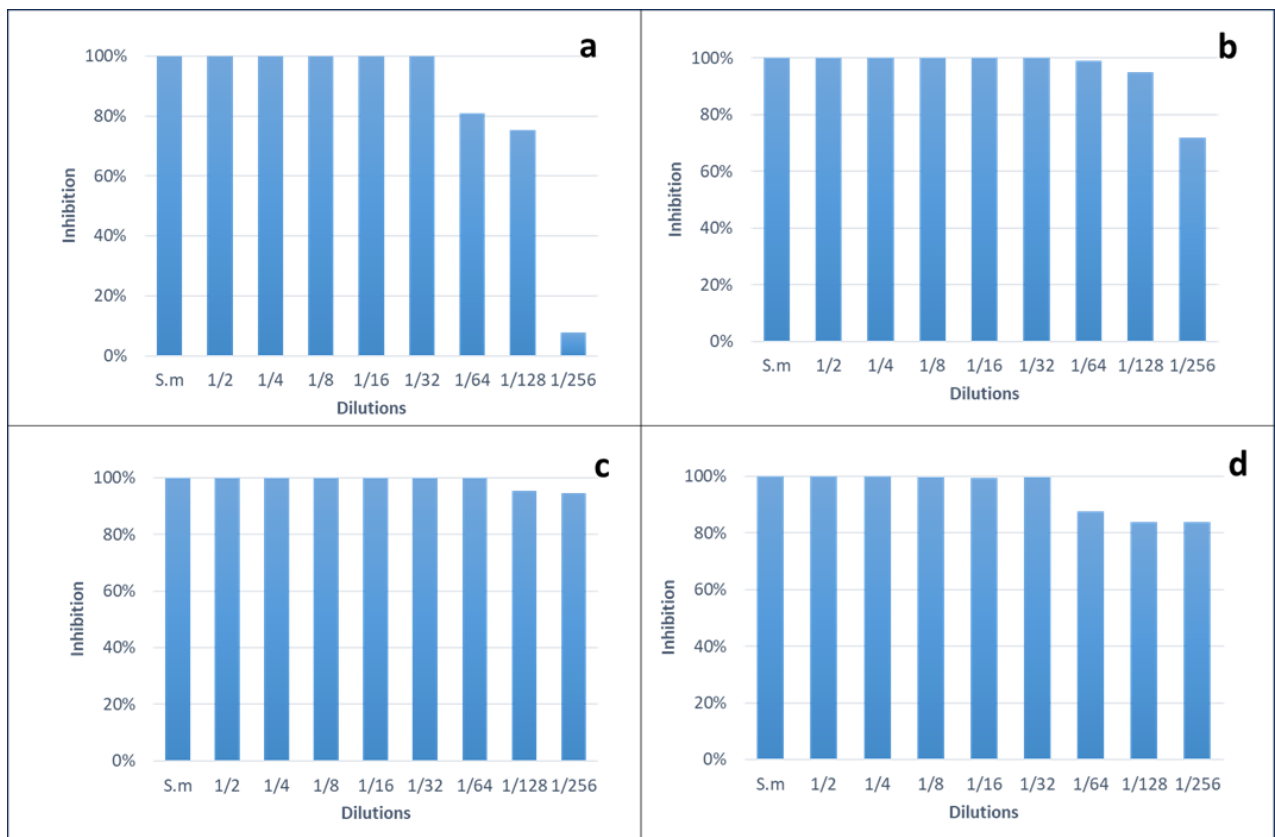


Figure 9 : Histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition des cibles (a) *C. albicans* (b) *E. coli* (c) *S. aureus* (d) *B. subtilis* par les nanostructures d'argent issue de *K. marxianus*. GBC2.

Les histogrammes ci-dessus présentent le pourcentage d'inhibition des quatre cibles pathogènes testées issus du test des microdilutions sur microplaque. L'interprétation de ces résultats révèle que les souches *Candida albicans*, *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* ont présentées une CMI, estimée à 0,531mg/ml (correspond à une dilution de 1/32), traduisant une sensibilité élevée au traitement par les nanostructures d'argent, en revanche *Staphylococcus aureus* a montré une CMI plus faible de 0,266mg/ml (correspond à une dilution de 1/64) selon ces résultats *S. aureus* présente une sensibilité accrue aux nanoparticules d'argent par rapport à *E. coli* qui peut s'expliquer par sa structure membranaire au tant qu'un Gram positif qui est plus accessible en raison de l'absence d'une couche externe qui facilite l'interaction et la perturbation de la membrane par les nanoparticules d'argent (Quinteros et al., 2018). Par contre *E. coli* qui est un gram négatif présente une couche externe de lipopolysaccharides (LPS) qui agissent comme une barrière sélective réduisant ainsi l'adhésion des nanoparticules sur la membrane (Ansari et al., 2014).

Les résultats de la microplaque ont été appuyés par le test de puits dans la **Figure 10** où la CMI a été déterminée à 2,125mg/ml (correspond à une dilution de 1/8) pour *E. coli* et *C. albicans* et à 1,0625mg/ml (correspond à une dilution de 1/16) pour *S. aureus* et c'est ce qui a été confirmé par **Parvekar et al. (2020)** où les nanoparticules d'argent ont des effets bactéricides potentiels contre *S. aureus* à une concentration de 0,625 mg/ml. La variation de concentration entre la méthode de microdilutions sur microplaque et le test des puits s'explique par un facteur de dilution ($\times 1/4$).

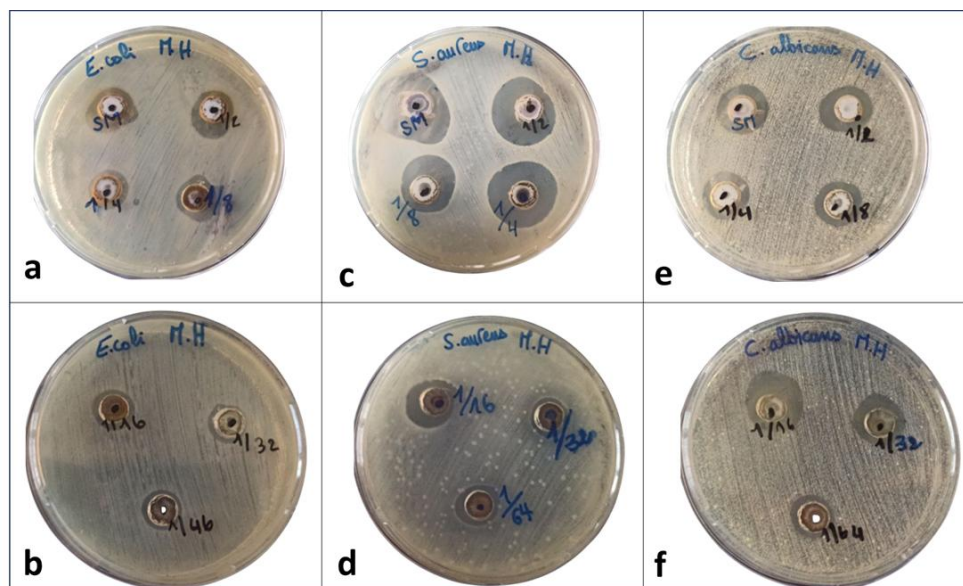


Figure 10: Activité antimicrobienne inhibitrice des nanostructures d'argents réalisée par test de puits contre *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans* (a et b: *E. coli*, c et d : *S. aureus*, e et f: *C. albicans*)

➤ Avec centrifugation

Les résultats de la CMI obtenus des microplaques de cibles *E. coli*, *S. aureus*, *C. albicans* et *B. subtilis* (ATCC6633) traitées avec le surnageant de la solution mère des nanostructures d'argent et ses dilutions sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau XVI : Les pourcentages d'inhibition de la croissance des cibles *E. coli* (ATCC25922), *S. aureus* (ATCC 25933) et *C. albicans* (ATCC 10231) par les nanoparticules d'argent colloïdales.

