

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des sciences biologiques et agronomiques
Département biochimie-microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Évaluation des activités antibactériennes et antibiofilm des
nanoparticules Cu-acide tannique et Cu-acide gallique**

Réalisé par :

YAMANI Soltana

HAMIDANI Romaiassa

Devant le jury

| | | | |
|------------------|----------------|--------------------------------|-------|
| Président | SEBBANE Hillal | Maître de conférences classe A | UMMTO |
| Examineur | MSELA Amine | Maître de conférences classe B | UMMTO |
| Promoteur | HOUALI Karim | Professeur | UMMTO |

Année universitaire 2025/2026.

République Algérienne Démocratique Et Populaire
Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou
Faculté des sciences biologiques et agronomiques
Département biochimie-microbiologie



Mémoire de fin d'études

En vue d'obtention du diplôme de Master en sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

**Évaluation des activités antibactériennes et antibiofilm des
nanoparticules Cu-acide tannique et Cu-acide gallique**

Réalisé par :

YAMANI Soltana

HAMIDANI Romaiassa

Devant le jury

| | | | |
|------------------|----------------|--------------------------------|-------|
| Président | SEBBANE Hillal | Maître de conférences classe A | UMMTO |
| Examineur | MSELA Amine | Maître de conférences classe B | UMMTO |
| Promoteur | HOUALI Karim | Professeur | UMMTO |

Année universitaire 2025/2026.

Remerciements

Nous remercions avant tout Dieu Tout-Puissant de nous avoir donné la force et la patience nécessaires pour réaliser ce travail.

*Nous exprimons notre profonde gratitude à notre encadreur, **Mr. HOUALI Karim**, professeur à l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou (UMMTO), pour son encadrement, ses conseils, sa disponibilité et son soutien tout au long de ce travail.*

*Nous remercions également **Mr. SEBBANE Hillal** d'avoir accepté de présider ce jury, ainsi que **Mr. MSELA Amine** pour avoir accepté d'examiner notre mémoire.*

*Nos sincères remerciements vont aussi à Mme **IZERGHOUF Tenhinene** et Mme **SADOUN Nassima** pour leur précieuse aide, leur disponibilité ainsi que leur accompagnement tout au long de la réalisation de ce travail au sein du département de Biologie.*

Nous remercions également l'ensemble des enseignants et du personnel du département de Biologie de l'Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou pour leur contribution à notre formation.

Dédicace

À mon très cher père, **Karim**,
tu as toujours été mon pilier, ma force et mon exemple dans la vie.
Tes sacrifices silencieux, tes encouragements et ton dévouement m'ont permis d'avancer et de persévérer.

Ta confiance en moi m'a donné la force de surmonter les moments les plus difficiles.
J'espère de tout cœur te rendre fier aujourd'hui et toujours.

À ma chère mère, **Nabila**,
aucun mot ne pourra exprimer l'amour, la tendresse et la patience que tu m'as offerts depuis toujours.

Tu as été mon refuge, ma lumière et mon plus grand soutien.
Tes prières, tes conseils et ton amour infini m'ont accompagné à chaque étape de ma vie.
Si j'ai pu arriver jusqu'ici, c'est grâce à toi.

À mes chers frères, **Aziz et Nacer**,
merci pour votre soutien et votre présence tout au long de mon parcours.
Je vous souhaite de réussir encore plus que moi et d'atteindre tous vos rêves.
Je suis fier de vous et heureux de vous avoir dans ma vie.

À la mémoire de mon cher **grand-père**,
dont l'amour, la sagesse et les valeurs continueront toujours d'éclairer mon chemin.
Même absent aujourd'hui, son souvenir demeure vivant dans mon cœur et m'accompagne dans chacune de mes réussites.

À ma chère **grand-mère**,
pour sa tendresse, ses prières, son soutien et son affection inestimable.
Que Dieu lui accorde santé, bonheur et une longue vie.

À ma binôme, **Romaïssa**,
pour sa collaboration, sa patience, son sérieux et tous les efforts partagés tout au long de ce travail.
Merci pour les moments de soutien, d'entraide et de persévérance qui ont contribué à l'aboutissement de ce mémoire.

À la famille **Yamani** et à la famille **Saadi**,
Je vous exprime ma profonde gratitude pour votre soutien, votre affection et votre présence tout au long de mon parcours.
Votre encouragement a toujours été pour moi une véritable force et une grande source de motivation.

Softana

Dédicace

*À mon très cher père, **Mohammed,***

*Merci pour tous les sacrifices, le courage et la force que tu m'as transmis.
Ton soutien silencieux et ta confiance en moi ont toujours été ma plus grande motivation.
J'espère te rendre fier aujourd'hui et pour toujours.*

*À ma très chère mère, **Nadia,***

*Merci pour ton amour infini, ta patience et tes prières qui m'ont accompagnée à chaque étape
de ma vie.
Tu es ma force, mon refuge et la plus belle bénédiction de mon existence.*

*À mon grand frère, **Arezki,***

*Merci pour ton soutien, tes encouragements et ta présence précieuse tout au long de mon
parcours.
Je suis heureuse de t'avoir à mes côtés.*

*À mon cher cousin, **Younes,***

*Merci pour ta bienveillance, ton soutien et l'attention que tu m'as toujours portée.
Ta présence a eu une grande valeur pour moi.*

*À mon médecin de famille, **Dr LAHLOU Abdellah,***

*Je vous exprime ma profonde gratitude pour votre soutien, votre disponibilité et vos conseils
tout au long de mon parcours. Votre bienveillance restera pour moi une marque de respect et
de reconnaissance.*

*À ma binôme, **Soltana,***

*Merci pour ton engagement, ta patience et la collaboration précieuse tout au long de ce
travail.
Cette expérience partagée restera un souvenir important de mon parcours.*

*À toute ma famille, **HAMIDANI et RAMDANE,***

*Merci pour votre affection, vos encouragements et vos prières.
Je partage avec vous cette réussite avec beaucoup d'amour et de gratitude.*

Romaïssa

Sommaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abreviations

Resume

Abstract

ملخص

Introduction generale

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 1 |
| 1. L'antibioresistance | 4 |
| 1.1. Les infections bacteriennes | 4 |
| 1.2.2. Domaines d'utilisation des antibiotiques | 5 |
| 1.2.3. Principales classes d'antibiotiques | 5 |
| 1.3 émergence et propagation de l'antibioresistance..... | 6 |
| 1.3.1. Mecanismes de propagation de l'antibioresistance | 7 |
| 1.4 principales bacteries impliquees dans l'antibioresistance | 8 |
| 1.5 mecanismes de resistance aux antibiotiques | 9 |
| 1.6 alternatives aux antibiotiques conventionnels..... | 10 |
| 2. Nanoparticules metalliques | 11 |
| 2.1. Parametres influençant les proprietes des nanoparticules metalliques..... | 11 |
| 2.2. Synthese des nanoparticules metalliques | 13 |
| 2.3 synthese verte des nanoparticules de cuivre..... | 15 |
| 2.4 le cuivre comme modele metallique..... | 15 |
| 2.5 polyphenols | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.5.1 acide gallique (ag) | 16 |
| 2.5.2 acide tannique (at) | 17 |
| 2.6 role des polyphenols dans la synthese verte | 18 |
| 2.6.1. Interaction cuivre – acide gallique | 18 |
| 2.6.2 interaction cuivre – acide tannique..... | 18 |
| 2.7. Activite antibacterienne des nanoparticules metalliques..... | 19 |
| 2.8. Activite antibiofilm des nanoparticules metalliques | 20 |
| 2.9. Toxicite des nanoparticules metalliques..... | 20 |
| 3. Applications des nanoparticules metalliques..... | 21 |
| 3.1 applications dans les textiles et dispositifs medicaux | 21 |
| 3.2. Applications dans les revetements et peintures antimicrobiennes | 21 |
| 3.3. Autres applications industrielles et environnementales..... | 22 |
| Materiels et methodes..... | 24 |
| 1. Materiel biologique | 24 |
| 2. Synthese des nanoparticules cu–acide gallique (cu–ag) et cu–acide tannique (cu–at) | 24 |
| 3. Activites antibacteriennes..... | 27 |
| 3.1. Determination concentration minimale inhibitrice (cmi)..... | 27 |
| 3.2. Concentration minimale bactericide (cmb) | 29 |
| 3.3. Test de time-kill assay | 30 |
| 4. Activite antibiofilm | 32 |
| 4.1. Mise en evidence qualitative du biofilm (rouge congo agar)..... | 32 |
| 4.2. Evaluation quantitative du biofilm (methode au cristal violet)..... | 33 |
| 4.3. Test d’inhibition de la formation du biofilm | 33 |
| <i>Resultats et discussion</i> | 35 |

| | |
|--|----|
| 1. Rendement des nanoparticules synthetisees..... | 35 |
| 2. Determination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactericide | 36 |
| 3. Le test de time-kill assay..... | 43 |
| 4. Activite anti-biofilms..... | 47 |
| 4.1. Test de formation de biofilms..... | 50 |
| 4.1.1. Methode qualitative..... | 50 |
| 4.1.2. Methode quantitative..... | 51 |
| 4.2. Test d'inhibition de formation de biofilm | 53 |
| Conclusion..... | 59 |
| Annexe | 58 |

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1. Schéma synthétique des mécanismes de transfert horizontal de gènes..... | 7 |
| Figure 2. Structure de l'acide gallique | 17 |
| Figure 3. Structure de l'acide tannique..... | 17 |
| Figure 4. Schéma représentatif des différentes étapes de la synthèse des nanoparticules..... | 26 |
| Figure 5. Détermination de la CMI par microdilution en microplaque 96 puits. | 29 |
| Figure 6. Détermination de la concentration minimale bactéricide. | 30 |
| Figure 7. Mise en évidence qualitative du biofilm. | 32 |
| Figure 8. Évaluation de l'activité antibactérienne des nps Cu-acide galliquen contre <i>Staphylococcus aureus</i> | 38 |
| Figure 9. Évaluation de l'activité antibactérienne des nps Cu-acide tannique contre <i>Staphylococcus aureus</i> | 38 |
| Figure 10. Évaluation de l'activité antibactériennedes nanoparticules Cu-acide tannique sur <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| Figure 11. Évaluation de l'activité antibactérienne des nanoparticules Cu-acide galliqu sur <i>Escherichia coli</i> | 39 |
| Figure 12. Courbe de croissance d' <i>Escherichia coli</i> en présence et absence des nanoparticules Cu-AG. | 44 |
| Figure 13. Courbe de croissance de <i>Staphylococcus aureus</i> en présence et absence des nanoparticules Cu-AG..... | 44 |
| Figure 14. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide gallique sur <i>Staphylococcus aureus</i> | 45 |
| Figure 15. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide gallique sur <i>Escherichia coli</i> | 45 |

| | |
|---|----|
| Figure 16. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide tannique sur <i>Staphylococcus aureus</i> | 46 |
| Figure 17. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide tannique sur <i>Escherichia coli</i> | 46 |
| Figure 18. Aspect de <i>staphylococcus aureus</i> et <i>escherichia coli</i> sur gélose rouge Congo..... | 50 |
| Figure 19. Résultats du test de formation de biofilm. | 52 |
| Figure 20. Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> par les Nps Cu-AT | 54 |
| Figure 21. Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> par les Nps Cu-AG..... | 54 |
| Figure 22. Résultats d'inhibition de formation de biofilms par les NpsCu-AT..... | 55 |
| Figure 23. Résultats d'inhibition de formation de biofilms par les Nps Cu-AG..... | 55 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau I Principales classes d'antibiotiques, leurs mécanismes d'action et leurs applications cliniques. | 6 |
| Tableau II Principales bactéries impliquées dans l'antibiorésistance | 8 |
| Tableau III Méthodes de synthèse des nanoparticules métalliques | 14 |
| Tableau IV Concentrations des espèces actives utilisées pour la CMI | 27 |
| Tableau V CMI et CMB des différents composés vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> | 34 |
| Tableau VI CMI et CMB des différents composés vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> | 37 |
| Tableau VII CMI et CMB des différents composés vis-à-vis d' <i>Escherichia coli</i> | 37 |
| Tableau VIII CMI et CMB des différents composés vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> | 44 |
| Tableau IX Capacité de formation du biofilm de <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Escherichia coli</i> évaluée par la méthode au cristal violet. | 51 |

Liste des abréviations

- AT : Acide Tannique
- AG : Acide Gallique
- ATP : Adénosine Triphosphate
- ATCC : American Type Culture Collection
- CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
- CMB : Concentration Minimale Bactéricide
- Cu : Cuivre
- Cu⁰ : Cuivre Métallique
- Cu²⁺ : Ion Cuivre (II)
- CuSO₄ : Sulfate De Cuivre
- Cu₂O : Oxyde Cuivreux
- CuO : Oxyde De Cuivre
- Cu-AG : Nanoparticules Cuivre-Acide Gallique
- Cu-AT : Nanoparticules Cuivre-Acide Tannique
- DO : Densité Optique
- LPS : Lipopolysaccharides
- PBP : Penicillin-Binding Proteins(Protéines De Liaison A La Pénicilline)
- PBP2a : Protéine De Liaison A La Pénicilline Modifiée
- ROS : Reactiveoxygenspecies (Espèces Réactives De L'oxygène)
- SOD : Superoxydedismutase
- WHO : World Healthorganization (Organisation Mondiale De La Santé)
- ZnO : Oxyde De Zinc

Résumé

L'antibiorésistance représente une menace majeure pour la santé publique mondiale en raison de l'augmentation des bactéries multirésistantes et de la diminution de l'efficacité des antibiotiques conventionnels. Cette problématique est aggravée par la capacité de certaines bactéries à former des biofilms, structures qui renforcent leur tolérance aux traitements antimicrobiens. Dans ce contexte, les nanoparticules de cuivre synthétisées par voie verte constituent une alternative prometteuse grâce à leur activité antimicrobienne à large spectre et à leurs mécanismes d'action multiples. Cette étude a eu pour objectif d'évaluer les activités antibactériennes et antibiofilm de nanoparticules de cuivre associées à l'acide gallique (Cu-AG) et l'acide tannique (Cu-AT). Les nanoparticules ont été obtenues par synthèse verte, puis testées contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922. L'activité antibactérienne a été évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale bactéricide (CMB) et par un test de Time-Kill. L'activité antibiofilm a été étudiée par les méthodes au rouge Congo, au cristal violet et par un test d'inhibition de la formation du biofilm. Les rendements de synthèse ont atteint 99,6 % pour les nanoparticules Cu-AG et 87,5 % pour les Cu-AT. Les nanoparticules Cu-AG ont présenté la meilleure activité inhibitrice (CMI = 5 mg/mL), tandis que les Cu-AT ont montré une activité bactéricide (CMB/CMI = 1 ; CMI = 10 mg/mL). Les essais de Time-Kill ont confirmé une diminution progressive de la viabilité bactérienne au cours du temps. Par ailleurs, les deux formulations ont inhibé significativement la formation du biofilm de *S. aureus*, les Cu-AG présentant les taux d'inhibition les plus élevés. Ces résultats démontrent que l'association cuivre-polyphénols améliore les propriétés antibactériennes et antibiofilm des nanoparticules synthétisées et souligne leur potentiel comme alternative prometteuse pour lutter contre les infections bactériennes et l'antibiorésistance.