Suspension testée	% d'inhibition <i>E. coli</i>	% d'inhibition <i>S. aureus</i>	% d'inhibition <i>C. albicans</i>
Solution mère	92%	98,59%	29,65%
1/2	91%	98,27%	25,43%
1/4	67%	89,45%	23,45%
1/8	33%	21,97%	10,72%
1/16	32%	18,91%	7,79%
1/32	22%	19,01%	0,00%
1/64	9%	1,01%	0,00%
1/128	0,00%	0,00%	0,00%

1/256	0,00%	0,00%	0,00%
<i>K. marxianus</i>	1,6297	1,7133	0,604
% d'inhibition par <i>K. marxianus</i>	0%	0 %	0%

Les pourcentages présentés dans le tableau précédent ont été représentés par des histogrammes dans la **Figure 11**:

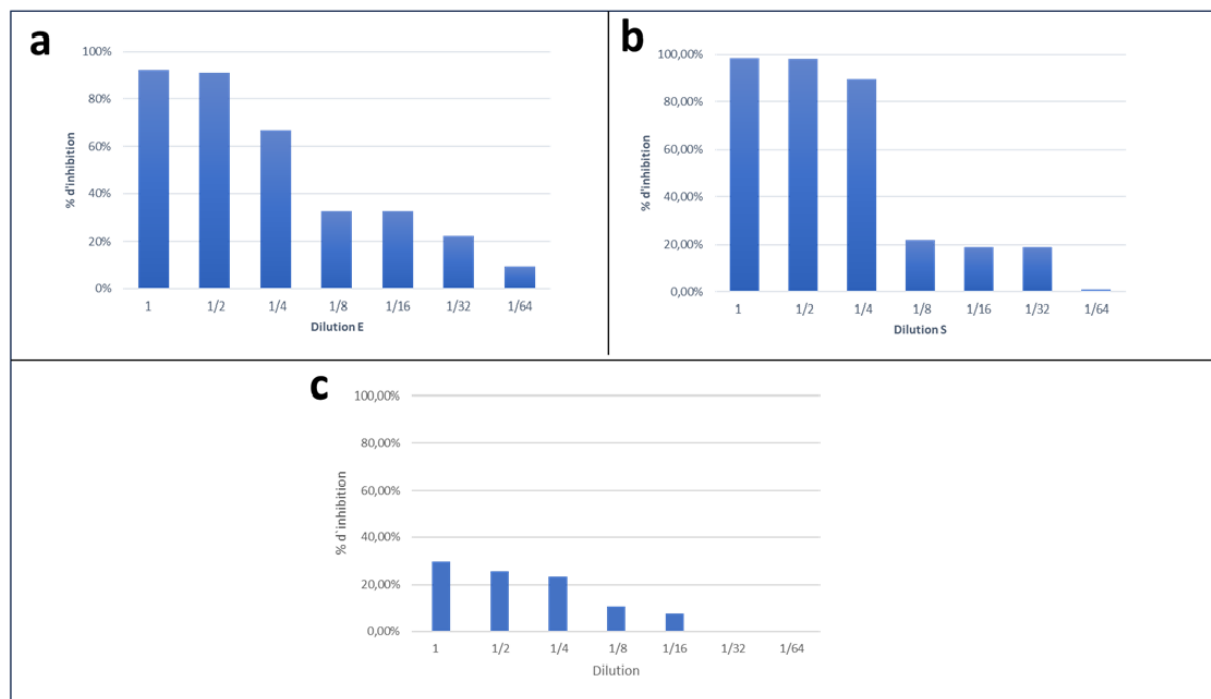


Figure 11 : Histogrammes représentant le pourcentage d'inhibition des cibles (a) *E. coli* (ATCC25922), (b) *S. aureus* (ATCC 25933), (c) *C. albicans* (ATCC 10231) par les nanoparticules d'argent issue du surnageant de *K. marxianus*. GBC2.

L'analyse de cette figure montre que l'activité antimicrobienne est plus importante à l'égard d'*E. coli* (ATCC25922) et *S. aureus* (ATCC 25933) avec un pourcentage d'inhibition par la suspension mère de 92% et 98,59% respectivement, en les comparant à celui de *C. albicans* (ATCC 10231) qui est de 29,65%. Cette activité antimicrobienne est peut-être attribuée aux nanoparticules d'argent colloïdales présentes dans le surnageant de R12. En revanche, l'activité issue des tests effectués avec la suspension homogène du R12 semble résulter de l'effet des nanostructures d'argent formées notamment les nanocomposites AgNPs-*K. marxianus* en suspension.

V.1.2. Concentration minimale bactéricide (CMB) des nanostructures et des nanoparticules colloïdales d'argent

Concernant les nanoparticules d'argent colloïdales récupérées par centrifugation, aucune concentration n'a présenté d'effet bactéricide. En revanche, la détermination de la CMB des nanostructures d'argent issues du R12 sans centrifugation a révélé des valeurs comprises entre

0,26 et 4,18 mg/mL, correspondant respectivement aux dilutions 1/64 et 1/4. En effet, La CMB a été atteinte après 6 heures d'exposition pour les deux souches cibles, *S. aureus* (ATCC 25933) et *E. coli* (ATCC 25922). Alors que, *C. albicans* (ATCC 10231) s'est révélée plus résistante, nécessitant des concentrations plus élevées de 2,09 et 4,18 mg/mL pour une élimination après 6 heures et 2 heures de contact, respectivement. Plusieurs études ont été réalisées sur l'activité antibactérienne des nanostructures d'argent notamment les nanocomposites à l'égard d'*E. coli* tel que celle de **Pernas-Pleite et al., (2025b)** qui a révélé une activité à une concentration de 0,63 jusqu'à 1,13 µg/mL.

Une différence de sensibilité est à souligner entre les bactéries (Gram positif et négatif) et les levures. La résistance de *C. albicans* (ATCC 10231) à l'égard des nanostructures d'argent est probablement due à l'épaisseur et la composition de sa paroi, principalement par présence du glucane, glucose, chitine et d'une couche externe de mannoprotéines fortement glycosylées, limitant la perméabilité aux molécules externes (**Lipke et Ovalle 1998**).

V.2. Activité anti-biofilm des nanostructures d'argent

En premier lieu la capacité de formation de biofilm par les souches cibles pathogènes a été évaluée, et les résultats d'adhésion sur microplaque 96 puits ont été présentés dans la **Figure 9**, et les valeurs d'absorbance à 630nm varient de la plus élevée (1,204 pour *S. aureus* ATCC 25933) à la plus faible (0,385 pour *E. coli* 25922).

Ce test a révélé que les souches *S. aureus* ATCC 25933 et *C. albicans* ATCC 10231 possèdent le potentiel d'adhésion le plus élevé, les classant comme étant fortement adhérentes selon la classification établie par **Stepanović et al. (2000)**, suivie par les souches *B. subtilis* ATCC 6633 et *E. coli* 25922 qui sont classées comme étant modérément adhérentes. Ces résultats concordent avec ceux rapportés par **Barache et al. (2020)** qui ont observé une absorbance de 0,366 pour *E. coli* 8739 et de 1,368 pour *S. aureus* 2S6, indiquant respectivement un potentiel modéré et élevé d'adhésion.

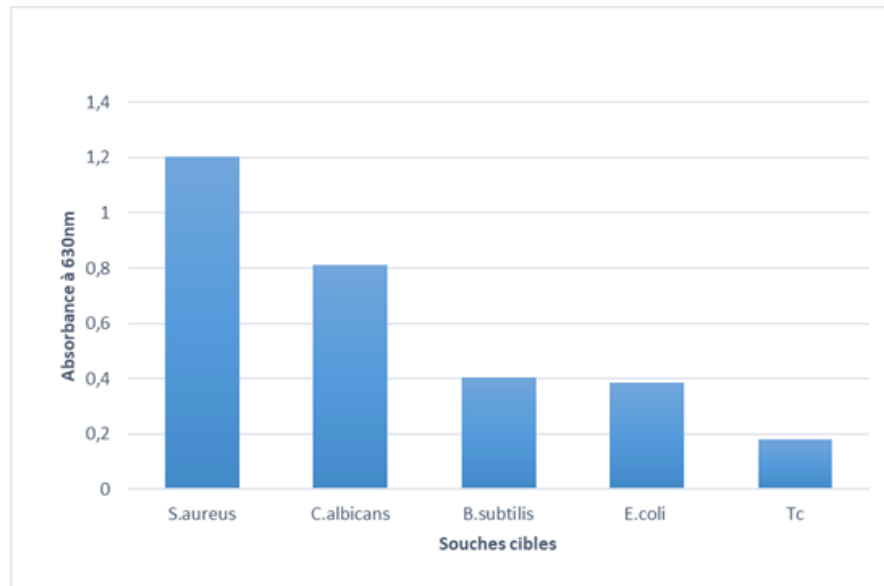


Figure 12: Caractérisation de l'adhésion des souches pathogènes sur microplaque en polystyrène de 96 puits

Toutefois, la capacité de formation de biofilm de ces souches pathogènes a été complètement inhibée par l'application de différentes concentrations de nanostructures d'argent, allant de 6,52 à 52 $\mu\text{g/mL}$. L'inhibition du biofilm formé par *S. aureus* ATCC 25933 a nécessité l'utilisation de la concentration la plus élevée qu'est de 52 $\mu\text{g/mL}$, alors qu'une concentration de 26 $\mu\text{g/mL}$ a été nécessaire pour éliminer l'adhésion de *C. albicans* ATCC 10231. Cependant, de faibles concentrations de 13 et 6,52 $\mu\text{g/mL}$ ont été enregistrées respectivement pour l'inhibition du biofilm formé par *B. subtilis* ATCC 6633 et *E. coli* 25922.