Mots-clés. Antibiorésistance ; Nanoparticules de cuivre ; Synthèse verte ; Acide gallique ; Acide tannique ; Activité antibactérienne ; Activité antibiofilm ; *Staphylococcus aureus* ; *Escherichia coli*.

Abstract

Antimicrobial resistance has become a major global public health challenge due to the increasing emergence of multidrug-resistant bacteria and the declining effectiveness of conventional antibiotics. This issue is further exacerbated by the ability of certain bacteria to form biofilms, which enhance their tolerance to antimicrobial agents. In this context, green-synthesized copper nanoparticles represent a promising alternative owing to their broad-spectrum antimicrobial activity and multi-target mechanisms of action. This study aimed to evaluate the antibacterial and antibiofilm activities of copper nanoparticles synthesized using gallic acid (Cu-GA) and tannic acid (Cu-TA). The nanoparticles were synthesized through a green approach and tested against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. Antibacterial activity was assessed by determining the minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC), and by performing a Time-Kill assay. Antibiofilm activity was evaluated using the Congo red agar method, the crystal violet assay, and a biofilm formation inhibition test. The synthesis yields reached 99.6% for Cu-GA nanoparticles and 87.5% for Cu-TA nanoparticles. Cu-GA nanoparticles exhibited the strongest inhibitory activity (MIC = 5 mg/mL), whereas Cu-TA nanoparticles demonstrated bactericidal activity (MBC/MIC = 1; MIC = 10 mg/mL). Time-Kill assays confirmed a progressive reduction in bacterial viability over time. Furthermore, both nanoparticle formulations significantly inhibited *S. aureus* biofilm formation, with Cu-GA nanoparticles showing the highest inhibition rates.

Overall, these findings demonstrate that the copper-polyphenol association enhances the antibacterial and antibiofilm properties of the synthesized nanoparticles and highlights their potential as promising alternatives for combating bacterial infections and antimicrobial resistance.

Keywords: Antimicrobial resistance; Copper nanoparticles; Green synthesis; Gallic acid; Tannic acid; Antibacterial activity; Antibiofilm activity; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*.

ملخص

تُعدّ مقاومة المضادات الحيوية من أبرز التحديات الصحية العالمية نتيجة التزايد المستمر في ظهور البكتيريا متعددة المقاومة وانخفاض فعالية المضادات الحيوية التقليدية. وتتفاقم هذه المشكلة بسبب قدرة بعض البكتيريا على تكوين الأغشية الحيوية، التي تزيد من قدرتها على تحمل العوامل المضادة للميكروبات. وفي هذا السياق، تمثل جسيمات النحاس النانوية المحضّرة بالتخليق الأخضر بديلاً واعدًا بفضل نشاطها المضاد للميكروبات واسع الطيف وآليات عملها متعددة الأهداف. هدفت هذه الدراسة إلى تقييم النشاط المضاد للبكتيريا والنشاط المضاد لتكوين الأغشية الحيوية لجسيمات النحاس النانوية المحضّرة باستعمال حمض الغاليك وحمض التانيك.

تم تحضير الجسيمات النانوية بطريقة التخليق الأخضر، ثم تقييم نشاطها ضد المكورات العنقودية الذهبية والإشريكية القولونية. وتم تقييم النشاط المضاد للبكتيريا من خلال تحديد التركيز المثبط الأدنى، والتركيز القاتل الأدنى، بالإضافة إلى اختبار القتل مع الزمن. كما تم تقييم النشاط المضاد لتكوين الأغشية الحيوية باستخدام وسط أحمر الكونغو، واختبار البنفسج البلوري، واختبار تثبيط تكوين الغشاء الحيوي.

% الجسيمات النحاس-حمض التانيك. وأظهرت **87.5%** لجسيمات النحاس-حمض الغاليك و**99.6%** بلغت مردودية التخليق جسيمات النحاس-حمض الغاليك أعلى نشاط مثبط للنمو البكتيري، في حين أظهرت جسيمات النحاس-حمض التانيك نشاطاً قاتلاً للبكتيريا. كما أكدت نتائج اختبار القتل مع الزمن حدوث انخفاض تدريجي في حيوية البكتيريا مع مرور الزمن. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت كلتا الصيغتين قدرة ملحوظة على تثبيط تكوين الغشاء الحيوي لدى المكورات العنقودية الذهبية، مع تسجيل أعلى نسب التثبيط بواسطة جسيمات النحاس-حمض الغاليك.

تؤكد هذه النتائج أن الجمع بين النحاس والبوليفينولات يعزز الخصائص المضادة للبكتيريا والمضادة لتكوين الأغشية الحيوية للجسيمات النانوية المحضّرة، مما يبرز إمكاناتها كبديل واعد لمكافحة العدوى البكتيرية ومقاومة المضادات الحيوية.

مقاومة المضادات الحيوية؛ جسيمات النحاس النانوية؛ التخليق الأخضر؛ حمض الغاليك؛ حمض التانيك؛ الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للبكتيريا؛ النشاط المضاد للأغشية الحيوية؛ المكورات العنقودية الذهبية؛ الإشريكية القولونية.

Introduction générale

Introduction

Les infections bactériennes demeurent un défi majeur de santé publique en raison de leur fréquence élevée, de leur impact sur la morbidité et la mortalité, ainsi que des coûts importants qu'elles engendrent pour les systèmes de santé (**Ahmed et al., 2024**). Elles concernent aussi bien les infections communautaires que les infections associées aux soins, ces dernières étant particulièrement préoccupantes en raison de la circulation de bactéries multirésistantes au sein des établissements hospitaliers (**Ho et al., 2025**).

Depuis leur introduction, les antibiotiques ont profondément transformé la prise en charge des infections bactériennes. Toutefois, leur utilisation massive et parfois inappropriée en médecine humaine, vétérinaire et en agriculture a favorisé l'émergence de bactéries résistantes, réduisant progressivement l'efficacité des traitements conventionnels (**Sora et al., 2026**). L'antibiorésistance constitue aujourd'hui l'une des principales menaces sanitaires mondiales et compromet la prise en charge de nombreuses infections auparavant facilement traitables (**Karnwal et al., 2025**).

Parmi les bactéries les plus préoccupantes figurent *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*, responsables d'un large éventail d'infections humaines. Leur capacité à développer divers mécanismes de résistance, notamment la production d'enzymes inactivant les antibiotiques, la modification des cibles thérapeutiques, la surexpression des pompes d'efflux ou encore la diminution de la perméabilité membranaire, limite considérablement les options thérapeutiques disponibles (**Ahmed et al., 2024 ; AbiaetEssack, 2023**).

À cette problématique s'ajoute la capacité de certaines bactéries, notamment *Staphylococcus aureus*, à former des biofilms. Ces communautés bactériennes organisées, entourées d'une matrice extracellulaire protectrice, constituent une barrière physique limitant la diffusion des antibiotiques et protégeant les bactéries contre les défenses immunitaires de l'hôte. Les cellules incluses dans un biofilm peuvent être jusqu'à plusieurs centaines de fois plus tolérantes aux agents antimicrobiens que leurs homologues planctoniques, favorisant ainsi la persistance des infections chroniques, les récurrences et les échecs thérapeutiques (**Tanwar et al., 2024**).

Face à ces limites, le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes est devenu indispensable. Plusieurs approches alternatives, telles que les peptides antimicrobiens, la phagothérapie ou les composés naturels, ont été proposées. Cependant, leur application reste souvent limitée par des problèmes de stabilité, de coût, de spécificité ou de production à grande échelle (**Karnwal et al., 2025**).

Dans ce contexte, les nanoparticules métalliques apparaissent comme une stratégie particulièrement prometteuse. Contrairement aux antibiotiques conventionnels qui ciblent généralement un seul processus biologique, les nanoparticules exercent une activité antimicrobienne selon plusieurs mécanismes simultanés. Elles peuvent adhérer à la surface bactérienne, perturber l'intégrité de la membrane, libérer des ions métalliques toxiques, générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et provoquer des dommages irréversibles aux protéines, aux lipides membranaires et à l'ADN. Cette action multi-cible réduit considérablement la probabilité de développement de résistances bactériennes (**Jiang et al., 2024**).

En outre, les nanoparticules présentent un intérêt supplémentaire grâce à leur capacité à prévenir la formation des biofilms ou à perturber ceux déjà établis. Leur très faible taille favorise leur diffusion au sein de la matrice extracellulaire, où elles peuvent atteindre directement les cellules bactériennes, perturber les mécanismes de communication cellulaire (quorum sensing) et limiter la production de la matrice polymérique responsable de la stabilité du biofilm (**Tanwar et al., 2024**). Ainsi, une même formulation nanoparticulaire peut agir à la fois contre les bactéries sous forme planctonique et contre leur mode de vie en biofilm, ce qui représente un avantage majeur par rapport aux antibiotiques classiques.

Parmi les nanoparticules métalliques, celles à base de cuivre présentent un intérêt particulier. Le cuivre possède une activité antimicrobienne reconnue, un coût nettement inférieur à celui des métaux nobles tels que l'argent ou l'or et une disponibilité importante, ce qui en fait un candidat attractif pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens (**Lungu et al., 2026**). Cependant, les propriétés biologiques des nanoparticules de cuivre dépendent fortement de leur méthode de synthèse et des molécules utilisées pour leur stabilisation.

Dans cette optique, la synthèse verte constitue une approche particulièrement intéressante. En utilisant des composés naturels tels que l'acide gallique et l'acide tannique comme agents réducteurs et stabilisants, elle permet d'éviter l'utilisation de réactifs chimiques toxiques, de limiter l'impact environnemental et d'obtenir des nanoparticules plus stables et potentiellement plus biocompatibles (**Che Lah et al., 2022**). De plus, ces deux polyphénols possèdent eux-mêmes des propriétés antioxydantes et antimicrobiennes susceptibles d'influencer les caractéristiques physicochimiques et l'efficacité biologique des nanoparticules obtenues. Toutefois, les données comparant directement les performances antibactériennes et antibiofilm des nanoparticules de cuivre stabilisées respectivement par l'acide gallique et par l'acide tannique restent limitées.

C'est dans ce contexte que s'inscrit la problématique de cette étude : les nanoparticules de cuivre synthétisées par voie verte à l'aide de l'acide gallique et de l'acide tannique constituent-elles une alternative efficace aux antibiotiques conventionnels pour inhiber la croissance bactérienne et prévenir la formation des biofilms chez des bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* ?

Afin de répondre à cette problématique, cette étude vise à :

- * Synthétiser des nanoparticules de cuivre par voie verte à partir des associations cuivre–acide gallique et cuivre–acide tannique.
- * Évaluer leur activité antibactérienne à travers la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale bactéricide (CMB) et l'étude de Time-Kill .
- * Évaluer leur capacité à inhiber la formation du biofilm chez une souche de *Staphylococcus aureus* productrice de biofilm.

Synthèse
bibliographique

1. L'antibiorésistance

1.1. Les infections bactériennes

Les infections bactériennes constituent une cause majeure de morbidité et de mortalité à l'échelle mondiale, malgré les progrès considérables réalisés dans le domaine de la thérapeutique anti-infectieuse. Ces infections peuvent affecter divers systèmes de l'organisme, notamment les voies urinaires, l'appareil respiratoire, le tractus digestifs ainsi que le système sanguin, et évoluer vers des complications sévères telles que les septicémies (Whelan *et al.*, 2023).

Parmi les infections bactériennes les plus fréquemment rencontrées, les infections urinaires occupent une place prépondérante. Elles sont majoritairement attribuées aux souches uropathogènes de *Escherichia coli* (UPEC), responsables d'une grande partie des infections communautaires et hospitalières (Whelan *et al.*, 2023).

Les infections nosocomiales constituent également une problématique majeure dans les établissements de soins, en raison de la diffusion de bactéries pathogènes et de l'augmentation des résistances aux antibiotiques, considérées comme les principaux agents étiologiques des infections urinaires communautaires et nosocomiales (Howden *et al.*, 2023). Le succès pathogène de ces souches repose sur l'expression de multiples facteurs de virulence favorisant l'adhésion aux cellules épithéliales, la colonisation des voies urinaires ainsi que la persistance au sein de l'hôte, expliquant ainsi leur implication récurrente dans les infections cliniques (Torres-Puiget *al.*, 2022 ; Whelan *et al.*, 2023).

Parallèlement, les infections associées aux soins constituent une problématique croissante dans les établissements hospitaliers. La forte pression antibiotique exercée en milieu clinique, combinée à la circulation continue de microorganismes pathogènes et à la présence de patients vulnérables, favorise l'émergence et la dissémination de bactéries résistantes aux antibiotiques. Cette situation complique considérablement les stratégies thérapeutiques et contribue à l'augmentation du risque d'échec clinique (Howden *et al.*, 2023).

Dans ce contexte, *Staphylococcus aureus* occupe une place centrale parmi les pathogènes responsables des infections nosocomiales. Cette bactérie opportuniste est impliquée dans un large éventail d'infections cutanées, respiratoires, ostéoarticulaires et systémiques. Sa remarquable capacité à former des biofilms, associée à son aptitude à

acquérir des résistances à plusieurs classes d'antibiotiques, notamment chez les souches résistantes à la méthicilline (SARM), constitue un facteur majeur de persistance et de chronicité des infections (Cheung *et al.*, 2023 ; Howden *et al.*, 2023).

1.2 Utilisation des antibiotiques

L'introduction des antibiotiques dans la pratique médicale a marqué une avancée majeure dans l'histoire de la médecine moderne. Depuis leur découverte, ces molécules ont permis de réduire significativement la mortalité liée aux infections bactériennes et d'améliorer considérablement le pronostic de nombreuses pathologies infectieuses. Leur utilisation a également rendu possibles plusieurs pratiques médicales à haut risque infectieux, notamment les interventions chirurgicales invasives, les transplantations d'organes, les chimiothérapies anticancéreuses et les traitements immunosuppresseurs (Ventola, 2024).

1.2.2. Domaines d'utilisation des antibiotiques

Les antibiotiques sont largement utilisés dans plusieurs domaines complémentaires. En médecine humaine, ils constituent la base du traitement des infections bactériennes communautaires et hospitalières (urinaires, respiratoires, cutanées et systémiques). En médecine vétérinaire, ils sont employés pour la prise en charge des infections animales ainsi que dans certains cas à visée prophylactique. Par ailleurs, leur utilisation en élevage et en agriculture a longtemps contribué à la prévention des maladies infectieuses. Toutefois, cette consommation importante exerce une pression de sélection permanente sur les populations bactériennes, favorisant l'émergence et la diffusion de souches résistantes dans les environnements humain, animal et environnemental (Laxminarayan *et al.*, 2023 ; Prestinaci *et al.*, 2023).

1.2.3. Principales classes d'antibiotiques

Les antibiotiques utilisés en pratique clinique sont regroupés en plusieurs classes principales selon leur structure chimique et leur mécanisme d'action. (Patel *et al.*, 2023).