En comparant nos résultats à ceux rapportés par **Shaaban et al. (2024)** qui ont étudié la biosynthèse des nanoparticules d'argent par le surnageant de culture de *Streptomyces enissocaesilis* BS1, des taux d'inhibition de 34,75 et 39,08% ont été enregistrés respectivement à l'égard de *E. coli* ATCC 8739 et de *S. aureus* ATCC 6598 en utilisant une concentration de l'ordre de 5000 $\mu\text{g/mL}$, qu'est nettement plus élevée et moins efficace par rapport aux concentrations rapportées dans notre étude. Cet écart peut être justifié par le choix de la souche et l'utilisation des cellules ou bien du surnageant.

Les biofilms microbiens représentent un défi de taille dans plusieurs secteurs, notamment industriel et hospitalier, en constituant un problème de santé publique. Cette conformation en communauté microbienne confère aux microorganismes une résistance accrue à l'égard des traitements, en particulier les antibiotiques (**Rather et al., 2021**). L'utilisation des nanostructures d'argent a révélé une efficacité notable même à de faibles concentrations, particulièrement par le biais de plusieurs mécanismes d'inhibition, dont cette facilité à traverser et à diffuser à travers la

matrice du biofilm qui joue le rôle d'une barrière physique, ce qui permet aux nanostructures par leur petite taille d'atteindre leur cible dans la profondeur de la structure du biofilm (**Hussein et Khadum 2021**).

V.3. Test antidiabétique de l'enzyme alpha-amylase

Les résultats du test de l'alpha-amylase exprimés en pourcentages d'inhibition sont regroupés dans le **tableau XV**.

Tableau XVII: Pourcentages d'inhibition de l'enzyme alpha-amylase

Echantillon	AgNO ₃	K. m V	K. m M	R12	Acarbose
Moyen % D'inhibition	31,04±2,0798	31,87±1,4901	34,57±1,9574	95,39±1,1193	95,65±4,0137

Le pourcentage d'inhibition de l'enzyme alpha-amylase par les quatre échantillons : *K. marxianus* Vivante, *K. marxianus* Morte, suspension R12 et AgNO₃, comparé à un inhibiteur de référence qui est l'acarbose. Ces résultats montrent que parmi les échantillons testés l'AgNO₃, *K. marxianus* M et *K. marxianus* V présentent presque le même pourcentage (entre 31 et 34%) d'inhibition ce qui signifie qu'ils induisent une inhibition modérée de l'alpha-amylase, suggérant une certaine activité antidiabétique, bien que moins marquée que celle de R12 qui est équivalente l'activité de l'acarbose à 95% d'inhibition qui est probablement due aux nanostructures d'argent synthétisées par *K. marxianus* dans les conditions optimales.

Conclusion

Conclusion

Cette étude a été menée au sein du laboratoire N°1 et N°3 du Bloc 09, Département de Biotechnologie, FSNV, UAM Bejaia, dont le but était la valorisation d'un coproduit du secteur dans la biosynthèse de nanostructures d'argent.

Tout d'abord, une première optimisation a permis de conclure que les nanostructures d'argent synthétisées dans de l'eau et incubée pendant 24h en utilisant *K. marxianus* GBC2, a donné les meilleurs résultats antimicrobiens. Puis, une optimisation de trois facteurs ($[AgNO_3]$, pH et T), influençant la biosynthèse des nanostructures d'argent à partir des levures (*K. marxianus* GBC2), par plan d'expérience utilisant le modèle Box-Behnken a été entreprise. Les paramètres optimaux trouvés sont : $[AgNO_3] = 0,1M$, pH = 3,5 et T = 83°C.

L'analyse dans le domaine de l'UV-Visible a révélé un pic d'absorption caractéristique de la biosynthèse des nanostructures d'argent situé à 415 nm. L'analyse infrarouge à transformée de Fourier a démontré que les AgNPs ont été stabilisées par les mêmes groupements fonctionnels présents dans la levure *K. marxianus* GBC2 (K.m). Une bande d'environ 2800 cm^{-1} a été observée dans le spectre FTIR de la levure *K. m*, caractéristique des groupements méthylène (CH_2) indiquant la présence de chaînes carbonées probablement issues des sucres. En revanche, cette bande est atténuée dans le spectre des AgNPs, ce qui est probablement dû à la participation des sucres dans la réduction des nanoparticules d'argent.

L'activité antioxydant et l'activité antidiabétique de ces nanostructures d'argent ont été évaluées. Le pouvoir réducteur du radical libre oxyde nitrique a été déterminé, avec un pouvoir inhibiteur à hauteur de 58%, les AgNPs échangent un électron avec ce radical fortement instable et deviennent des $AgNO^+$. L'activité réductrice du fer des AgNPs a été déterminée à 27,64 mg E T /gK.m. Les meilleurs résultats de l'activité anti-diabétique ont été aussi obtenus pour les nanostructures d'argent avec un pourcentage d'inhibition de l' α -amylase estimé à 95%.

L'activité antimicrobienne a été menée sur quatre cibles de références (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *B. subtilis* (ATCC 6633) et *C. albicans* (ATCC 10231)). Les meilleurs résultats ont été obtenus à l'égard du pathogène *S. aureus* avec une concentration minimale inhibitrice des AgNPs de 52 $\mu g/mL$ et un pourcentage d'inhibition de la formation de son biofilm estimé à 100%.

Les résultats obtenus nous encouragent à investiguer d'avantage cette voie pour de possibles applications dans le domaine de la santé et l'agro-alimentaire. Des études *in vivo* de la

toxicité de ces nanostructures d'argent seraient envisageables pour déterminer les doses létales, leur stabilité dans le temps ainsi leur mécanisme d'action de manière détaillée.

.

Références

Bibliographiques

Références bibliographiques

- A. Mohamed, Asem, M.K. Zahran, et M.H. El-Rafie. 2017. « Biogenesis of Silver Nanoparticles Feasible for Industrial Application Using Yeast-Fungi Secreted Enzymes and Proteins ». *Egyptian Journal of Chemistry*, Conference Issue, 49-61. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2017.1623.1136>.
- Abada, Emad, Abdullah Mashraqi, Yosra Modafer, Mohamed A. Al Abboud, et A. El-Shabasy. 2024. « Review green synthesis of silver nanoparticles by using plant extracts and their antimicrobial activity ». *Saudi Journal of Biological Sciences* 31 (1): 103877. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103877>.
- Abbas, Rimsha, Jingjing Luo, Xue Qi, Adeela Naz, Imtiaz Ahmad Khan, Haipeng Liu, Suzhu Yu, et Jun Wei. 2024. « Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications ». *Nanomaterials* 14 (17): 1425. <https://doi.org/10.3390/nano14171425>.
- Ahasanul Karim, Natela Gerliani, et Mohammed Aïder. 2020. « *Kluyveromyces marxianus* : An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology ». *International Journal of Food Microbiology* 333:108818. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108818>.
- Ahmed, Shakeel, Mudasir Ahmad, Babu Lal Swami, et Saiqa Ikram. 2016. « A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise ». *Journal of Advanced Research* 7 (1): 17-28. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2015.02.007>.
- Ait Ouali, Fatma, Imad Al Kassaa, Benoit Cudennec, Marwan Abdallah, Farida Bendali, Djamila Sadoun, Nour-Eddine Chihib, et Djamel Drider. 2014. « Identification of Lactobacilli with Inhibitory Effect on Biofilm Formation by Pathogenic Bacteria on Stainless Steel Surfaces ». *International Journal of Food Microbiology* 191 (novembre):116-24. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>.
- Ali, Sikander, Hijab Zahra, Muhammad Usman Ahmad, Amany A. Abdel-Rheem, Muhammad Afzaal, Rab Nawaz, Bakar Bin Khatab Abbasi, Ali Irfan, et Yousef A. Bin Jordan. 2025. « Synergistic photocatalytic and biomedical applications of Ag₂O-immobilized Bacillus subtilis-hyaluronic acid ». *Microbial Cell Factories* 24 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/s12934-025-02750-9>.
- Al-Jumaili, Ahmed, Peter Mulvey, Avishek Kumar, Karthika Prasad, Kateryna Bazaka, Jeffrey Warner, et Mohan V. Jacob. 2019. « Eco-Friendly Nanocomposites Derived from Geranium Oil and Zinc Oxide in One Step Approach ». *Scientific Reports* 9 (1): 5973. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42211-z>.
- Almatroudi, Ahmad. 2020. « Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterisation and Biomedical Applications ». *Open Life Sciences* 15 (1): 819-39. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0094>.
- Altammar, Khadijah A. 2023. « A review on nanoparticles: characteristics, synthesis, applications, and challenges ». *Frontiers in Microbiology* 14 :1155622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1155622>.
- Alves, Mariana Fuinhas, et Patrick G. Murray. 2022. « Biological Synthesis of Monodisperse Uniform-Size Silver Nanoparticles (AgNPs) by Fungal Cell-Free Extracts at Elevated Temperature and pH ». *Journal of Fungi* 8 (5): 439. <https://doi.org/10.3390/jof8050439>.
- Ansari, Mohammad Azam, Haris Manzoor Khan, Aijaz Ahmed Khan, Mohammad Kaleem Ahmad, Abbas Ali Mahdi, Ruchita Pal, et Swaranjit Singh Cameotra. 2014. « Interaction of Silver Nanoparticles with *Escherichia Coli* and Their Cell Envelope Biomolecules ». *Journal of Basic Microbiology* 54 (9): 905-15. <https://doi.org/10.1002/jobm.201300457>.
- Anu Mary Ealia, S, et M P Saravanakumar. 2017. « A Review on the Classification, Characterisation, Synthesis of Nanoparticles and Their Application ». *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering* 263 :032019. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>.
- Ashour, Sanaa Mohamed. 2014. « Silver Nanoparticles as Antimicrobial Agent From *Kluyveromyces marxianus* and *Candida utilis* ». *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci* 3 (8): 384-96.
- Asif, Muhammad, Riffat Yasmin, Rizwan Asif, Ana Ambreen, Madiha Mustafa, et Shehla Umbreen. 2022. « Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs), Structural Characterization, and Their