Tableau I. Principales classes d'antibiotiques utilisés en médecine humaine, leurs mécanismes d'action et leurs applications cliniques. (Katzung et Trevor 2024)

| Classe d'antibiotiques | Exemples | Mécanisme d'action | Importance clinique |
|--------------------------------------|----------------------------------|--|--|
| β-lactamines | Pénicillines, Céphalosporines | Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne. | Très utilisés contre <i>Escherichia coli</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> |
| Fluoroquinolones | Ciprofloxacine, Levofloxacine | Inhibition de l'ADN gyrase | Infections urinaires et respiratoires |
| Macrolides | Azithromycine, Érythromycine | Inhibition de la synthèse protéique (50S) | Infections respiratoires |
| Aminoglycosides | Gentamicine, Amikacine | Inhibition de la synthèse protéique (30S) | Infections sévères hospitalières |
| Tétracyclines | Doxycycline | Inhibition de la synthèse protéique | Infections à large spectre |

1.3 Émergence et propagation de l'antibiorésistance

La propagation de l'antibiorésistance résulte principalement de l'utilisation excessive et parfois inappropriée ou prolongée des antibiotiques en médecine humaine et vétérinaire, exerçant une pression de sélection constante sur les populations bactériennes et favorisant ainsi l'émergence et la diffusion de souches résistantes (Ahmed et al., 2024).

Par ailleurs, l'utilisation des antibiotiques en élevage et en agriculture contribue également à ce phénomène, notamment par la présence de résidus dans l'environnement, tels que les eaux usées et les sols agricoles, qui maintiennent cette pression sélective. Les milieux hospitaliers constituent également des foyers majeurs de diffusion, en raison de la forte consommation d'antibiotiques, de la concentration de patients vulnérables et de la circulation de bactéries multirésistantes. L'ensemble de ces facteurs explique l'ampleur actuelle de l'antibiorésistance à l'échelle mondiale (Laxminarayan et al., 2023 ; Ahmed et al., 2024).

1.3.1. Mécanismes de propagation de l'antibiorésistance

La dissémination des résistances bactériennes repose principalement sur le transfert horizontal de gènes, mécanisme permettant l'échange de matériel génétique entre bactéries. Ce transfert implique des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons, qui facilitent l'acquisition rapide de gènes codant pour différents déterminants de résistance (Al-Khalaifah, 2025).

Ce phénomène favorise non seulement la transmission des résistances au sein d'une même espèce bactérienne, mais également entre espèces phylogénétiquement différentes. Ainsi, l'antibiorésistance s'inscrit dans une dynamique complexe impliquant les interactions entre les secteurs humain, animal et environnemental, conformément au concept intégré « One Health » (Akunne et al., 2025 ; Al-Khalaifah, 2025). Les différents mécanismes de transfert génétique sont présentés dans la figure 1.

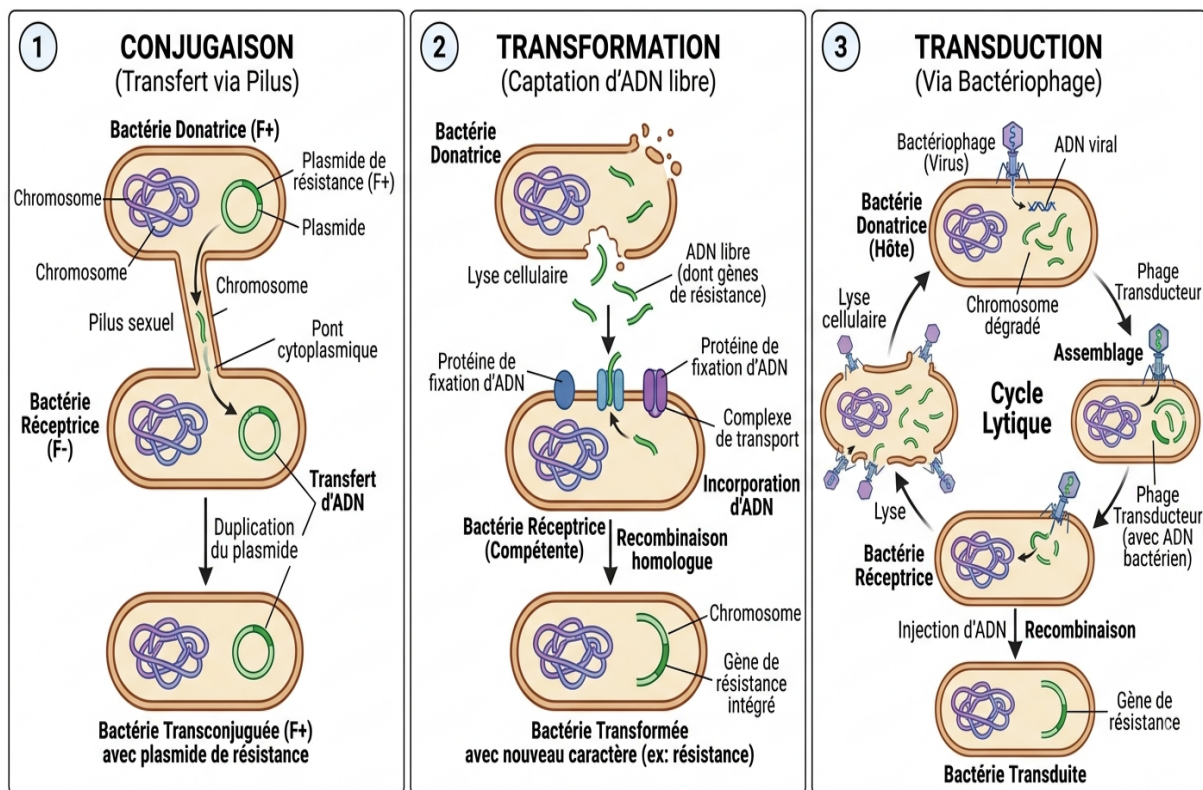


Figure 1. Schéma synthétique des mécanismes de transfert horizontal de gènes impliqués dans l'antibiorésistance, élaboré à partir des données de (Lerminiaux et Cameron, 2019).

1.4 Principales bactéries impliquées dans l'antibiorésistance

L'antibiorésistance concerne un large éventail de bactéries pathogènes, incluant à la fois les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, impliquées dans les infections communautaires et nosocomiales (Ho et al., 2025). Certaines espèces sont considérées comme prioritaires en raison de leur forte prévalence clinique, de leur capacité d'adaptation et de leur aptitude à accumuler plusieurs mécanismes de résistance, constituant ainsi une menace majeure pour la santé publique mondiale (Karnwal et al., 2025). Le tableau II récapitule les principales bactéries impliquées dans ce phénomène.

Tableau II. Principales bactéries impliquées dans l'antibiorésistance (Ho et al., 2025 ; Karnwal et al., 2025).

| Bactérie | Type | Infections associées |
|--------------------------------------|--------------|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Gram positif | Infections cutanées, pneumonies, septicémies |
| <i>Enterococcus faecalis/faecium</i> | | Infections urinaires, endocardites, infections hospitalières |
| <i>Escherichia coli</i> | Gram négatif | Infections urinaires, digestives, septicémies |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | | Pneumonies, infections urinaires, infections nosocomiales |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | Infections respiratoires, brûlures, infections hospitalières |
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | | Pneumonies, septicémies, infections en réanimation |

Parmi ces microorganismes, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* occupent une place particulièrement importante. Ces deux espèces représentent des modèles bactériens majeurs dans l'étude des mécanismes de résistance et des stratégies thérapeutiques alternatives. (Ho et al., 2025)

➤ *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un pathogène gram positif, opportuniste responsable d'infections cutanées, pulmonaires et systémiques. Certaines souches, notamment les SARM, présentent une résistance associée à la production de la protéine PBP2a, qui réduit l'affinité des β -lactamines pour leur cible bactérienne (Ho et al., 2025). En outre, cette espèce possède une forte capacité de formation de biofilm. Ces structures multicellulaires organisées protègent les bactéries contre les antibiotiques ainsi que contre les défenses immunitaires de l'hôte, favorisant ainsi la persistance et la chronicité des infections. (Ho et al., 2025).

➤ *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie gram négatif, commensale du tractus intestinal pouvant devenir pathogène et être impliquée dans des infections urinaires, digestives et systémiques. La résistance aux antibiotiques repose principalement sur la production de β -lactamases à spectre étendu (BLSE), capables d'inactiver un large éventail de β -lactamines (Abia et Essack, 2023). Cette résistance est souvent associée à d'autres mécanismes, tels que les pompes d'efflux et la diminution de la perméabilité membranaire, renforçant ainsi son potentiel de multirésistance. De plus, *Escherichia coli* joue un rôle clé dans la dissémination des gènes de résistance grâce au transfert horizontal, facilitant leur propagation entre différentes espèces bactériennes (Ahmed et al., 2024).

1.5 Mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques repose sur différents mécanismes moléculaires permettant aux bactéries de survivre en présence d'agents antimicrobiens. Elle peut être intrinsèque ou acquise, résultant de mutations génétiques ou de l'acquisition de gènes via le transfert horizontal. Ces mécanismes jouent un rôle majeur dans l'échec thérapeutique et la diffusion des souches multirésistantes. (Abia et Essack, 2023).

- **Inactivation enzymatique**

Certaines bactéries produisent des enzymes capables d'inactiver directement les antibiotiques, notamment les β -lactamases qui hydrolysent l'anneau β -lactame des pénicillines et céphalosporines. Ce mécanisme est fréquemment observé chez *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ou encore *Staphylococcus aureus*, avec la production de

pénicillinases, BLSE ou carbapénèmases, réduisant fortement les options thérapeutiques (Ahmed et al., 2024).

- **Modification de la cible bactérienne**

Les antibiotiques agissent en se fixant sur des cibles spécifiques telles que les protéines de liaison à la pénicilline (PBP), les ribosomes ou les enzymes de réplication de l'ADN. Des altérations de ces structures diminuent l'affinité de liaison. Ce mécanisme est impliqué dans la résistance à la méthicilline, mais aussi dans certaines résistances aux fluoroquinolones observées chez différentes entérobactéries et cocci Gram positifs (Ho et al., 2025).

- **Efflux actif des antibiotiques**

Des systèmes de pompes membranaires permettent l'expulsion active des antibiotiques hors de la cellule bactérienne, réduisant leur concentration intracellulaire. Ce mécanisme est particulièrement répandu chez les bactéries Gram négatif comme les entérobactéries, mais également présent chez des bactéries Gram positif, contribuant à une résistance multi-classe aux antibiotiques (Karnwal et al., 2025).

- **Diminution de la perméabilité membranaire**

La membrane externe des bactéries Gram négatif constitue une barrière naturelle contrôlant l'entrée des molécules via les porines. La réduction de leur expression ou leur modification structurale limite la pénétration des antibiotiques, notamment les β -lactamines et les fluoroquinolones, et renforce la résistance observée chez plusieurs pathogènes cliniques (Gaubet Rahman, 2023).

1.6 Alternatives aux antibiotiques conventionnels

Face à l'augmentation de l'antibiorésistance, plusieurs alternatives aux antibiotiques conventionnels ont été explorées. Celles-ci présentent des activités antimicrobiennes variables, pouvant inhiber la croissance bactérienne ou réduire la virulence, mais leur efficacité reste souvent différente ou limitée par rapport aux antibiotiques classiques. Parmi ces approches figurent les peptides antimicrobiens, la phagothérapie ainsi que les composés naturels. (Ahmed et al., 2024).

Les composés phénoliques, tels que l'acide gallique et l'acide tannique, ont montré une activité antibactérienne intéressante, bien que leur efficacité soit parfois réduite en raison de leur faible stabilité (Ahmed et al., 2024).

Dans ce contexte, les nanoparticules métalliques émergent comme une stratégie innovante, combinant des effets antimicrobiens puissants avec une meilleure stabilité et une action efficace même sur des bactéries multirésistantes (Ho et al., 2025). Leur utilisation constitue ainsi la base de la présente étude.

2. Nanoparticules métalliques

Au cours des dernières décennies, les nanotechnologies ont suscité un intérêt considérable dans les domaines biomédical, pharmaceutique et biotechnologique. Parmi les différents nanomatériaux développés, les nanoparticules métalliques occupent une place particulièrement importante en raison de leurs propriétés physicochimiques originales et de leur large potentiel d'applications. Leur intérêt est renforcé dans le contexte actuel de l'antibiorésistance, où la recherche de nouvelles stratégies antimicrobiennes constitue une priorité majeure de santé publique (Pelgrift et Friedman, 2019 ; WHO, 2024).

Les nanoparticules métalliques sont définies comme des structures de taille nanométrique généralement comprise entre 1 et 100 nm, constituées de métaux ou d'oxydes métalliques (Wahabet al., 2023). À cette échelle, les matériaux présentent des propriétés différentes de celles observées à l'état macroscopique, notamment en raison de l'augmentation du rapport surface/volume et des effets quantiques associés.

Ces caractéristiques leur confèrent une forte réactivité de surface ainsi que des propriétés optiques, catalytiques et biologiques particulières, expliquant leur intérêt croissant dans les applications biomédicales et antimicrobiennes (Aminzaiet al., 2024 ; Shahalaeiet al., 2024). Contrairement aux antibiotiques conventionnels, qui agissent généralement sur une cible moléculaire spécifique, les nanoparticules métalliques exercent leur activité par des interactions simultanées avec plusieurs structures bactériennes, notamment la membrane cellulaire, les protéines enzymatiques et le matériel génétique. Cette action multi-cible limite potentiellement le développement rapide de mécanismes de résistance bactérienne.

Dans ce contexte, les nanoparticules métalliques apparaissent aujourd'hui comme des alternatives prometteuses aux antibiotiques conventionnels et représentent une voie innovante dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. (Aminzaiet al., 2024)

2.1. Paramètres influençant les propriétés des nanoparticules métalliques

Les propriétés physicochimiques et biologiques des nanoparticules métalliques sont étroitement liées aux conditions de synthèse ainsi qu'à leurs caractéristiques structurales. Ces paramètres déterminent non seulement leur stabilité colloïdale, mais aussi leur réactivité de surface, leur interaction avec les systèmes biologiques et, par conséquent, leur efficacité antimicrobienne. **(Iravani, 2011)**

- **Taille des nanoparticules**

La taille constitue l'un des paramètres les plus déterminants dans le comportement biologique des nanoparticules. La diminution de la taille entraîne une augmentation du rapport surface/volume, favorisant ainsi la disponibilité des sites réactifs et l'interaction avec les structures cellulaires bactériennes. Les nanoparticules de petite taille présentent généralement une meilleure capacité de pénétration cellulaire ainsi qu'une interaction plus importante avec les membranes bactériennes, induisant des altérations structurales et fonctionnelles plus marquées. À l'inverse, des particules de plus grande taille possèdent une surface réactive réduite et présentent souvent une activité biologique moins importante **(MourdikoudisetThanh, 2018)**.

- **Forme et morphologie**

La morphologie des nanoparticules (sphérique, cubique, triangulaire, hexagonale, etc.) influence fortement leur comportement biologique. Les différentes facettes cristallines exposent des densités atomiques et des énergies de surface variables, ce qui modifie leur réactivité. Certaines formes, notamment celles présentant des arêtes ou des sommets, offrent une interaction plus intense avec les membranes bactériennes, augmentant ainsi l'effet antimicrobien **(Iravani, 2011)**.

- **Charge de surface (potentiel zêta)**

Le potentiel zêta joue un rôle essentiel dans la stabilité des suspensions colloïdales et dans les interactions électrostatiques avec les cellules bactériennes. Une charge fortement positive favorise l'attraction avec les surfaces bactériennes généralement négatives, facilitant l'adhésion et la perturbation de la membrane. À l'inverse, une faible charge peut entraîner une agrégation des nanoparticules et une diminution de leur efficacité biologique **(Joudehet Linke, 2022)**.

- **Nature du métal**

Le type de métal utilisé conditionne directement le mécanisme d'action antimicrobien. Le cuivre, par exemple, exerce son activité principalement par la libération d'ions Cu^{2+} , responsables de stress oxydatif et de dommages membranaires. L'argent, quant à lui, interagit avec les protéines, les enzymes et l'ADN bactérien, perturbant ainsi plusieurs fonctions cellulaires. D'autres métaux ou oxydes métalliques présentent également des mécanismes spécifiques, élargissant le spectre d'activité antimicrobienne (**Wahab et al., 2023**).

- **Conditions de synthèse**

Les paramètres expérimentaux tels que le pH, la température, le temps de réaction et la concentration des précurseurs jouent un rôle déterminant dans la formation des nanoparticules. Le pH influence notamment l'état d'ionisation des agents réducteurs, la température contrôle la cinétique de nucléation et de croissance, tandis que la concentration des réactifs détermine la taille finale et la distribution des particules. Ces paramètres sont particulièrement critiques dans les méthodes de synthèse verte, où les conditions douces influencent directement la qualité des nanoparticules obtenues (**Iravani, 2011**).

- **Agents réducteurs et stabilisants**

Dans la synthèse verte, les biomolécules naturelles telles que les polyphénols, l'acide gallique, l'acide tannique ou certaines protéines jouent un double rôle de réduction et de stabilisation. Elles permettent la réduction des ions métalliques en nanoparticules tout en limitant leur agrégation grâce à un effet de capping. Ces molécules influencent également la taille, la dispersion et la stabilité colloïdale, ce qui a un impact direct sur l'activité biologique finale des nanoparticules (**Khan et al., 2019**).

2.2. Synthèse des nanoparticules métalliques

La synthèse des nanoparticules métalliques représente une étape déterminante dans le contrôle de leurs propriétés physicochimiques et biologiques. Elle repose sur deux approches principales : les méthodes descendantes (top-down), basées sur la fragmentation d'un matériau massif, et les méthodes ascendantes (bottom-up), fondées sur l'assemblage d'atomes

ou de molécules (Jamkhande et al., 2019 ; Dikshit et al., 2023). Le tableau III représente les différentes méthodes de synthèses des nanoparticules.

Tableau III. Méthodes de synthèse des nanoparticules métalliques et leurs caractéristiques

| Approche | Principe | Avantages | Limites | Références |
|---|--|---|---|--|
| Méthodes physiques (Top-down) | Fragmentation d'un matériau massif en nanoparticules par des procédés mécaniques ou énergétiques (broyage, ablation laser, évaporation–condensation, dépôt en phase vapeur). | Haute pureté des nanoparticules obtenues, absence relative de réactifs chimiques. | Contrôle limité de la taille et de la morphologie, distribution souvent hétérogène. | Jamkhande et al., 2019 |
| Méthodes chimiques (Bottom-up) | Formation des nanoparticules par nucléation et croissance à partir d'ions métalliques en solution (réduction chimique, co-précipitation, sol-gel, microémulsions). | Bon contrôle de la taille, de la forme et de la structure cristalline. | Utilisation de réactifs chimiques potentiellement toxiques, risque de résidus environnementaux. | Jamkhande et al., 2019 |
| Méthodes biologiques green synthesis / biosynthèse | Réduction des ions métalliques par des systèmes biologiques tels que les extraits végétaux, micro-organismes ou biomolécules (polyphénols, protéines). | Méthode écologique, conditions de synthèse douces, meilleure biocompatibilité des nanoparticules. | Contrôle parfois moins précis des propriétés finales, variabilité biologique selon les extraits utilisés. | Jamkhande et al., 2019 ; Dikshit et al., 2021 |

Parmi ces différentes approches, les méthodes biologiques, et en particulier la synthèse verte, suscitent un intérêt croissant en raison de leur compatibilité avec les applications biomédicales.

2.3 Synthèse verte des nanoparticules de cuivre

La biosynthèse des nanoparticules de cuivre (Cu) et d'oxyde de cuivre (CuO) par voie verte repose sur l'utilisation de sels de cuivre, tels que le sulfate, le nitrate ou le chlorure de cuivre, en présence d'extraits végétaux riches en composés bioactifs. Ces extraits contiennent principalement des polyphénols, des flavonoïdes et d'autres métabolites secondaires capables d'assurer la réduction des ions Cu^{2+} en nanoparticules dans des conditions de synthèse relativement douces. **(Lungu et al., 2026)**

Au-delà de leur rôle réducteur, ces biomolécules interviennent également dans la stabilisation des nanoparticules formées en limitant leur agrégation et en contrôlant leur taille, leur dispersion et leur stabilité colloïdale. Cette approche présente plusieurs avantages, notamment sa simplicité, son faible coût, sa faible toxicité et son caractère respectueux de l'environnement **(Ahmed et al., 2022 ; Iravani et al., 2023)**.

2.4 Le cuivre comme modèle métallique

Le cuivre a été largement étudié dans le domaine des nanomatériaux en raison de ses propriétés antimicrobiennes intrinsèques et de son efficacité contre un large spectre de microorganismes. Son activité biologique repose principalement sur la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables d'un stress oxydatif important induisant des dommages membranaires, protéiques et génétiques chez les bactéries **(Wang et al., 2022)**.

La libération d'ions Cu^{2+} contribue également à perturber les fonctions enzymatiques essentielles et à altérer l'intégrité cellulaire. Cette action multi-cible confère aux nanoparticules de cuivre une efficacité notable contre les bactéries Gram positives et Gram négatives **(Habibah et al., 2024)**

Comparativement à d'autres métaux tels que l'argent ou le zinc, le cuivre présente un compromis particulièrement intéressant entre efficacité antimicrobienne, disponibilité et coût de production. Bien que l'argent possède une activité antibactérienne élevée, son coût reste relativement important, tandis que le zinc présente généralement une activité plus modérée.

Le cuivre constitue ainsi une alternative prometteuse pour le développement d'applications biomédicales et antimicrobiennes. (Wang *et al.*, 2022).

Par ailleurs, le cuivre est particulièrement compatible avec les approches de synthèse verte en raison de son affinité avec les biomolécules végétales, notamment les polyphénols, facilitant ainsi sa réduction et sa stabilisation.

2.5 Polyphénols

Les polyphénols sont des composés naturels d'origine végétale caractérisés par la présence d'un ou plusieurs noyaux aromatiques portant des groupements hydroxyles. Ils sont issus du métabolisme secondaire des plantes et interviennent dans leurs mécanismes de défense contre divers stress biologiques et environnementaux (Shahidiet Yeo, 2018).

Dans le domaine antimicrobien, ces composés suscitent un intérêt particulier en raison de leur capacité à interagir avec différentes structures bactériennes. Ils peuvent perturber l'intégrité des membranes cellulaires, inhiber certaines enzymes essentielles et interférer avec les facteurs de virulence, limitant ainsi la croissance bactérienne et la capacité d'infection. De plus, plusieurs études ont montré leur implication dans la réduction de la formation du biofilm et dans l'inhibition de son développement, ce qui renforce leur intérêt dans le contrôle des infections bactériennes (Scalbert et Williamson, 2000).

2.5.1 Acide gallique (AG)

L'acide gallique ($C_7H_6O_5$) est un polyphénol naturel de la famille des acides hydroxybenzoïques, caractérisé par un noyau benzénique portant trois groupements hydroxyles en positions 3, 4 et 5 ainsi qu'une fonction acide carboxylique. Cette structure lui confère une forte polarité et une réactivité élevée. (Hadidi *et al.*, 2024).

Les groupements hydroxyles sont responsables de ses propriétés antioxydantes, car ils permettent le transfert d'électrons et la stabilisation des radicaux libres par résonance sur le noyau aromatique (Hadidi *et al.*, 2024). Par ailleurs, la présence simultanée des fonctions hydroxyles et carboxyliques favorise la formation de liaisons hydrogène et de complexes avec les ions métalliques, expliquant sa capacité de chélation et sa réactivité chimique (Wang *et al.*, 2024).

La structure de l'acide gallique est directement liée à ses propriétés physico-chimiques et biologiques, ce qui justifie son intérêt dans les applications biomédicales et biotechnologiques (Wianowska et Olszowy-Tomczyk, 2023).

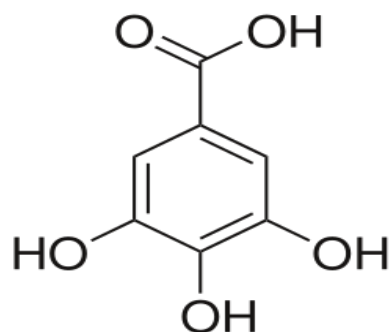


Figure 2. Structure de l'acide gallique (Wianowska, D., et Olszowy-Tomczyk, M. 2023).

2.5.2 Acide tannique (AT)

L'acide tannique est un polyphénol appartenant à la famille des tanins hydrolysables, constitué d'un noyau glucosique estérifié par plusieurs unités d'acide gallique, ce qui lui confère une forte densité en groupements hydroxyles phénoliques.

Selon (Cometta et al., 2024), cette richesse fonctionnelle permet à l'acide tannique d'interagir avec diverses biomolécules via des liaisons hydrogène, des interactions hydrophobes et électrostatiques, expliquant son affinité élevée pour les protéines et les membranes biologiques.

Par ailleurs, l'acide tannique présente une forte capacité de chélation des ions métalliques grâce à ses groupements phénoliques, ce qui contribue à ses propriétés biologiques, notamment son activité antimicrobienne (Khosravi et al., 2024).

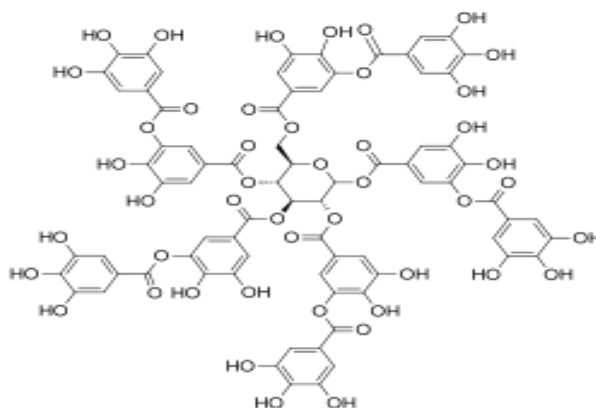


Figure 3. Structure de l'acide tannique (Bei et al., 2026)

2.6 Rôle des polyphénols dans la synthèse verte

Les polyphénols jouent un rôle essentiel dans la synthèse verte des nanoparticules métalliques grâce à leur double fonction d'agents réducteurs et stabilisants (**Ahmad et al., 2019**).

L'interaction entre le cuivre, l'acide gallique et l'acide tannique lors de la formation de nanoparticules repose sur leur rôle dual d'agents réducteurs et stabilisants dans des synthèses vertes. Ces polyphénols réduisent les ions Cu^{2+} (provenant de sels comme CuSO_4 ou $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) en nanoparticules métalliques Cu^0 , Cu_2O ou CuO via l'oxydation de leurs groupes hydroxyle phénoliques en quinones, tout en formant des complexes métal-ligand qui contrôlent la nucléation et préviennent l'agrégation. (**Che Lah et al., 2022**)

2.6.1. Interaction cuivre – acide gallique

L'acide gallique intervient de manière essentielle dans la synthèse des nanoparticules de cuivre en agissant directement sur les ions Cu^{2+} en milieu aqueux. Grâce à ses groupements hydroxyles, il joue un rôle de donneur d'électrons, favorisant la réduction progressive des ions Cu^{2+} en Cu^+ puis en cuivre métallique Cu^0 (**Shehabeldine et al., 2023**).

Au-delà de cette fonction réductrice, il contribue également à la stabilisation des nanoparticules formées. En effet, ses groupements hydroxyles permettent une interaction forte avec la surface des particules par chélation des ions cuivre, formant ainsi une couche organique protectrice qui limite l'agrégation et améliore la stabilité colloïdale des nanoparticules. (**Huoet Liu, 2022**)

Cette double action, à la fois réductrice et stabilisante, fait de l'interaction Cu-acide gallique un élément clé des procédés de synthèse verte des nanoparticules de cuivre, où la formation et la stabilisation sont assurées simultanément par une même molécule (**Huoet Liu, 2022 ; Somtürk Yılmaz et al., 2024**).

2.6.2 Interaction cuivre – acide tannique

L'acide tannique possède une forte capacité de complexation des ions cuivre grâce à sa richesse en groupements phénoliques. Il favorise la nucléation et la formation rapide des nanoparticules tout en assurant leur stabilisation colloïdale.

Au cours de ce processus, les multiples sites phénoliques participent à des réactions redox successives, assurant une réduction efficace des ions métalliques. En parallèle, l'acide tannique contribue à la stabilisation des nanoparticules en formant une couche organique protectrice autour de leur surface, ce qui limite leur croissance et leur agrégation (**Liu et al., 2021**).

Par ailleurs, sa structure peut subir une hydrolyse partielle, libérant de l'acide gallique, ce qui renforce les processus de réduction et de stabilisation. Cette synergie favorise ainsi l'obtention de nanoparticules de petite taille, stables, et présentant une activité antimicrobienne accrue, notamment en raison de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la libération d'ions cuivre (**Zhao et al., 2017 ; Che Lah et al., 2022**).

2.7. Activité antibactérienne des nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques constituent une alternative prometteuse aux antibiotiques conventionnels grâce à leur large spectre d'action et à leurs mécanismes antibactériens multiples. Contrairement aux antibiotiques classiques, leur activité repose sur des interactions physicochimiques non spécifiques, ce qui limite fortement l'apparition de mécanismes de résistance bactérienne (**Jiang et al., 2024**).

Leur effet antibactérien s'exprime principalement par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), responsables d'un stress oxydatif entraînant des dommages aux lipides membranaires, aux protéines et au matériel génétique. À cela s'ajoute une interaction directe avec la paroi et la membrane bactérienne, provoquant une augmentation de la perméabilité et une fuite du contenu cellulaire. Enfin, la libération d'ions métalliques tels que Cu^{2+} , Ag^+ ou Zn^{2+} contribue à perturber les activités enzymatiques et les processus métaboliques essentiels, renforçant ainsi la toxicité cellulaire (**Ramos-Zúñiga et al., 2023**).

Ces mécanismes combinés permettent une activité efficace contre des bactéries Gram positives comme *Staphylococcus aureus* et Gram négatives telles que *Escherichia coli*, malgré leurs différences structurales. Chez ces deux modèles bactériens, les nanoparticules induisent un stress oxydatif important, des altérations membranaires et une inhibition des systèmes enzymatiques, conduisant progressivement à la mort cellulaire. Dans certains cas, elles interfèrent également avec les mécanismes de résistance, notamment les pompes d'efflux et les facteurs de virulence (**Ramos-Zúñiga et al., 2023**).