- Antibacterial Potential ». *Dose-Response* 20 (2): 15593258221088709. <https://doi.org/10.1177/15593258221088709>.
- Bahrulolum, Howra, Saghi Nooraee, Nahid Javanshir, Hossein Tarrahimofrad, Vasiqhe Sadat Mirbagheri, Andrew J. Easton, et Gholamreza Ahmadian. 2021a. « Green Synthesis of Metal Nanoparticles Using Microorganisms and Their Application in the Agrifood Sector ». *Journal of Nanobiotechnology* 19 (1): 86. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00834-3>.
- Bamal, Deepak, Anoop Singh, Gaurav Chaudhary, Monu Kumar, Manjeet Singh, Neelam Rani, Poonam Mundlia, et Anita R. Sehrawat. 2021. « Silver Nanoparticles Biosynthesis, Characterization, Antimicrobial Activities, Applications, Cytotoxicity and Safety Issues: An Updated Review ». *Nanomaterials* 11 (8): 2086. <https://doi.org/10.3390/nano11082086>.
- Barache, Nacim, Yanath Belguesmia, Rabia Ladjouzi, Farida Bendali, et Djamel Drider. 2020. « Clusters of Lactobacillus Strains from Vegetal Origins Are Associated with Beneficial Functions: Experimental Data and Statistical Interpretations ». *Foods* 9 (8): 985. <https://doi.org/10.3390/foods9080985>.
- Barache, Nacim, Yanath Belguesmia, Walid Zeghib, Rabia Ladjouzi, Liza Ouarabi, Farès Boudjouan, Ghania Zidi, Farida Bendali, et Djamel Drider. 2024. « Characterization and Biological In Vitro Screening of Probiotic Yeast Strains Isolated from Algerian Fruits ». *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, novembre. <https://doi.org/10.1007/s12602-024-10389-y>.
- Barros, Caio H. N., Stephanie Fulaz, Danijela Stanisic, et Ljubica Tasic. 2018. « Biogenic Nanosilver against Multidrug-Resistant Bacteria (MDRB) ». *Antibiotics* 7 (3): 69. <https://doi.org/10.3390/antibiotics7030069>.
- Bedlovičová, Zdenka, Imrich Strapáč, Matej Baláž, et Aneta Salayová. 2020. « A Brief Overview on Antioxidant Activity Determination of Silver Nanoparticles ». *Molecules* 25 (14): 3191. <https://doi.org/10.3390/molecules25143191>.
- Boudjouan, Fares, Walid Zeghib, João Carneiro, Raquel Silva, João Morais, Vitor Vasconcelos, et Graciliana Lopes. 2022. « Comparison Study on Wild and Cultivated Opuntia Sp.: Chemical, Taxonomic, and Antioxidant Evaluations ». *Agriculture* 12 (11): 1755. <https://doi.org/10.3390/agriculture12111755>.
- Bruna, Tamara, Francisca Maldonado-Bravo, Paul Jara, et Nelson Caro. 2021. « Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (13): 7202. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>.
- Cekuolyte, Kotryna, Renata Gudiukaite, Vaidas Klimkevicius, Veronika Mazrimaite, Andrius Maneikis, et Egle Lastauskiene. 2023. « Biosynthesis of Silver Nanoparticles Produced Using Geobacillus spp. Bacteria ». *Nanomaterials* 13 (4): 702. <https://doi.org/10.3390/nano13040702>.
- Ceugniet, Alexandre, Djamel Drider, Philippe Jacques, et Françoise Coucheney. 2015. « Yeast Diversity in a Traditional French Cheese "Tomme d'orchies" Reveals Infrequent and Frequent Species with Associated Benefits ». *Food Microbiology* 52 :177-84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.08.001>.
- Colleselli, Lucia, Mira Mutschlechner, Martin Spruck, Florian Albrecht, Oliver I. Strube, Pamela Vrabl, Susanne Zeilinger, et Harald Schöbel. 2024. « Light-Mediated Biosynthesis of Size-Tuned Silver Nanoparticles Using Saccharomyces Cerevisiae Extract ». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 47 (10): 1669-82. <https://doi.org/10.1007/s00449-024-03060-x>.
- Deirram, Nayeleh, Changhe Zhang, Sarah S. Kermaniyan, Angus P. R. Johnston, et Georgina K. Such. 2019. « pH-Responsive Polymer Nanoparticles for Drug Delivery ». *Macromolecular Rapid Communications* 40 (10): 1800917. <https://doi.org/10.1002/marc.201800917>.
- Duman, Hatice, Furkan Eker, Emir Akdaşçi, Anna Maria Witkowska, Mikhael Bechelany, et Sercan Karav. 2024. « Silver Nanoparticles: A Comprehensive Review of Synthesis Methods and Chemical and Physical Properties ». *Nanomaterials* 14 (18): 1527. <https://doi.org/10.3390/nano14181527>.
- Durmazel, Selen, Ayşem Üzer, Buse Erbil, Buse Sayın, et Reşat Apak. 2019. « Silver Nanoparticle Formation-Based Colorimetric Determination of Reducing Sugars in Food Extracts via Tollens' Reagent ». *ACS Omega* 4 (4): 7596-7604. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b00761>.
- Dzhagan, Volodymyr, Oleksandr Smirnov, Mariia Kovalenko, Nazar Mazur, Oleksandr Hreshchuk, Nataliya Taran, Svitlana Plokhovska, et al. 2022. « Spectroscopic Study of Phytosynthesized Ag Nanoparticles and Their Activity as SERS Substrate ». *Chemosensors* 10 (4): 129. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10040129>.