De plus, les nanoparticules d'oxydes métalliques comme celles du cuivre et du zinc ainsi que les systèmes bimétalliques présentent une efficacité renforcée, due à la synergie entre plusieurs mécanismes d'action, incluant la production accrue de ROS et la perturbation simultanée de plusieurs cibles cellulaires (**Joshi et Patil, 2023 ; Castro-Valenzuela et al., 2024 ; Hao et al., 2024 ; Zhang et al., 2024**).

2.8. Activité antibiofilm des nanoparticules métalliques

Les biofilms bactériens sont des structures microbiennes protégées par une matrice extracellulaire, ce qui les rend très résistants aux antibiotiques et aux défenses immunitaires. (**Costerton et al., 1999**)

Selon (**Tanwar et al., 2024**), les nanoparticules inorganiques constituent une stratégie efficace contre ces biofilms grâce à leurs actions multiples. Elles empêchent d'abord l'adhésion des bactéries aux surfaces, puis perturbent les biofilms déjà formés en endommageant leur matrice via le stress oxydatif (ROS). Elles interfèrent également avec la communication bactérienne (quorum sensing), ce qui bloque la formation et la maturation du biofilm. Enfin, la libération d'ions métalliques renforce l'effet antibactérien (**Algadi et al., 2024**).

2.9. Toxicité des nanoparticules métalliques

Malgré leurs nombreuses applications, les nanoparticules métalliques présentent des risques pour la santé humaine et l'environnement. Leur petite taille leur permet de traverser les barrières biologiques, entraînant une accumulation dans les tissus et une interaction directe avec les cellules.

La toxicité est principalement liée à la production excessive d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui provoquent un stress oxydatif responsable de dommages cellulaires, notamment au niveau des membranes, des protéines et de l'ADN. De plus, la libération d'ions métalliques peut amplifier ces effets cytotoxiques (**Kumar et al., 2019 ; Abbasi et al., 2023**).

Sur le plan environnemental, les nanoparticules peuvent s'accumuler dans les eaux usées et affecter les microorganismes aquatiques, perturbant ainsi les écosystèmes. Leur utilisation nécessite donc une évaluation rigoureuse de la dose, de la biodisponibilité et des conditions d'exposition afin de limiter les effets secondaires (**Kumar et al., 2019 ; Rezić et Meštrović, 2023**).

3. Applications des nanoparticules métalliques

Les nanoparticules métalliques présentent un intérêt considérable dans de nombreux domaines en raison de leurs propriétés physicochimiques particulières, notamment leur grande surface spécifique, leur réactivité élevée et leur activité antimicrobienne. Au-delà des applications biomédicales, leur utilisation s'étend à plusieurs secteurs industriels, environnementaux et technologiques (**Karypidis et al., 2023**).

3.1 Applications dans les textiles et dispositifs médicaux

Les nanoparticules métalliques, en particulier celles à base d'argent, de zinc et de cuivre, sont largement utilisées dans le domaine textile pour conférer des propriétés antimicrobiennes durables. Elles sont intégrées dans les fibres ou déposées sous forme de revêtements sur les tissus afin de limiter la prolifération bactérienne. (**Tarannum et al., 2025**)

Ces matériaux sont utilisés dans la fabrication de vêtements médicaux tels que les blouses hospitalières, les draps, les masques et les pansements, afin de réduire le risque d'infections nosocomiales. L'incorporation de nanoparticules permet également d'améliorer la durabilité des propriétés antimicrobiennes même après plusieurs cycles de lavage, ce qui constitue un avantage majeur dans le domaine hospitalier (**Vrinceanu et al., 2022 ; Karypidis et al., 2023**).

3.2. Applications dans les revêtements et peintures antimicrobiennes

Les nanoparticules sont également utilisées dans les revêtements de surfaces et les peintures fonctionnelles. Elles permettent de développer des surfaces auto-désinfectantes, capables d'inhiber la croissance microbienne sur les murs hospitaliers, les équipements médicaux ou les surfaces fréquemment touchées (**Weber et Rutala, 2013**).

Ces revêtements à base de nanoparticules sont particulièrement intéressants dans les environnements à haut risque infectieux, car ils assurent une action antimicrobienne continue sans besoin d'application répétée de désinfectants chimiques (**Rezić et Meštrović, 2023**).

3.3. Autres applications industrielles et environnementales

En dehors du domaine médical, les nanoparticules métalliques sont utilisées dans divers secteurs industriels, notamment :

- La protection UV et les revêtements anti-corrosion
- Les textiles techniques (vêtements sportifs, textiles intelligents)
- La purification de l'eau et le traitement des polluants
- Les matériaux autonettoyants et anti-odeurs

Ces applications exploitent principalement leurs propriétés catalytiques et antimicrobiennes, liées à la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à la libération d'ions métalliques actifs (**Wang et al., 2022**).

Partie expérimentale

Matériels et méthodes

L'ensemble des travaux expérimentaux réalisés dans le cadre de cette étude a été effectué au sein du Laboratoire de Recherche en Biochimie Analytique et Biotechnologie (LABAB), Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou.

1. Matériel biologique

Deux souches bactériennes de référence ont été sélectionnées afin de d'évaluer les propriétés antibactériennes et antibiofilm des nanoparticules synthétisées :

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Ces souches ont été retenues en raison de leur importance clinique, de leur implication fréquente dans les infections humaines ainsi que de leur rôle majeur dans les phénomènes d'antibiorésistance et de formation de biofilm.

2. Synthèse des nanoparticules Cu–acide gallique (Cu–AG) et Cu–acide tannique (Cu–AT)

Les nanoparticules Cu–acide gallique et Cu–acide tannique ont été synthétisées selon une approche de complexation cuivre–polyphénol reposant sur l'autoassemblage des ions cuivre avec des composés phénoliques. **(Ejima et al. 2013)**

La synthèse des nanoparticules Cu–AG a été réalisée après optimisation expérimentale des paramètres réactionnels, notamment les proportions des réactifs, le pH et les conditions thermiques. En revanche, la synthèse des nanoparticules Cu–AT a été effectuée selon le rapport optimal rapporté par **Tao Liu et al. (2024)**, basé sur l'autoassemblage oxydatif des ions cuivre avec l'acide tannique.

Pour la synthèse des nanoparticules Cu–AG, 0,85 g de sulfate de cuivre (CuSO_4) et 1,27 g d'acide gallique ont été dissous dans 400 mL d'eau distillée, correspondant à un rapport molaire Cu:AG de 1:2. La solution de sulfate de cuivre a ensuite été ajoutée goutte à goutte à la solution d'acide gallique sous agitation magnétique continue afin d'assurer une homogénéisation progressive et contrôlée du milieu réactionnel.

Dans les mêmes conditions expérimentales, les nanoparticules Cu–AT ont été synthétisées à partir de 1,70 g de sulfate de cuivre (CuSO_4) et de 0,89 g d'acide tannique dissous dans 400 mL d'eau distillée, correspondant à un rapport molaire Cu:AT de 0,25:1 (Tao Liu et al., 2024). La solution de CuSO_4 a été ajoutée sous agitation continue. La solution de CuSO_4 a ensuite été ajoutée goutte à goutte à la solution d'acide tannique sous agitation continue afin d'assurer une homogénéisation progressive et contrôlée du milieu réactionnel.

Dans les deux systèmes, le pH réactionnel a été ajusté à 7,4 par addition de NaOH (2 M). Le mélange réactionnel a ensuite été chauffé à 70 °C pendant 1 h. Concernant les nanoparticules Cu–AG, une incubation complémentaire à 60 °C pendant 5 h a été appliquée afin de favoriser la maturation du système nanoparticulaire, tandis que les nanoparticules Cu–AT ont été maintenues à 70 °C pendant 1 h.

Les nanoparticules formées ont été récupérées par centrifugation à 14 000 tr/min pendant 10 min pour les Cu–AG et à 8 000 tr/min pendant 10 min pour les Cu–AT. Trois cycles successifs de lavage à l'eau distillée ont ensuite été réalisés afin d'éliminer les résidus non réagis. Chaque lavage a été suivi d'une centrifugation dans les mêmes conditions expérimentales. Un dernier lavage à l'éthanol à 96 % a été effectué avant séchage à 40 °C afin d'éliminer les traces résiduelles d'alcool.

Après séchage, la poudre obtenue a été récupérée par grattage à l'aide d'une spatule stérile puis transférée dans des cryotubes stériles et conservée à 4 °C jusqu'à utilisation.

Le rendement massique de synthèse a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Rendement (\%)} = \frac{\text{Masse expérimentale}}{\text{Masse théorique de CuO}} \times 100$$

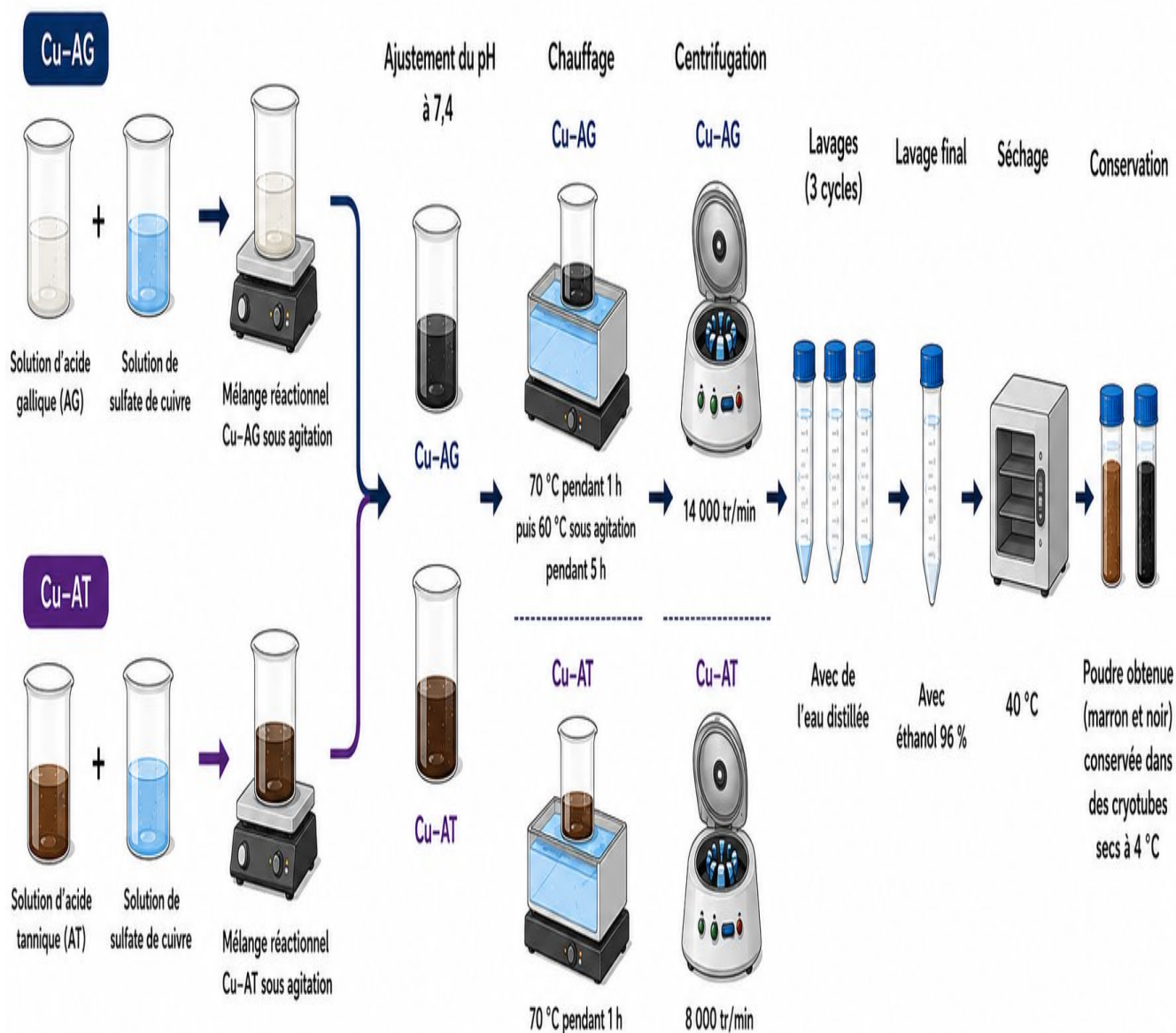


Figure 4. Schéma représentatif des différentes étapes de la synthèse des nanoparticules Cu-AG et Cu-AT

3. Activités antibactériennes

L'activité antibactérienne des composés testés a été évaluée selon des méthodes ont inclus la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI), de la concentration minimale bactéricide (CMB) ainsi que l'étude de Time-Kill.

3.1. Détermination concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice (CMI) correspond à la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'inhiber toute croissance bactérienne visible après incubation (Sabath, L. D. 1976; Kowalska-KrochmaletDudek-Wicher, 2021). Elle représente un paramètre de référence essentiel pour l'évaluation de la sensibilité bactérienne aux agents antimicrobiens et constitue le gold standard dans ce type d'étude (Patil et al., 2025).

Les concentrations des nanoparticules ainsi que celles des fractions en cuivre et en composés phénoliques ont été déterminées et présentées dans le tableau IV.

Tableau IV. Concentrations des espèces actives utilisées pour la CMI.

| Système nanoparticulaire | Nanoparticules (mg/mL) | Cu (mg/mL) | Acide (mg/mL) |
|--------------------------|------------------------|------------|---------------|
| Cu-acide gallique | 20 | 2,8 | 17,1 |
| Cu-acide tannique | 20 | 2,6 | 17,4 |

La concentration des différents composés a été préparée dans 1 mL d'eau distillée stérile. Les solutions de nanoparticules ont été soumises à une sonication pendant 30 minutes afin d'assurer une dispersion homogène, tandis que les autres composés ont été homogénéisés par agitation au vortex.

La concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée par la méthode de microdilution en bouillon sur microplaque à 96 puits, selon les recommandations du *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2025)*. Dans chaque puits, 100 μ L de bouillon Mueller-Hinton stérile ont été distribués, suivis de 100 μ L de solution mère du composé testé dans le premier puits de chaque ligne. Une série de dilutions géométriques au demi a ensuite

été réalisée par transferts successifs de 100 μL jusqu'au dixième puits, avec homogénéisation à chaque étape, tout en maintenant un volume final constant dans tous les puits.

L'inoculum bactérien d'*Escherichia coli* et de *Staphylococcus aureus* a été préparé à partir de cultures jeunes de 18 heures. Quelques colonies isolées prélevées puis mise en suspension dans de l'eau physiologique stérile, avant ajustement à 0,5 McFarland ($\approx 10^8$ UFC/mL). Cette suspension a ensuite été diluée dans le bouillon Mueller-Hinton afin d'obtenir une concentration finale d'environ 10^6 UFC/mL. Par la suite, 100 μL de suspension bactérienne ont été ajoutés dans chaque puits contenant les dilutions des composés, conduisant à une charge finale d'environ 5×10^5 UFC/mL par puits.