- Eker, Furkan, Hatice Duman, Emir Akdaşçi, Ecem Bolat, Sümeyye Sarıtaş, Sercan Karav, et Anna Maria Witkowska. 2024. « A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity ». *Molecules* 29 (15): 3482. <https://doi.org/10.3390/molecules29153482>.
- Elshobary, Mostafa E., Nadia K. Badawy, Yara Ashraf, Asmaa A. Zatioun, Hagar H. Masriya, Mohamed M. Ammar, Nourhan A. Mohamed, Sohaila Mourad, et Abdelrahman M. Assy. 2025. « Combating Antibiotic Resistance: Mechanisms, Multidrug-Resistant Pathogens, and Novel Therapeutic Approaches: An Updated Review ». *Pharmaceuticals* 18 (3): 402. <https://doi.org/10.3390/ph18030402>.
- EL-Zawawy, Nessma A., Alaa M. Abou-Zeid, Doha M. Beltagy, Nada H. Hantera, et Hoda S. Nouh. 2023a. « Mycosynthesis of Silver Nanoparticles from Endophytic *Aspergillus Flavipes* AUMC 15772: Optimal Statistical Optimization, Characterization and Biological Activities ». *Microbial Cell Factories* 22 (1): 228. <https://doi.org/10.1186/s12934-023-02238-4>.
- Fath-Alla, Aya Adel, Ayman Saber Mohamed, Neveen Mahmoud Khalil, et Mohamed Abd El-Ghany. 2024. « Yeast-Mediated Nanoparticles and Their Biomedical Applications ». *Egyptian Journal of Botany* 64 (4): 166-88. <https://doi.org/10.21608/ejbo.2024.306398.2928>.
- Fohely, F, et N Suardi. 2018. « Study the Characterization of Spectral Absorbance on Irradiated Milk Protein ». *Journal of Physics: Conference Series* 995 (1): 012056. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/995/1/012056>.
- Gahlawat, Geeta, et Anirban Roy Choudhury. 2019. « A Review on the Biosynthesis of Metal and Metal Salt Nanoparticles by Microbes ». *RSC Advances* 9 (23): 12944-67. <https://doi.org/10.1039/C8RA10483B>.
- Gour, Aman, et Narendra Kumar Jain. 2019. « Advances in Green Synthesis of Nanoparticles ». *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 47 (1): 844-51. <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1577878>.
- Horikoshi, Satoshi, et Nick Serpone. 2013. « Introduction to Nanoparticles ». In *Microwaves in Nanoparticle Synthesis*, 1-24. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9783527648122.ch1>.
- Y.Z.N Htwe, W.S. Chow, Y. Suda, et M. Mariatti. 2019. « Effect of Silver Nitrate Concentration on the Production of Silver Nanoparticles by Green Method ». *Materials Today: Proceedings* 17:568-73. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.336>.
- Hussein, Nehia, et Mina M. Khadum. 2021. « Evaluation of the Biosynthesized Silver Nanoparticles' Effects on Biofilm Formation ». *Journal of Applied Sciences and Nanotechnology* 1 (1): 23-31. <https://doi.org/10.53293/jasn.2021.11019>.
- Iravani, S., H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, et B. Zolfaghari. 2014. « Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods ». *Research in Pharmaceutical Sciences* 9 (6): 385-406.
- Jain, Ashvi Sanjay, Pranita Subhash Pawar, Aira Sarkar, Vijayabhaskarreddy Junnuthula, et Sathish Dyawanapelly. 2021. « Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11993. <https://doi.org/10.3390/ijms222111993>.
- Jiang, Zhiwen, Liwei Li, Hao Huang, Wenbin He, et Wuyi Ming. 2022. « Progress in Laser Ablation and Biological Synthesis Processes: "Top-Down" and "Bottom-Up" Approaches for the Green Synthesis of Au/Ag Nanoparticles ». *International Journal of Molecular Sciences* 23 (23): 14658. <https://doi.org/10.3390/ijms232314658>.
- Joudeh, Nadeem, et Dirk Linke. 2022. « Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists ». *Journal of Nanobiotechnology* 20 :262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>.
- Kaler et al. 2013. « Green and Rapid Synthesis of Anticancerous Silver Nanoparticles by *Saccharomyces Boulardii* and Insight into Mechanism of Nanoparticle Synthesis ». *BioMed Research International* 2013:872940. <https://doi.org/10.1155/2013/872940>.
- Karageorgou, Dimitra, Panagiota Zygori, Theofylaktos Tsakiridis, Mohamed Amen Hammami, Nikolaos Chalmpes, Mohammed Subrati, Ioannis Sainis, 2022. « Green Synthesis and Characterization of Silver Nanoparticles with High Antibacterial Activity Using Cell Extracts of *Cyanobacterium Pseudanabaena/Limnothrix* sp. ». *Nanomaterials* 12 (13): 2296. <https://doi.org/10.3390/nano12132296>.

- Kaweeteerawat, Chitrada, Preeyawis Na Ubol, Sanirat Sangmuang, Sasitorn Aueviriyavit, et Rawiwan Maniratanachote. 2017. « Mechanisms of Antibiotic Resistance in Bacteria Mediated by Silver Nanoparticles ». *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 80 (23-24): 1276-89. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1376727>.
- Kazemi, Sanaz, Aziz Homayouni-Rad, Hossien Samadi Kafil, Vahideh Sarabi-aghdam, Payam Zeynolabedini, Bahareh Pour Agha, et Sevda Allah Madadi. 2025. « Selection of Appropriate Probiotic Yeasts for Use in Dairy Products: A Narrative Review ». *Food Production, Processing and Nutrition* 7 (1): 13. <https://doi.org/10.1186/s43014-024-00293-x>.
- Kim, Yeon Ju, Priyanka Singh, Deok-Chun Yang, Hina Singh, Chao Wang, Mohamed El-Agamy Farh, et Kyu Hyon Hwang. 2015. « Biosynthesis, Characterization, and Antimicrobial Applications of Silver Nanoparticles ». *International Journal of Nanomedicine*, 2567. <https://doi.org/10.2147/IJN.S72313>.
- Klaus-Joerger, Tanja, Ralph Joerger, Eva Olsson, et Claes-Göran Granqvist. 2001. « Bacteria as Workers in the Living Factory: Metal-Accumulating Bacteria and Their Potential for Materials Science ». *Trends in Biotechnology* 19 (1): 15-20. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01514-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01514-6).
- Koduru, Janardhan Reddy, Suresh Kumar Kailasa, Jigna R. Bhamore, Ki-Hyun Kim, Tanushree Dutta, et Kowsalya Vellingiri. 2018. « Phytochemical-Assisted Synthetic Approaches for Silver Nanoparticles Antimicrobial Applications: A Review ». *Advances in Colloid and Interface Science* 256 :326-39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.03.001>.
- Krishna, Suresh Babu Naidu, Abdul Gaffar Sheik, Karen Pillay, Manhal Ahmed Hamza, Mohammed Yagoub Mohammed Elamir, et Samy Selim. 2024. « Nanotechnology in Action: Silver Nanoparticles for Improved Eco-Friendly Remediation ». *PeerJ* 12 :18191. <https://doi.org/10.7717/peerj.18191>.
- Kthiri, Ameni, Selma Hamimed, Abdelhak Othmani, Ahmed Landoulsi, Siobhan O'Sullivan, et David Sheehan. 2021. « Novel Static Magnetic Field Effects on Green Chemistry Biosynthesis of Silver Nanoparticles in *Saccharomyces Cerevisiae* ». *Scientific Reports* 11 (1): 20078. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99487-3>.
- Lipke Peter N., Ovalle Rafael 1998. « Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges ». *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 1998. <https://doi.org/10.1128/jb.180.15.3735-3740.1998>.
- Liu, Xin, Jia-Le Chen, Wen-Yu Yang, Yu-Cheng Qian, Jing-Yu Pan, Chen-Nianci Zhu, Li Liu, Wen-Bin Ou, Hong-Xin Zhao, et Dian-Peng Zhang. 2021. « Biosynthesis of Silver Nanoparticles with Antimicrobial and Anticancer Properties Using Two Novel Yeasts ». *Scientific Reports* 11 (1): 15795. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95262-6>.
- Manshin, Dmitrii, Maria Kuntsova, Alexey Shilenko, et Anastasia Andreeva. 2025. « Probiotic Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*: Properties and Peculiarities of Use in Functional Foods Development ». *Functional Foods in Health and Disease* 15 (5): 296-315. <https://doi.org/10.31989/ffhd.v15i5.1482>.
- Mogensen, Klaus B., et Katrin Kneipp. 2014. « Size-Dependent Shifts of Plasmon Resonance in Silver Nanoparticle Films Using Controlled Dissolution: Monitoring the Onset of Surface Screening Effects ». *The Journal of Physical Chemistry C* 118 (48): 28075-83. <https://doi.org/10.1021/jp505632n>.
- Mohamed Fahmy, Heba, Ayaat Mahmoud Mosleh, Aya Abd Elghany, Engy Shams-Eldin, Esraa Samy Abu Serea, Somaia Ashour Ali, et Ahmed Esmail Shalan. 2019. « Coated Silver Nanoparticles: Synthesis, Cytotoxicity, and Optical Properties », *RSC Advances*. <https://doi.org/10.1039/C9RA02907A>.
- Mohd Yusof, Hidayat, Rosfarizan Mohamad, Uswatun Hasanah Zaidan, et Nor' Aini Abdul Rahman. 2019. « Microbial Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Their Potential Application as an Antimicrobial Agent and a Feed Supplement in Animal Industry: A Review ». *Journal of Animal Science and Biotechnology* 10 (1): 57. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0368-z>.
- Moosavy, Mir-Hassan, Miguel De La Guardia, Ahad Mokhtarzadeh, Seyed Amin Khatibi, Neda Hosseinzadeh, et Nasser Hajipour. 2023. « Green Synthesis, Characterization, and Biological Evaluation of Gold and Silver Nanoparticles Using *Mentha Spicata* Essential Oil ». *Scientific Reports* 13 (1): 7230. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33632-y>.
- Nain, Ritu, Hardik Patel, Monika Chahar, Sushil Kumar, Deepak Rohilla, et Manas Pal. 2025. « Biosynthesized Metallic Nanoparticles for Sustainable Environmental Remediation: »