Afin d'assurer la validité expérimentale des essais, plusieurs témoins ont été réalisés. Un témoin de croissance (T+) contenant le bouillon Mueller-Hinton et l'inoculum bactérien sans composé testé, un témoin de stérilité (T-) contenant uniquement le bouillon Mueller-Hinton, ainsi qu'un témoin du composé contenant le bouillon Mueller-Hinton et le composé testé sans inoculum bactérien ont été réalisés afin de vérifier respectivement la viabilité bactérienne, la stérilité du milieu et l'absence d'interférence du composé sur le système de lecture. Les microplaques ont ensuite été incubées à 37 °C pendant 18 heures sous agitation douce. Tous les essais ont été réalisés en triplicata afin d'assurer la reproductibilité, la fiabilité et la validation des résultats expérimentaux.

Après incubation, 30 μL de résazurine à 0,015 % ont été ajoutés dans chaque puits, suivis d'une nouvelle incubation de 3 h à 37 °C sous agitation douce.

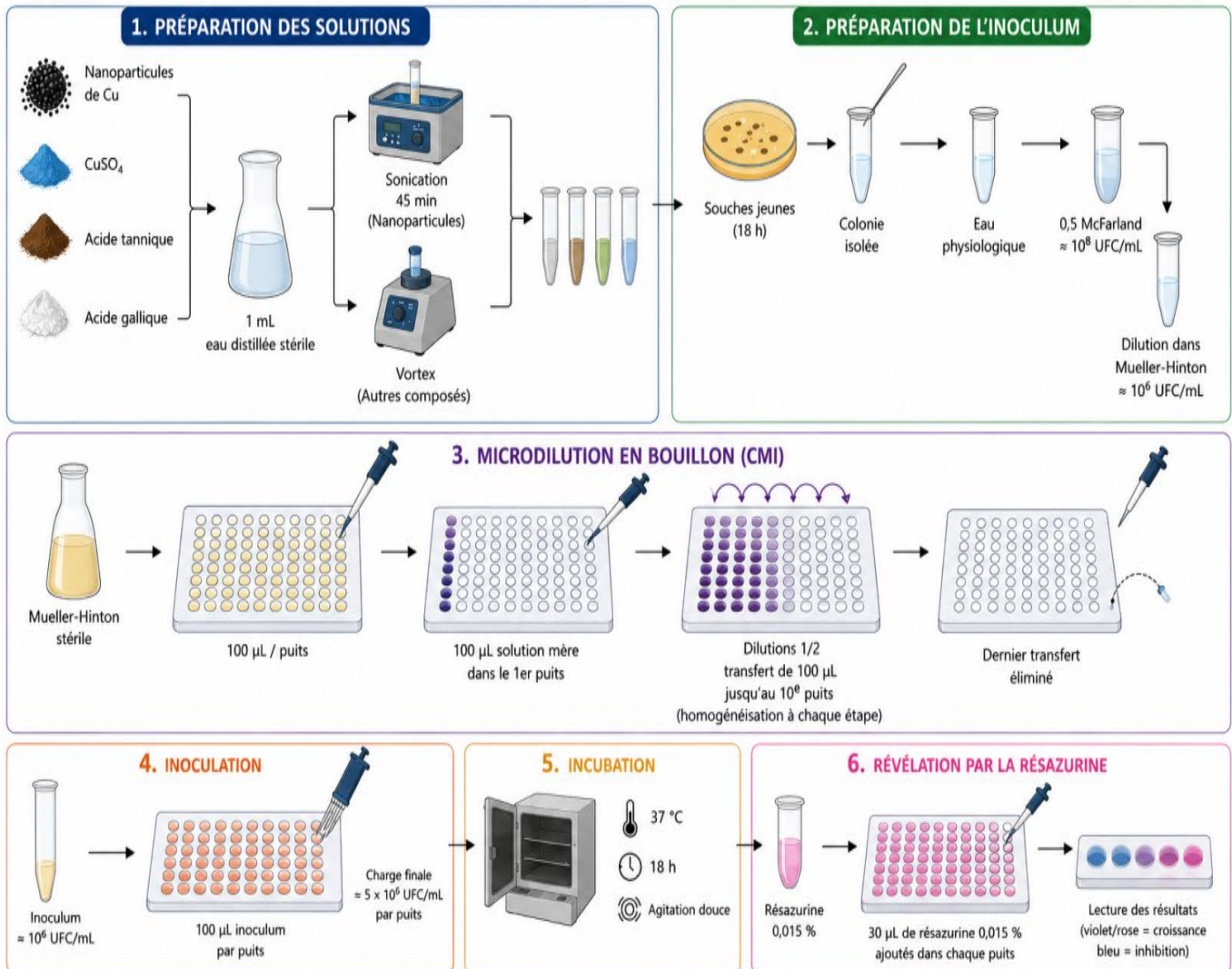


Figure 5. Détermination de la CMI par microdilution en microplaque 96 puits.

3.2. Concentration Minimale Bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide (CMB) correspond à la plus faible concentration d'un agent antimicrobien capable d'entraîner la destruction complète des bactéries viables, mise en évidence par l'absence de croissance après repiquage sur un milieu de culture sans agent antimicrobien. Elle permet de différencier une activité bactériostatique (inhibition de la croissance) d'une activité bactéricide (élimination bactérienne) (Rodríguez-Melcón et al., 2022).

La CMB a été déterminée selon la méthode de repiquage à partir des puits du test de concentration minimale inhibitrice (CMI) ne présentant aucune croissance visible. Un volume de 10 μL a été prélevé des puits correspondant à la CMI ainsi qu'aux concentrations supérieures, puis ensemencé sur gélose Mueller-Hinton ; et incubé à 37 °C pendant 24 h.

Après incubation, l'absence de croissance bactérienne indique un effet bactéricide, tandis que la présence de colonies traduit un effet bactériostatique (CLSI, 2025).

Le rapport CMB/CMI a été calculé pour déterminer la nature de l'activité antimicrobienne (bactéricide si ≤ 4 , bactériostatique si > 4 (CLSI, 2025).

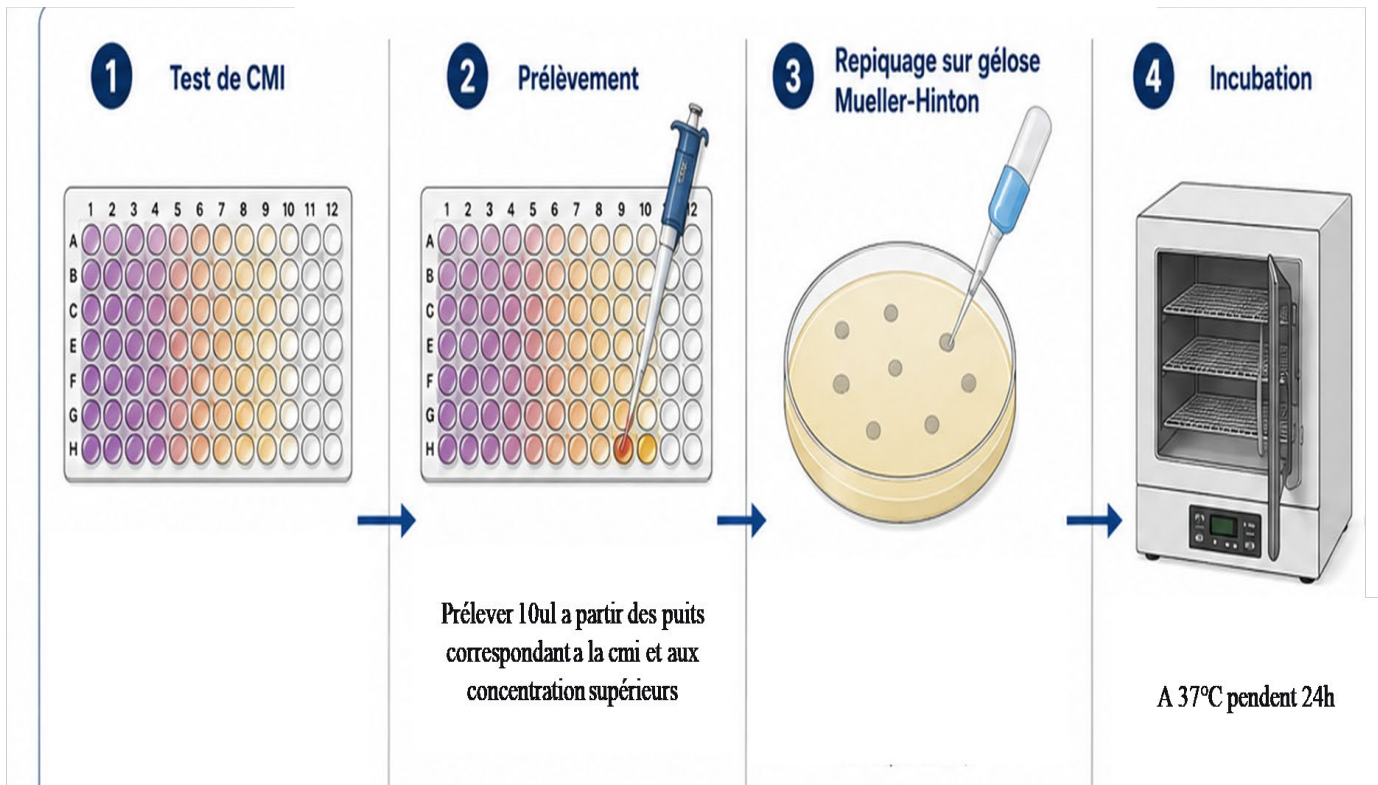


Figure 6. Détermination de la concentration minimale bactéricide.

3.3. Test de Time-Kill assay

Le Time-Kill assay est une méthode dynamique permettant d'évaluer l'évolution de la viabilité bactérienne en fonction du temps d'exposition à un agent antimicrobien. Elle repose sur le dénombrement des bactéries viables à différents intervalles de temps (Mueller et al.,

2004). Une diminution $\geq 3 \log_{10}$ UFC/mL par rapport à l'inoculum initial est généralement considérée comme un effet bactéricide significatif (Koščak et al., 2023).

Dans cette étude, le test de timekill des nanoparticules Cu-AT et Cu-AG a été évaluée selon une méthode adaptée du protocole décrit par (Appiah et al. 2017), avec quelques modifications.

Les nanoparticules ont été préparées à une concentration correspondant à leur CMI respective, puis suspendues dans de l'eau distillée stérile après sonication pendant 30 min afin d'assurer une dispersion homogène. Le système réactionnel a été constitué par le mélange de 1 mL de suspension de nanoparticules avec 1 mL d'une suspension bactérienne standardisée d'*Escherichia coli* ou de *Staphylococcus aureus*, afin d'obtenir une concentration finale de 5×10^5 UFC/mL.

Pour les nanoparticules Cu-acide gallique (Cu-AG), des prélèvements de 100 μ L ont été réalisés aux temps 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 h. Chaque prélèvement a fait l'objet d'une série de dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-9} , en transférant 100 μ L de la suspension réactionnelle dans 9,9 mL d'eau physiologique stérile à chaque étape de dilution. Les dilutions appropriées ont ensuite étéensemencées sur gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un râteau stérile afin de permettre le dénombrement des bactéries viables après incubation à 37 °C pendant 24 h.

En revanche, pour les nanoparticules Cu-acide tannique (Cu-AT), en raison de leur forte activité antibactérienne, aucune dilution n'a été réalisée. Aux différents temps d'incubation (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 24 h), 100 μ L de la suspension réactionnelle (nanoparticules + bactéries) ont été directementensemencés sur gélose Mueller-Hinton, puis incubés à 37 °C pendant 24 h.

Pour les essais réalisés avec les nanoparticules Cu-AG, un témoin de croissance a été soumis au même protocole et aux mêmes séries de dilutions à chaque intervalle de temps. En revanche, pour les essais avec les nanoparticules Cu-AT, le témoin de croissance a été réalisé uniquement au temps initial (T0) etensemencé directement, sans dilution.

Un témoin négatif contenant uniquement du bouillon Mueller-Hinton stérile a également été inclus afin de vérifier l'absence de contamination. Tous les essais ont été réalisés en triplicata (Koščak et al., 2023). L'évolution de la viabilité bactérienne a été exprimée en UFC/mL afin d'évaluer l'activité bactéricide des nanoparticules.

4. Activité antibiofilm

4.1. Mise en évidence qualitative du biofilm (Rouge Congo Agar)

La capacité de production de biofilm a été évaluée par la méthode sur gélose Rouge Congo Agar (RCA), permettant la détection phénotypique des souches productrices d'exopolysaccharides. Cette méthode repose sur l'interaction du colorant rouge Congo avec la matrice extracellulaire du biofilm, entraînant une coloration caractéristique des colonies. (Moreno, et al. 2023).

Les colonies noires à aspect rugueux sont considérées comme biofilm-positives, tandis que les colonies rouges ou roses à aspect lisse correspondent à des souches non productrices de biofilm (Moreno, et al. 2023).

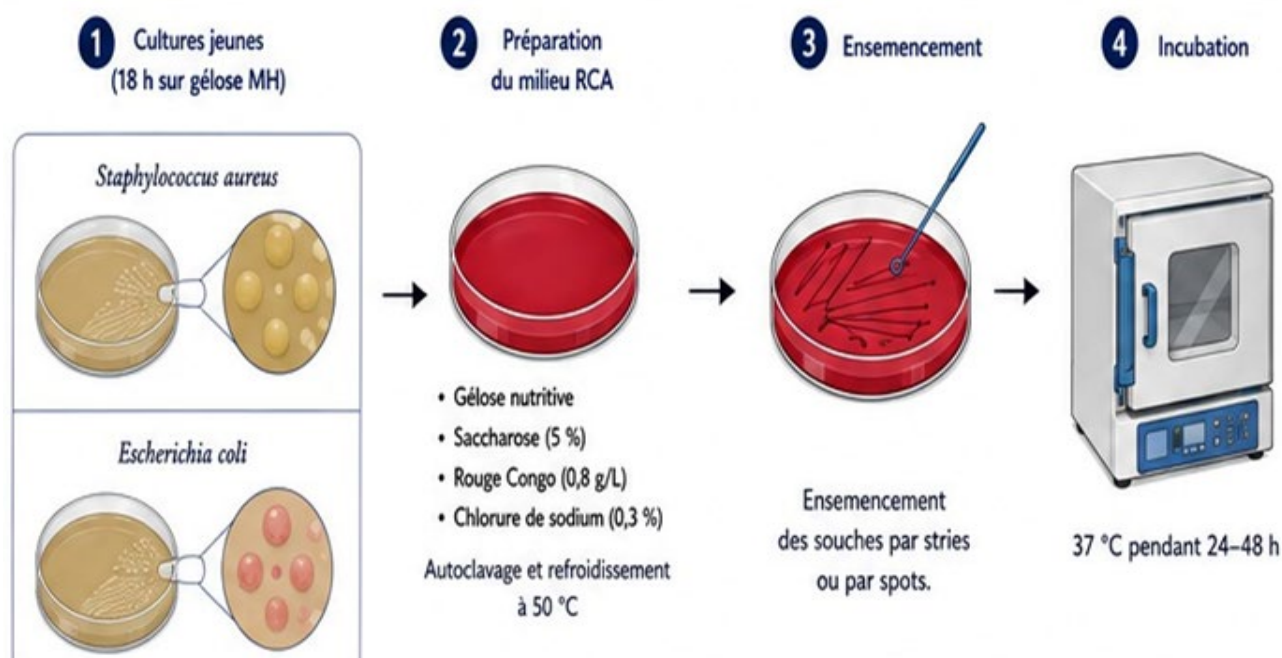


Figure 7. Mise en évidence qualitative du biofilm.