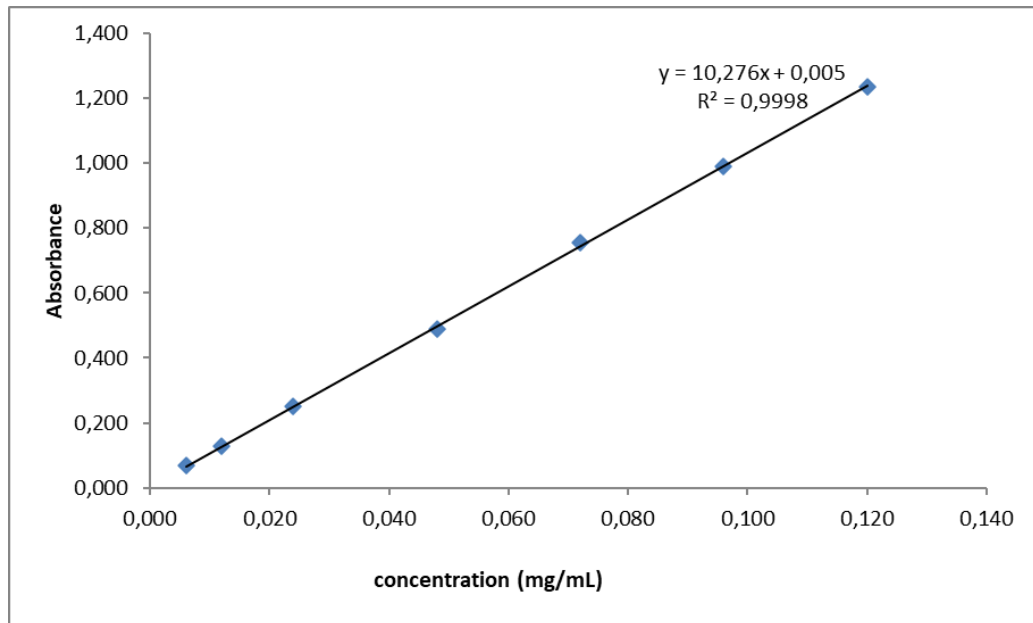
- Mechanisms, Applications, and Future Perspectives ». *Discover Chemistry* 2 (1): 124. <https://doi.org/10.1007/s44371-025-00203-1>.
- Othman, Abdelmageed M., Maysa A. Elsayed, Naser G. Al-Balakocy, Mohamed M. Hassan, et Ali M. Elshafei. 2019. « Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles induced by fungal proteins and its application in different biological activities ». *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 17 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0008-1>.
- Parvekar, Prashik, Jayant Palaskar, Sandeep Metgud, Rahul Maria, et Smita Dutta. 2020. « The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of Silver Nanoparticles against *Staphylococcus Aureus* ». *Biomaterial Investigations in Dentistry* 7 (1): 105-9. <https://doi.org/10.1080/26415275.2020.1796674>.
- Pereyra, Carina, María del Pilar Monge, Silvestre Bongiovanni, Andrea Cristofolini, Sergio Campos, et Lilia Cavaglieri. 2025. « Impact of *Kluyveromyces marxianus* VM004 culture conditions on the cell wall structure and its influence on aflatoxin B1 binding ». *Revista Argentina de Microbiología* 57 (2): 89-97. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.07.004>.
- Pernas-Pleite, Carlos, Amparo M. Conejo-Martínez, Irma Marín, et José P. Abad. 2025a. « Silver Nanoparticles (AgNPs) from *Lysinibacillus* Sp. Culture Broths: Antibacterial Activity, Mechanism Insights, and Synergy with Classical Antibiotics ». *Biomolecules* 15 (5): 731. <https://doi.org/10.3390/biom15050731>.
- Punjabi, Kapil, Snehal Yedurkar, Sejal Doshi, Sunita Deshapnde, et Shashikant Vaidya. 2017. « Biosynthesis of silver nanoparticles by *Pseudomonas* spp. isolated from effluent of an electroplating industry ». *IET Nanobiotechnology* 11 (5): 584-90. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2016.0172>.
- Qiao, Zhuangzhuang, Yan Yao, Shaomin Song, Meihui Yin, et Jianbin Luo. 2019. « Silver Nanoparticles with pH Induced Surface Charge Switchable Properties for Antibacterial and Antibiofilm Applications ». *Journal of Materials Chemistry B* 7 (5): 830-40. <https://doi.org/10.1039/C8TB02917B>.
- Quinteros, Melisa A., Cano Aristizabal Viviana, Renné Onnainty, Verónica S. Mary, Martín G. Theumer, Gladys E. Granero, María G. Paraje, et Paulina L. Páez. 2018. « Biosynthesized Silver Nanoparticles: Decoding Their Mechanism of Action in *Staphylococcus Aureus* and *Escherichia Coli* ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 104 :87-93. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.006>.
- Rather, Muzamil A., Kuldeep Gupta, Pritam Bardhan, Munmi Borah, Anupama Sarkar, Khalifa S. H. Eldiehy, Shuvam Bhuyan, et Manabendra Mandal. 2021. « Microbial Biofilm: A Matter of Grave Concern for Human Health and Food Industry ». *Journal of Basic Microbiology* 61 (5): 380-95. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000678>.
- Răut, Iuliana, Mariana Constantin, Raluca Șuică-Bunghez, Cristina Firincă, Elvira Alexandrescu, Ioana Cătălina Gîfu, Mihaela Doni, Lucian-Gabriel Zamfir, Ana-Maria Gurban, et Luiza Jecu. 2024. « Extracellular Biosynthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles Synthesized by Filamentous Fungi ». *Journal of Fungi* 10 (11): 798. <https://doi.org/10.3390/jof10110798>.
- Raza, Sadaf, Asma Ansari, Nadir Naveed Siddiqui, Fariha Ibrahim, Muhammad Ishaque Abro, et Afsheen Aman. 2021. « Biosynthesis of Silver Nanoparticles for the Fabrication of Non Cytotoxic and Antibacterial Metallic Polymer Based Nanocomposite System ». *Scientific Reports* 11 (1): 10500. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90016-w>.
- Reina-Posso, Diana, et Fernando A. Gonzales-Zubiate. 2025. « Expanding Horizons: The Untapped Potential of *Kluyveromyces Marxianus* in Biotechnological Applications ». *Fermentation* 11 (2): 98. <https://doi.org/10.3390/fermentation11020098>.
- Rodrigues, Adriana S., Jorge G. S. Batista, Murilo Á V. Rodrigues, Velaphi C. Thipe, Luciene A. R. Minarini, Patricia S. Lopes, et Ademar B. Lugão. 2024. « Advances in Silver Nanoparticles: A Comprehensive Review on Their Potential as Antimicrobial Agents and Their Mechanisms of Action Elucidated by Proteomics ». *Frontiers in Microbiology* 15. 1440065 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024>.
- Roychoudhury, Aryadeep. 2020. « Yeast-Mediated Green Synthesis of Nanoparticles for Biological Applications ». *Indian Journal of nanoparticles for biological Research* 8(03):26-31. DOI: 10.30750/ijpbr.8.3.4.
- Saleem S, Iqbal A, Hasnain S. Bacterial mediated silver nanoparticles and their efficacy against MRSA. *Trop Biomed.* 2020 Jun 1;37(2):482-488. PMID: 33612817.

- Salem, Salem S., Ehab F. EL-Belely, Gniewko Niedbala, Maryam M. Alnoman, Saad El-Din Hassan, Ahmed Mohamed Eid, Tharwat I. Shaheen, Amr Elkelish, et Amr Fouda. 2020. « Bactericidal and In-Vitro Cytotoxic Efficacy of Silver Nanoparticles (Ag-NPs) Fabricated by Endophytic Actinomycetes and Their Use as Coating for the Textile Fabrics ». *Nanomaterials* 10 (10): 2082. <https://doi.org/10.3390/nano10102082>.
- Sani Aliero, Abdulrahman, Siti Halimah Hasmoni, Abdurrashid Haruna, Mustapha Isah, Nik Ahmad Nizam Nik Malek, et Nurliyana Ahmad Zawawi. 2025. «Bibliometric Exploration of Green Synthesized Silver Nanoparticles for Antibacterial Activity». *Emerging Contaminants* 11 (1): 100411. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2024.100411>.
- Santhosh, Abhirami, V. Theertha, Priyanka Prakash, et S. Smitha Chandran. 2021. «From Waste to a Value Added Product: Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Onion Peels Together with Its Diverse Applications». *Materials Today: Proceedings* 46:4460-63. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.680>.
- Shaaban, Mohamed T., Briksam S. Mohamed, Muhammad Zayed, et Sabha M. El-Sabbagh. 2024. « Antibacterial, antibiofilm, and anticancer activity of silver-nanoparticles synthesized from the cell-filtrate of *Streptomyces enissocaesilis* ». *BMC Biotechnology* 24:8. <https://doi.org/10.1186/s12896-024-00833-w>.
- Sivagnanam, Saravana Periaswamy, Adane Tilahun Getachew, Jae Hyung Choi, Yong Beom Park, Hee Chul Woo, et Byung Soo Chun. 2017. «Green Synthesis of Silver Nanoparticles from Deoiled Brown Algal Extract via Box-Behnken Based Design and Their Antimicrobial and Sensing Properties». *Green Processing and Synthesis* 6 (2): 147-60. <https://doi.org/10.1515/gps-2016-0052>.
- Sobczak-Kupiec, A., D. Malina, Z. Wzorek, et M. Zimowska. 2011. «Influence of Silver Nitrate Concentration on the Properties of Silver Nanoparticles». *Micro & Nano Letters* 6 (8): 656-60. <https://doi.org/10.1049/mnl.2011.0152>.
- Stepanović, Srdjan, Dragana Vuković, Ivana Dakić, Branislava Savić, et Milena Švabić-Vlahović. 2000. « A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation ». *Journal of Microbiological Methods* 40 (2): 175-79. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6).
- Swebosci, Tomasz, Alexandre Barras, Aleksandra Maria Kocot, Magdalena Plotka Not Provided, et Rabah Boukherroub Not Provided. 2023. «Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Assays Using Broth Microdilution Method V1» Protocols io. <https://doi.org/10.17504/protocols.io.5qpvo3x6dv4o/v1>.
- Swidan, Nada S., Yomna A. Hashem, Walid F. Elkhatib, et Mahmoud A. Yassien. 2022. «Antibiofilm Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles against Biofilm Associated Enterococcal Urinary Pathogens ». *Scientific Reports* 12 (1): 3869. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-07831-y>.
- Tiquia-Arashiro, Sonia, et Debora Frigi Rodrigues. 2016. «*Extremophiles: Applications in Nanotechnology*». Cham: Springer International Publishing. 1-51 <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45215-9>.
- Torimiro, Nkem, Oluwafemi B Daramola, Olusegun D Oshibanjo, Frank O Otuyelu, Bolanle A Akinsanola, Omolola O Yusuf, Odunayo T Ore, et Richard K Omole. 2021. « Eco restoration of Heavy Metals and Toxic Chemicals in Polluted Environment Using Microbe-Mediated Nanomaterials » International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation 9(1):8-21
- Tran Khac, Khoi, Hiep Hoang Phu, Hue Tran Thi, Van Dinh Thuy, et Hue Do Thi. 2023. « Biosynthesis of silver nanoparticles using tea leaf extract (*camellia sinensis*) for photocatalyst and antibacterial effect ». *Heliyon* 9 (10): e20707. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20707>.
- Tullio, Vivian. 2024. « Probiotic Yeasts: A Developing Reality? » *Journal of Fungi* 10 (7): 489. <https://doi.org/10.3390/jof10070489>.
- Vanlalveni, Chhangte, Vanlalhruii Ralte, Hlawngcheu Zohmingliana, Shikhasmita Das, Jasha Momo H. Anal, Samuel Lallianrawna, et Samuel Lalthazuala Rokhum. 2024. « A review of microbes mediated biosynthesis of silver nanoparticles and their enhanced antimicrobial activities ». *Heliyon* 10 (11): e32333. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32333>.
- Wahab, Maryam, Attiya Bhatti, et Peter John. 2022. « Evaluation of Antidiabetic Activity of Biogenic Silver Nanoparticles Using *Thymus Serpyllum* on Streptozotocin-Induced Diabetic BALB/c Mice ». *Polymers* 14 (15): 3138. <https://doi.org/10.3390/polym14153138>.
- Xu, Li, Yi-Yi Wang, Jie Huang, Chun-Yuan Chen, Zhen-Xing Wang, et Hui Xie. 2020. « Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety ». *Theranostics* 10 (20): 8996-9031. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>.

Annexes

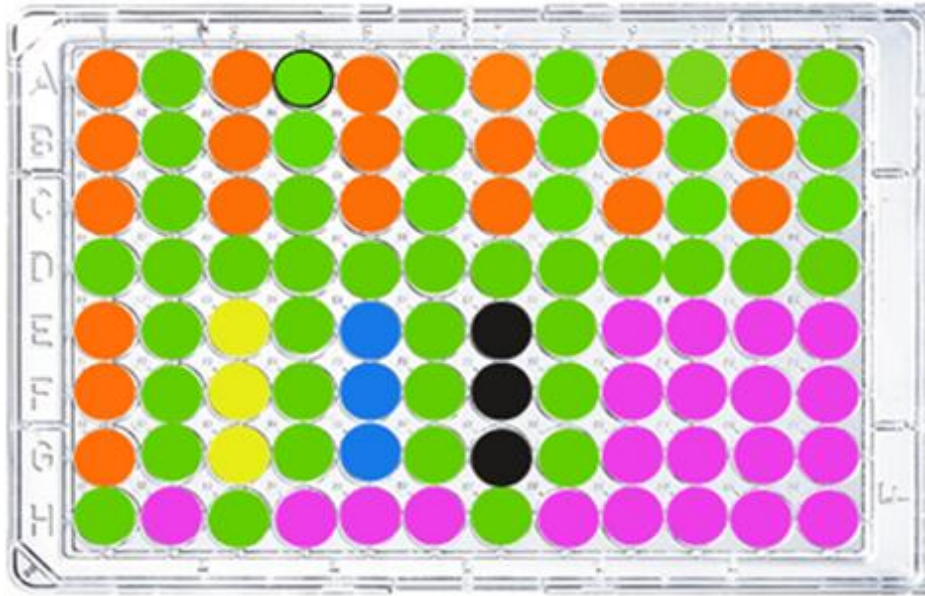
Annexe A

Courbe d'étalonnage du TROLOX pour test FRAP



Annexe B

Plan de ma microplaque de la concentration minimale inhibitrice CMI

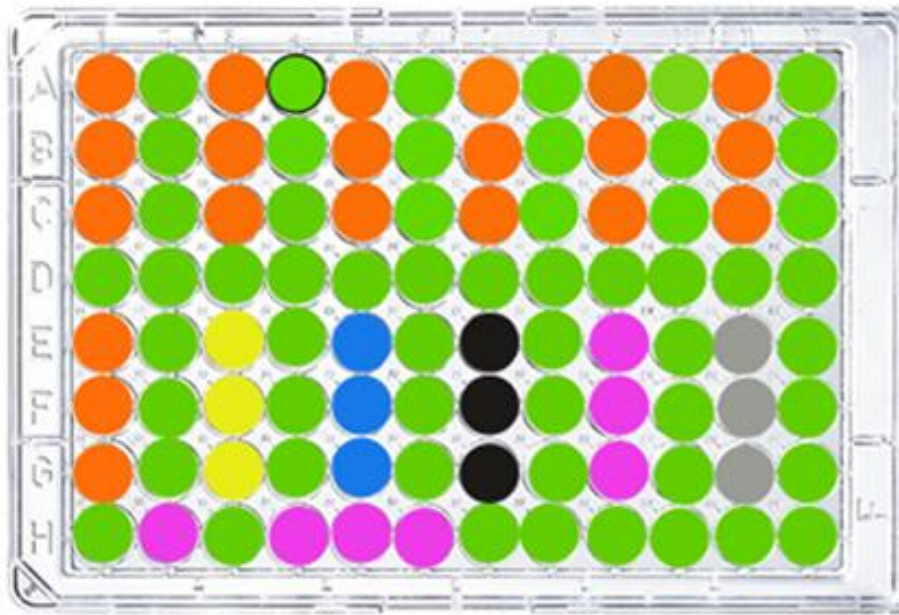


Composition de chaque puit :

- Vert : 200 μ L de TSB stérile .
- Orange : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible +50 μ L de la solution R12 (SM1/64).
- Jaune : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L de l'eau distillée.
- Bleu : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L AgNO_3 .
- Noir : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L de la suspension de *Kluyveromyces marxianus* GBC2.
- Rose : 150 μ L de TSB + 50 μ L de la solution R12 (SM1/64).

Annexe C

Plan de la microplaque de la concentration minimale bactéricide CMB :



Composition de chaque puit :

- Vert : 200 μ L de TSB stérile .
- Orange : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible +50 μ L de la solution R12 (SM1/64).
- Jaune : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L de l'eau distillée.
- Bleu : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L AgNO_3 .
- Noir : 100 μ L de TSB + 50 μ L de la suspension de la cible + 50 μ L de la suspension de *Kluyveromyces marxianus* GBC2.
- Rose : 150 μ L de TSB + 50 μ L de la solution R12 (SM1/64).
- Gris : 150 μ L de TSB + 50 μ L de la cible.