4.2. Évaluation quantitative du biofilm (méthode au cristal violet)

La capacité de formation de biofilm de souches testées a été évaluée par la méthode de microplaque à 96 puits avec coloration au cristal violet, selon le protocole décrit par (Saoudi et al., 2024).

Une suspension bactérienne ajustée à 10^6 UFC /mL a été préparée dans du bouillon TrypticSoyBroth (TSB) supplémenté en glucose. Dans chaque puits, 100 μ L de suspension bactérienne ont été mélangés avec 100 μ L de TSB-glucose. Le témoin positif contenait 100 μ L de TSB ensemencé avec 100 μ L de suspension bactérienne, tandis que le témoin négatif était constitué de 200 μ L de milieu stérile.

Les microplaques ont été incubées à 37 °C pendant 48 h en conditions statiques afin de permettre la formation du biofilm. Après incubation, les puits ont été lavés deux fois avec 250 μ L de solution saline stérile (NaCl 0,9 %), puis séchés à 50 °C pendant 1 h.

Le biofilm adhérent a ensuite été coloré avec 150 μ L de cristal violet à 1 % pendant 15 min, puis rincé à l'eau distillée stérile pour éliminer l'excès de colorant. Enfin, 150 μ L de méthanol à 99 % ont été ajoutés dans chaque puits et laissés en incubation pendant 15 min à température ambiante afin de solubiliser le cristal violet ayant pénétré et été retenu par les cellules. Tous les essais ont été réalisés en triplicat. La densité optique (DO) a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

La valeur seuil (DOc) a été calculée selon la formule :

$$\text{DOc} = \text{moyenne de la DO du témoin négatif} + 3 \times (\text{écarts-types (ET) du témoin négatif}).$$

Sur la base de cette valeur seuil, les souches ont été classées comme suit :

- ✚ **DO < DOc** : souches non productrices de biofilm
- ✚ **DOc \leq DO < 2 \times DOc** : souches faiblement formatrices de biofilm
- ✚ **2 \times DOc \leq DO < 4 \times DOc** : souches modérément formatrices de biofilm
- ✚ **DO \geq 4 \times DOc** : souches fortement formatrices de biofilm (Stepanović et al. 2000)

4.3. Test d'inhibition de la formation du biofilm

L'activité inhibitrice des nanoparticules de cuivre associées à l'acide gallique et à l'acide tannique sur la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* a été évaluée par la méthode de microplaque à 96 puits avec coloration au cristal violet (Saoudi et al., 2024).

Une suspension bactérienne standardisée à 10^6 UFC/ml a été préparée dans du bouillon TrypticSoyBroth (TSB) supplémenté en glucose. Dans les puits expérimentaux, 100 μ L de suspension bactérienne ont été mélangés avec 100 μ L de nanoparticules de cuivre aux différentes concentrations indiquées dans le tableau V.

Le témoin positif était constitué de 100 μ L de suspension bactérienne additionnée à 100 μ L de TSB-glucose stérile, tandis que le témoin négatif contenait uniquement 200 μ L de TSB-glucose stérile. Les concentrations utilisées pour ce test sont prestées dans le tableau V.

Tableau V. CMI et CMB des différents composés vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*

| Condition | Concentration Cu-AG (mg/ml) | ConcentrationCu-AT (mg/ml) |
|----------------|-----------------------------|----------------------------|
| CMI \times 2 | 10 | 20 |
| CMI | 5 | 10 |
| CMI / 2 | 2,5 | 5 |

Les microplaques ont été incubées à 37 °C pendant 24 h en conditions statiques afin de permettre la formation du biofilm. Après incubation, le contenu des puits a été éliminé, puis les puits ont été lavés avec une solution saline stérile (NaCl 0,9 %) afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Le biofilm restant a ensuite été coloré au cristal violet selon la méthode classique, puis la densité optique a été mesurée à 630 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

Résultats et discussion

1. Rendement des nanoparticules synthétisées

La synthèse des deux systèmes nanoparticulaires a conduit à des rendements élevés, attestant l'efficacité de la voie de synthèse employée. Le rendement massique obtenu pour les nanoparticules Cu-acide gallique (Cu-AG) a été de 99,68 %, tandis que celui des nanoparticules Cu-acide tannique (Cu-AT) a atteint 87,5 %. Ces résultats témoignent d'une formation efficace des complexes cuivre-polyphénol et confirment l'intérêt des polyphénols comme agents réducteurs, complexant et stabilisants dans les procédés de synthèse verte **(Iravani, 2011)**.

Sur le plan mécanistique, la formation des nanoparticules repose sur plusieurs étapes successives. Dans un premier temps, les ions Cu^{2+} interagissent avec les groupes fonctionnels des polyphénols, en particulier les fonctions hydroxyles phénoliques et carboxyliques, conduisant à la formation de complexes de coordination Cu-O. Cette complexation facilite la proximité entre le métal et le ligand organique et prépare le système à la phase de réduction **(Mittal et al., 2013)**.

Après cette étape de complexation, les polyphénols interviennent comme agents réducteurs en assurant le transfert d'électrons vers les ions Cu^{2+} . Les groupes hydroxyles sont oxydés en structures quinoniques, tandis que les ions cuivre sont réduits en cuivre métallique Cu^0 , déclenchant ainsi la nucléation des premières entités nanométriques **(Iravani, 2011)**.

Les atomes de cuivre formés s'agrègent ensuite en clusters stables constituant les noyaux de nucléation. Cette étape est fortement dépendante de la cinétique de réduction et de la disponibilité des espèces réduites dans le milieu réactionnel, paramètres eux-mêmes modulés par la nature des polyphénols présents **(Narayanan et Sakhivel, 2010)**. La croissance des nanoparticules s'effectue ensuite par addition progressive d'atomes de cuivre sur les noyaux formés. Cette phase est contrôlée par l'adsorption des molécules organiques à la surface métallique, limitant l'aggrégation et favorisant une croissance régulée grâce à un effet de barrière stérique **(Mittal et al., 2013)**.

La stabilisation finale des nanoparticules est assurée par l'adsorption des polyphénols sur leur surface via des interactions électrostatiques, des liaisons de coordination et des liaisons hydrogène. Cette couche organique agit comme un agent de capping, assurant la stabilité colloïdale et empêchant l'agglomération des particules **(Ahmed et al., 2016)**.

La différence de rendement observée entre Cu–AG et Cu–AT peut être attribuée à la nature structurale des polyphénols utilisés. L'acide gallique, de faible masse moléculaire, favorise une complexation rapide et une réduction efficace des ions cuivre, conduisant à une nucléation homogène et rapide (Kumar etYadav, 2009). À l'inverse, l'acide tannique, de structure polymérique et riche en unités phénoliques, présente une capacité de chélation multidentate plus importante, entraînant une stabilisation plus dense des nanoparticules et une limitation plus marquée de leur croissance (Narayanan et Sakthivel, 2010). Ainsi, la formation des nanoparticules de cuivre résulte d'un processus synergique combinant complexation, réduction redox, nucléation contrôlée, croissance progressive et stabilisation de surface, fortement influencé par la nature des polyphénols utilisés (Iravani, 2011 ; Mittal et al., 2013; Ahmed et al., 2016).

2. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide CMI et CMB.

Les résultats obtenus dans cette étude montrent une activité antibactérienne fortement dépendante de la nature chimique des composés testés, de leur forme (libre ou complexée) ainsi que de la structure de la paroi bactérienne des souches étudiées. L'analyse conjointe des CMI et des CMB met en évidence deux profils d'action distincts allant d'un effet bactéricide direct à une activité principalement bactériostatique selon la nature du composé et son degré de complexation. Les valeurs sont présentées dans les tableaux VI et VII et les microplaques correspondantes des tests antibactériens sont illustrées par les figures 8, 9, 10 et 11.

Tableau VI. CMI et CMB des différents composés vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (—) absence

| Composé testé | CMI (mg/mL) | CMB (mg/mL) | Interprétation | CMB/CMI |
|--|--------------------|-------------|------------------|---------|
| Acide gallique | 8,5 | 8.5 | Bactéricide | 1 |
| CuSO ₄ (cas de Cu-acide gallique) | Absence d'activité | — | — | — |
| Nanoparticules Cu-acide gallique | 5 | — | Bactériostatique | >4 |
| Acide tannique | 1 | 1 | Bactéricide | 1 |
| CuSO ₄ (cas de Cu-acide tannique) | 1,3 | 1.6 | Bactéricide | ≈1,3 |
| Nanoparticules Cu-acide tannique | 10 | 10 | Bactéricide | 1 |

Tableau VII. CMI et CMB des différents composés vis-à-vis d'*Escherichia coli*(—) absence

| Composé testé | CMI (mg/mL) | CMB (mg/mL) | Interprétation | CMB/CMI |
|--|--------------------|-------------|------------------|---------|
| Acide gallique | 8,5 | 8.5 | Bactéricide | 1 |
| CuSO ₄ (cas de Cu-acide gallique) | Absence d'activité | — | — | — |
| Nanoparticules Cu-acide gallique | 5 | — | Bactériostatique | >4 |
| Acide tannique | Absence d'activité | — | — | — |
| CuSO ₄ (cas de Cu-acide tannique) | 1,3 | 1.3 | Bactéricide | 1 |
| Nanoparticules Cu-acide tannique | 10 | 10 | Bactéricide | 1 |

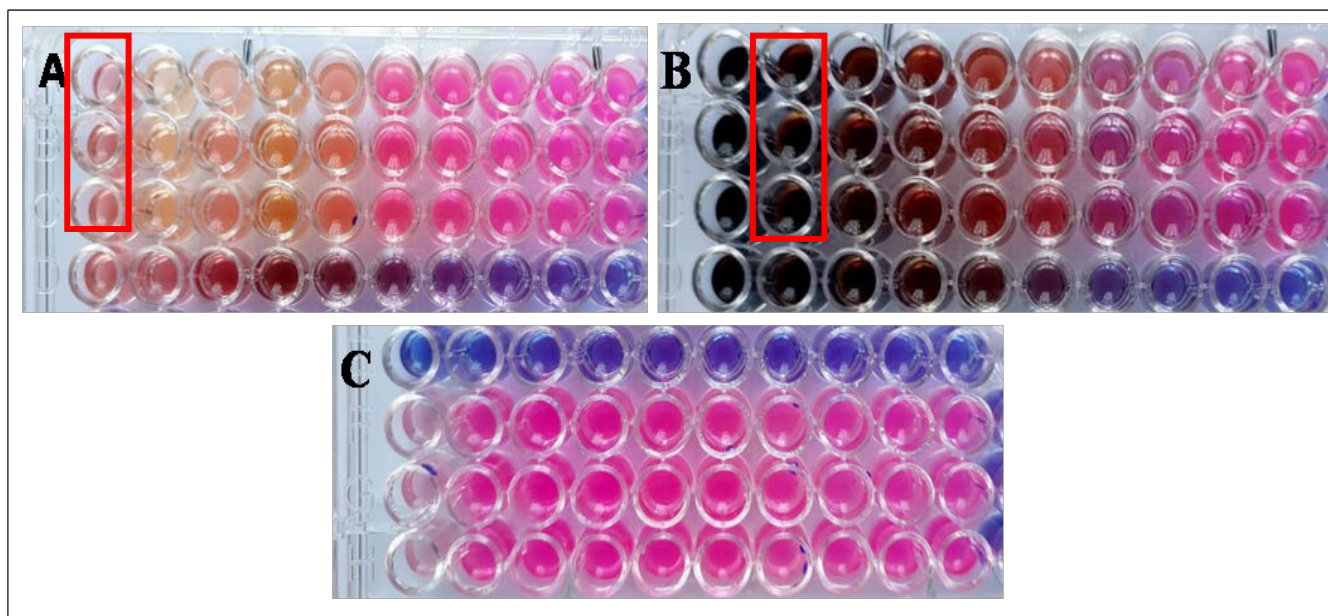


Figure 8. Évaluation de l'activité antibactérienne sur microplaque de 96 puits contre *Staphylococcus aureus*. (A) acide gallique ;(B) nanoparticules Cu-acide gallique ;(C) sulfate de cuivre (CuSO_4). La zone encadrée représente la CMI.

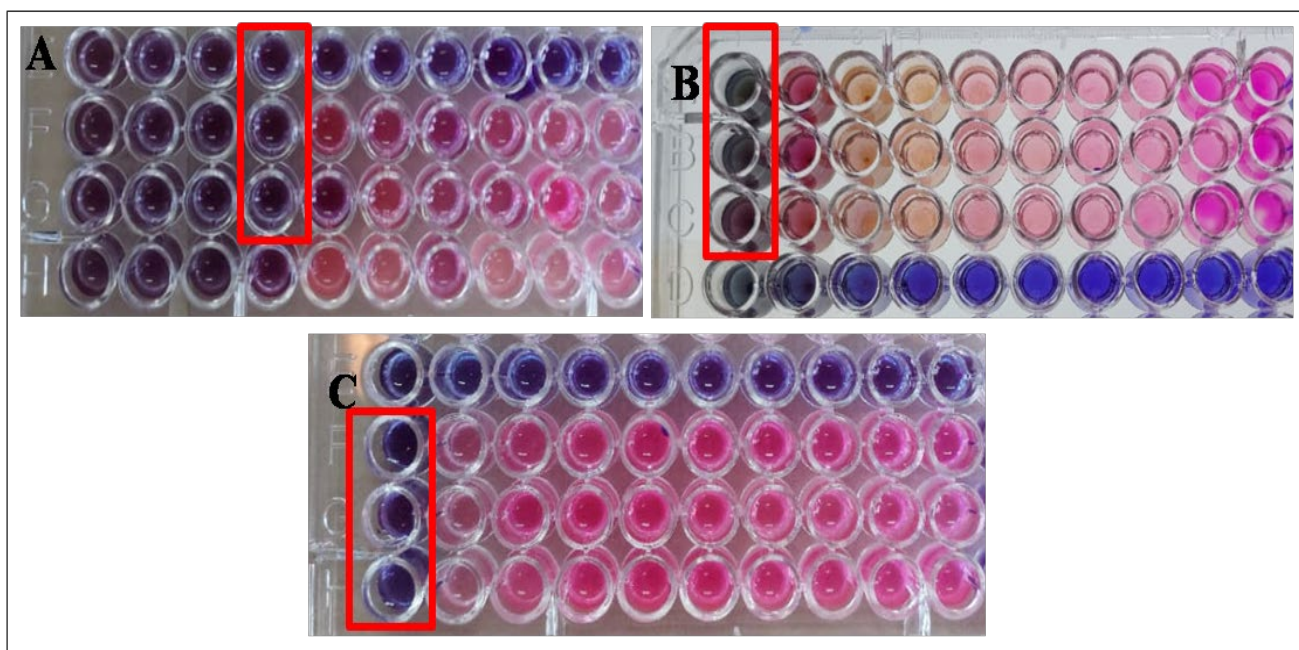


Figure 8. Évaluation de l'activité antibactérienne sur microplaque de 96 puits contre *Staphylococcus aureus*. (A) acide tannique ;(B) nanoparticules Cu-acide tannique ;(C) sulfate de cuivre (CuSO_4). La zone encadrée représente la CMI.