Annexe D

Tableau: Activité antimicrobienne des tests de 24,48 et 72h des nanostructures issues de *S.cerevisiae*.F6

	Cibles	<i>E.coli</i> (ATCC25922)		<i>S.aureus</i> (ATCC 25933)		<i>C.albicans</i> ,(ATCC 10231)	
Temps d'incubation	Milieu de culture	Test	Témoin	Test	Témoin	Test	Témoin
24h	BN	13,10	13,40	16,45	17,10	19,95	21,05
	EP	12,85	12,60	19,50	15,90	18,85	16,65
	ED	12,55	/	13,65	/	17,25	/
48h	BN	11,95	12,10	12,55	13,40	16,05	16,35
	EP	14,50	11,85	12,90	12,60	15,55	16,05
	ED	11,60	/	13,20	/	13,55	/
72h	BN	13,00	12,75	12,45	12,35	24,70	12,90
	EP	12,40	12,35	11,65	12,65	16,35	17,30
	ED	13,25	/	12,50	/	13,10	/

Tableau: Activité antimicrobienne des tests de 24,48 et 72h des nanostructures issues de *K.marxianus*.
GBC2.

	Cibles	<i>E.coli</i> (ATCC25922)		<i>S.aureus</i> (ATCC 25933)		<i>C.albicans</i> ,(ATCC 10231)	
Temps d'incubation	Milieu de culture	Test	Témoin	Test	Témoin	Test	Témoin
24h	BN	12,90	12,60	17,75	19,05	17,45	18,40
	EP	13,10	12,60	15,65	15,90	17,10	15,65
	ED	13,10	/	18,30	/	19,25	/
48h	BN	13,95	12,45	15,50	15,00	16,05	16,35
	EP	12,85	12,45	14,45	13,80	14,70	13,65
	ED	12,85	/	14,20	/	15,05	/
72h	BN	12,75	13,00	17,10	17,20	17,60	17,90
	EP	12,30	11,85	15,50	16,80	17,00	17,40
	ED	12,75	/	16,30	/	17,45	/

Résumé :

Cette étude vise à étudier les propriétés physico-chimiques et biologiques des nanostructures d'argent biosynthétisées à partir des levures (*S. cerevisiae* F6 et *K. marxianus* GBC2). Les paramètres optimaux ($[AgNO_3]=0,1$ M, pH=3,5 et $T=83^{\circ}C$) pour la biosynthèse de ces nanostructures ont été déterminés en déployant un plan de réponse Box-Behnken à trois facteurs ($[AgNO_3]$, pH et T) et à trois niveaux (-1,0,+1). La caractérisation par spectroscopie FTIR et UV-visible a met en exergue la formation de nanostructures d'argent (Ag NPs), notamment par l'implication des sucres dans la réduction des ions métallique Ag^+ en Ag^0 et leur stabilisation par les protéines contenues dans les levures. Les nanostructures d'argent ont exhibé une bonne activité antioxydante avec des taux d'inhibition de 61% et 58% vis-à-vis des radicaux libres $ABTS^{++}$ et NO^* , respectivement. Une excellente activité antidiabétique des nanostructures d'argent, d'une valeur de 95%, contre l'enzyme α -amylase a été trouvée. Les nanostructures d'argent ont démontré des activités antimicrobienne et anti-biofilm à l'égard des cibles pathogènes (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *B. subtilis*(ATCC 6633) et *C. albicans*(ATCC 10231)), dont une CMI de 0.266 mg/mL vis-à-vis de *S. aureus* et une concentration de 52 $\mu g/mL$ induisant 100% d'inhibition du biofilm formé par ce pathogène.

Mots Clés : *S. cerevisiae* F6, *K. marxianus* GBC2, Nanostructures Ag, Biosynthèse, Activités antimicrobiennes, Activité anti-biofilm, Activité antioxydante et antidiabétique.

Abstract:

This study aims to investigate the physicochemical and biological properties of silver nanostructures biosynthesized from yeasts (*S. cerevisiae* F6 and *K. marxianus* GBC2). The optimal parameters ($[AgNO_3]=0.1$ M, pH=3.5 and $T=83^{\circ}C$) for the biosynthesis of these nanostructures were determined by deploying a Box-Behnken response plan with three factors ($[AgNO_3]$, pH and T) and three levels (-1, 0, +1). The results of the Characterization by FTIR and UV-visible spectroscopy highlights the formation of silver nanostructures (Ag NPs), notably through the involvement of yeast sugars in the reduction of Ag^+ metal ions to Ag^0 and their stabilization by yeast proteins. The silver nanostructures exhibited good antioxidant activity with inhibition rates of 61% and 58% against $ABTS^{++}$ and NO^* free radicals, respectively. Excellent antidiabetic activity of the silver nanostructures, with a value of 95%, against the enzyme α -amylase. The silver nanostructures demonstrated antimicrobial and anti-biofilm activities against pathogenic targets (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *B. subtilis* (ATCC 6633), and *C. albicans* (ATCC 10231)), including an MIC of 0.266 mg/mL against *S. aureus* and a concentration of 52 $\mu g/mL$ inducing 100% inhibition of the biofilm formed by this pathogen.

Keywords: *S. cerevisiae* F6, *K. marxianus* GBC2, Ag nanostructures, Biosynthesis, Antimicrobial activities, Anti-biofilm activity, Antioxidant and antidiabetic activity.

Agzul:

Tazrawt-a tesaeiswi n unadiyeffyawsiwin n tfekka d tfekka n tmezdiyin n lfeṭṭayettwasnulfan seg tmezdiyin (*S. cerevisiae* F6 d *K. marxianus* GBC2). Iferdisenigerzen ($[AgNO_3]=0,1$ M, pH=3,5 d $T=83^{\circ}C$) itmezdiyin n tmezdiyin-a ttwafernen s useqdec n wahil n tgermant n Box-Behnken s kraḍ n yiferdisen ($[AgNO_3]$, pH d T) d kraḍ n yiswiren (-1,0,+1). Tazrawt s FTIR d tmuyli n UV tettbeggin-d lebni n tmezdiyin n lfeṭṭa (Ag NPs), ladya s tmezdiyin n ssker deg usnefli n yiyunen n wuzzal Ag^+ ar Ag^0 d ussebdednsent s tmezdiyinyellan deg tmezdiyin. Nanostructures n lfeṭṭasseknent-d tigawtyelhan n tmezdiyin s tyawsiwin n ushulfu n 61% d 58% mgal $ABTS^{++}$ d NO^* n tmezdiyintelleliyin, yaliwet deg-sent. Ufan-d tigawtyelhanmgalssker n tmezdiyin n lfeṭṭa, s wazal n 95%, mgalanzim α -amylase. Tisnatwilin n lfeṭṭasseknent-d tigawt n tmezdiyin d tmezdiyin n tmezdiyimgaliswiyen n tmezdiyin (*E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25933), *B. subtilis* (ATCC 6633), d *C. n* tmerna n 52 $\mu g/mL$ i d-yettawin 100% n ushulfu n tbiyufilmi d-yesnulfauyersiw-a.

Awal n tmezriwt : *S. cerevisiae* F6, *K. marxianus* GBC2, Tiybula n tmezriwin n Ag, Tazmert n tmezriwin, Tigawtmgal n tmezriwin, Tigawt n tmezriwin n tmezriwin, Tigawt n tmezriwin d tmezriwin n tmezriwin.

ملخص

هدفت هذه الدراسة بدراسة الخصائص الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية للبنات النانوية الفضية المصنعة حيويًا من مخمرة (*S. cerevisiae* F6 و *K. marxianus* GBC2). للتحديد الأمثل لهذه البنى النانوية تم استخدام مخطط استجابة بوكس-بينكن (Box-Behnken) مع ثلاثة عوامل ($[AgNO_3]$ ، pH و T) و ثلاث المستويات (-1، 0، +1). أظهرت نتائج التحليل الطيفي (FTIR و UV-Visible) تكوين نانوبنى الفضة (Ag NPs)، حيث لعبت السكريات الموجودة في الخميرة دورًا في اختزال Ag^+ إلى Ag^0 واستقرارها بواسطة بروتينات الخميرة. أظهرت البنى النانوية الفضية نشاطًا مضادًا للأوكسيداز جيداً بمتوسط 61% و 58% ضد الجذور الحرة $ABTS^{++}$ و NO^* . أظهرت البنى النانوية الفضية نشاطاً مضاداً للميكروبات وبتأثيرها على إنزيم α -amylase بمقدار 95%. أظهرت البنى النانوية الفضية نشاطاً مضاداً للفطريات (*E. coli* (ATCC 25922)، *S. aureus* (ATCC 25933)، *B. subtilis* (ATCC 6633)، و *C. albicans* (ATCC 10231))، حيث أظهرت نشاطاً مضاداً للفطريات بقيمة MIC = 0.266 ملغم/مل ضد *S. aureus* و تركيز 52 $\mu g/mL$ يحد من نمو البنية الفضية بنسبة 100%.

الكلمات المفتاحية:

S. cerevisiae F6، *K. marxianus*

البنات النانوية الفضية، التخليق الحيوي، الأنشطة المضادة للميكروبات، النشاط المضاد للأغشية الحيوية، النشاط المضاد للأوكسيداز مضاد السكر GBC2