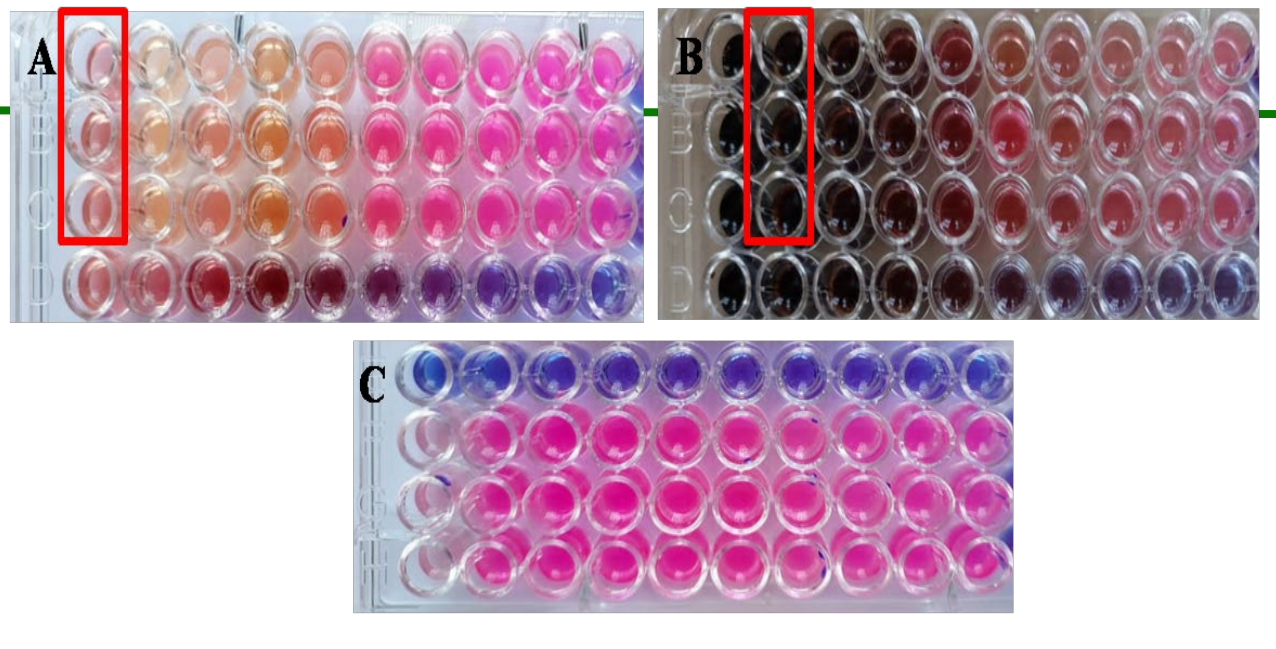


Figure 9. Évaluation de l'activité antibactérienne sur microplaque de 96 puits contre *Escherichia coli*. (A) acide tannique ; (B) nanoparticules Cu-acide tannique ; (C) sulfate de cuivre (CuSO_4). La zone encadrée représente la CMI.

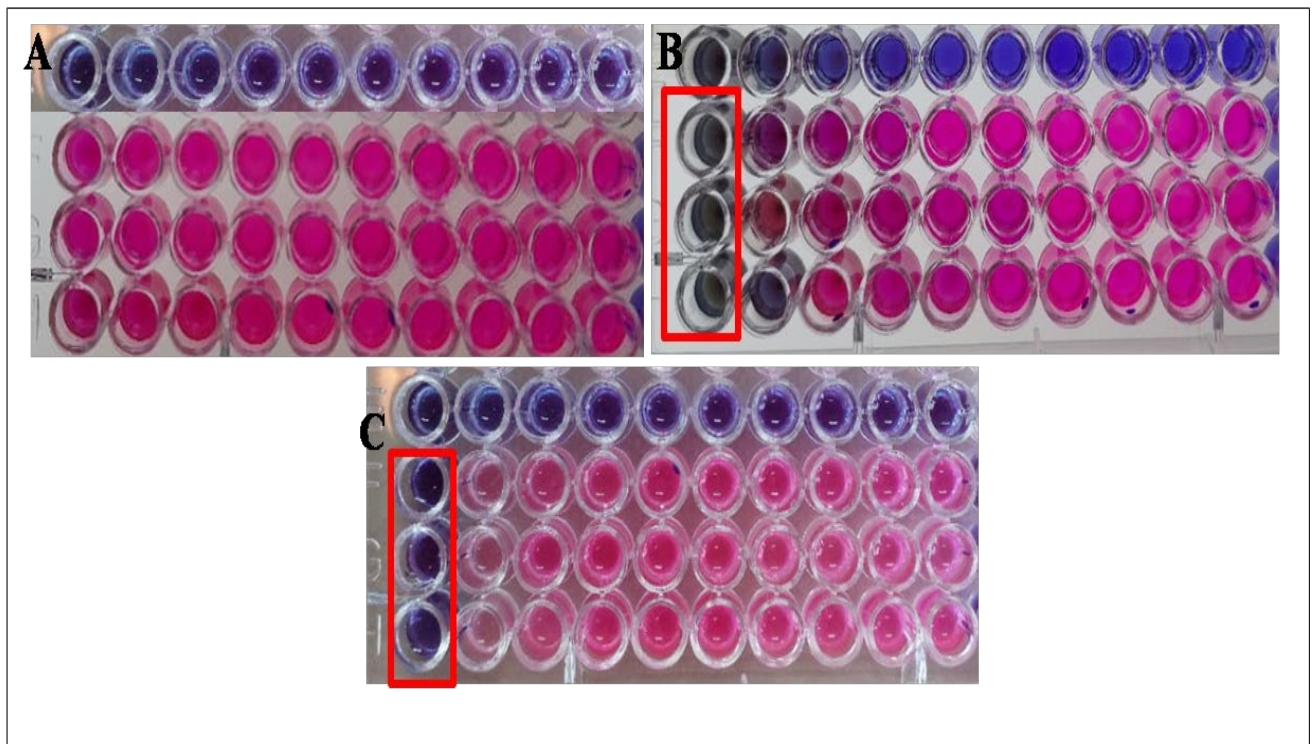


Figure 10. Évaluation de l'activité antibactérienne sur microplaque de 96 puits contre *Escherichia coli*. (A) acide gallique ; (B) nanoparticules Cu-acide gallique ; (C) sulfate de cuivre (CuSO_4). La zone encadrée représente la CMI.

Les résultats obtenus montrent que les composés testés présentent des niveaux d'activité antibactérienne variables, reflétant l'influence de leur structure chimique, de leur mécanisme d'action ainsi que de leur capacité à interagir avec les cellules bactériennes. L'évaluation des valeurs de CMI et de CMB met en évidence une différence marquée entre les polyphénols seuls, le sulfate de cuivre et les systèmes Cu-polyphénols, soulignant l'importance des interactions entre ces différents constituants.

L'acide gallique a présenté une activité antibactérienne modérée, avec une CMI de 8,5 mg/mL et un effet bactéricide (CMB/CMI = 1). Cette efficacité demeure inférieure à celle rapportée par **(Borges et al.,2013)**, qui ont observé des CMI comprises entre 0,5 et 2 mg/mL contre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Selon **(Santos et al. 2020)**, l'activité antimicrobienne de l'acide gallique résulte principalement de sa capacité à perturber la membrane bactérienne, à générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et à inhiber plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme cellulaire. Dans notre étude, la moindre efficacité observée pourrait être liée à une diffusion limitée du composé dans le milieu Mueller-Hinton, à des interactions avec les constituants du milieu de culture ou encore à une biodisponibilité réduite de la fraction active.

L'acide tannique s'est révélé plus actif, avec une CMI de 1 mg/mL et un effet bactéricide (CMB/CMI = 1). Ces résultats sont en accord avec ceux de **(Daglia2012)**, qui attribue la forte activité antimicrobienne des tanins à leur structure polyphénolique hautement ramifiée, capable d'établir de multiples interactions avec les membranes bactériennes, de précipiter les protéines membranaires, d'inhiber diverses enzymes essentielles et de complexer plusieurs ions métalliques indispensables au métabolisme bactérien. La présence d'un grand nombre de groupements hydroxyles confère ainsi à l'acide tannique une capacité d'interaction nettement supérieure à celle de l'acide gallique, expliquant son activité antibactérienne plus importante.

Le sulfate de cuivre a également présenté une activité bactéricide, avec une CMI de 1,3mg/mL (CMB/CMI = 1). Cette activité est cohérente avec les travaux de **(Grass et al.,2011)**, qui ont montré que les ions Cu^{2+} exercent une toxicité bactérienne multi-cible en catalysant la formation de ROS, en provoquant la peroxydation des membranes lipidiques, l'oxydation des protéines contenant des groupements thiols ainsi que des dommages irréversibles à l'ADN. La présence directe d'ions Cu^{2+} libres dans le milieu favorise une interaction immédiate avec les cellules bactériennes, expliquant l'effet bactéricide observé.

L'association du cuivre avec les polyphénols modifie toutefois profondément cette activité. Les nanoparticules Cu-acide gallique présentent une CMI de 5 mg/mL, mais un effet essentiellement bactériostatique (CMB/CMI > 4). Cette observation suggère que la complexation entre le cuivre et l'acide gallique stabilise partiellement les ions Cu^{2+} , limitant leur disponibilité immédiate. Selon (Li et al., 2021), l'efficacité des systèmes cuivre-polyphénols dépend directement de l'équilibre entre la stabilité du complexe et la cinétique de libération des ions métalliques. Une libération trop lente réduit la génération de ROS et limite les dommages oxydatifs, permettant aux bactéries d'activer leurs mécanismes de défense et de survivre. Malgré cela, la CMI des nanoparticules Cu-acide gallique reste inférieure à celle de l'acide gallique seul, ce qui suggère qu'une synergie existe entre le cuivre et le polyphénol. En effet, l'acide gallique ne joue pas uniquement un rôle de stabilisant : il contribue également à fragiliser les membranes bactériennes, facilitant l'action des ions Cu^{2+} , tandis que ces derniers renforcent le stress oxydatif induit par le polyphénol. Cette coopération améliore l'inhibition de la croissance bactérienne, même si elle demeure insuffisante pour provoquer une destruction complète des cellules.

À l'inverse, les nanoparticules Cu-acide tannique présentent une activité bactéricide (CMB/CMI = 1), malgré une CMI relativement élevée (10 mg/mL). Cette activité suggère qu'une concentration seuil est nécessaire avant d'obtenir une libération suffisante des ions Cu^{2+} . Une fois cette concentration atteinte, la combinaison entre le cuivre et l'acide tannique induit un effet antibactérien nettement renforcé. L'acide tannique stabilise efficacement les nanoparticules grâce à ses nombreux groupements phénoliques, favorise leur dispersion et augmente leur surface de contact avec les bactéries. Cette organisation facilite une libération progressive mais efficace des ions Cu^{2+} , lesquels génèrent un stress oxydatif intense responsable de dommages irréversibles aux membranes, aux protéines et à l'ADN. Parallèlement, l'acide tannique exerce sa propre activité antimicrobienne par interaction avec les protéines membranaires et les enzymes bactériennes. L'activité observée résulte ainsi d'une véritable synergie entre les ions Cu^{2+} et l'acide tannique, chaque composant renforçant l'action de l'autre et conduisant à un effet bactéricide irréversible.

La comparaison entre les deux systèmes nanoparticulaires met en évidence l'influence déterminante de la nature du polyphénol sur l'activité antibactérienne globale. Bien que les nanoparticules Cu-acide gallique présentent une CMI plus faible (5 mg/mL) que les nanoparticules Cu-acide tannique (10 mg/mL), leur effet reste principalement

bactériostatique, tandis que les Cu–acide tannique induisent une activité bactéricide (CMB/CMI = 1). Cette différence suggère que la structure du ligand polyphénolique et de son interaction avec les ions Cu^{2+} , influençant la stabilité du complexe et la libération des espèces actives.

De manière générale, les polyphénols possèdent une activité antimicrobienne intrinsèque liée à leur capacité à perturber les membranes bactériennes, à complexer les protéines et à interférer avec les systèmes enzymatiques essentiels (Daglia, 2012). Par ailleurs, les ions cuivre exercent une forte toxicité bactérienne multi-cible, notamment via la génération d'espèces réactives de l'oxygène, l'endommagement des membranes lipidiques et l'altération des protéines contenant des groupements thiols (Grass et al., 2011). L'association des deux composants dans un même nanosystème permet donc une action synergique, combinant stress oxydatif induit par le cuivre et perturbation membranaire induite par les polyphénols.

Selon (Nikaido 2003), la différence de sensibilité observée entre *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* s'explique principalement par la structure de leur enveloppe cellulaire. La membrane externe des bactéries à Gram négatif, riche en lipopolysaccharides, constitue une barrière de perméabilité limitant la pénétration des composés antimicrobiens et des ions métalliques, tandis que les bactéries à Gram positif, dépourvues de cette membrane, sont généralement plus accessibles à ces agents. Cette différence structurale pourrait également expliquer les variations d'efficacité observées entre les deux formulations nanoparticulaires. En effet, la nature du polyphénol utilisé influence la stabilité du complexe Cu–polyphénol ainsi que la cinétique de libération des ions Cu^{2+} , modulant ainsi la biodisponibilité des espèces actives et, par conséquent, leur interaction avec les cellules bactériennes. Ces paramètres contribuent à expliquer les différences de performance antibactérienne observées entre les nanoparticules Cu–acide gallique et Cu–acide tannique.

Les résultats des CMB confirment ces observations. L'acide gallique, l'acide tannique, le sulfate de cuivre ainsi que les nanoparticules Cu–acide tannique présentent un rapport CMB/CMI égal à 1, traduisant une activité bactéricide. En revanche, les nanoparticules Cu–acide gallique présentent un rapport CMB/CMI supérieur à 4, confirmant leur effet essentiellement bactériostatique. Ces différences illustrent l'importance de la cinétique de libération des ions Cu^{2+} dans l'expression de l'activité antimicrobienne.

Dans l'ensemble, les résultats démontrent que l'efficacité des systèmes Cu–polyphénols ne résulte pas uniquement de l'action individuelle du cuivre ou des polyphénols, mais principalement de leur synergie. Les polyphénols assurent la réduction et la stabilisation des nanoparticules tout en exerçant une activité antimicrobienne propre, alors que les ions Cu^{2+} amplifient les dommages cellulaires par la production de ROS et les interactions avec les biomolécules bactériennes. L'équilibre entre la stabilité du complexe et la biodisponibilité des ions cuivre apparaît ainsi comme un facteur déterminant de l'efficacité antibactérienne. Dans notre étude, cette synergie est particulièrement marquée pour le système Cu–acide tannique, qui représente la formulation la plus prometteuse en raison de son activité bactéricide et de son potentiel comme alternative aux antibiotiques conventionnels.

3. Le test de Time-Kill assay

Les résultats du Time-kill assay, réalisés à des concentrations correspondant aux CMI déterminées pour chaque système mettent en évidence une activité antibactérienne fortement dépendante de la nature du ligand polyphénolique, de la souche ainsi que du temps d'exposition. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures 12 et 13 et le tableau VIII. Les figures 14, 15, 16 et 17 représentent le dénombrement des colonies bactériennes en fonction du temps d'exposition

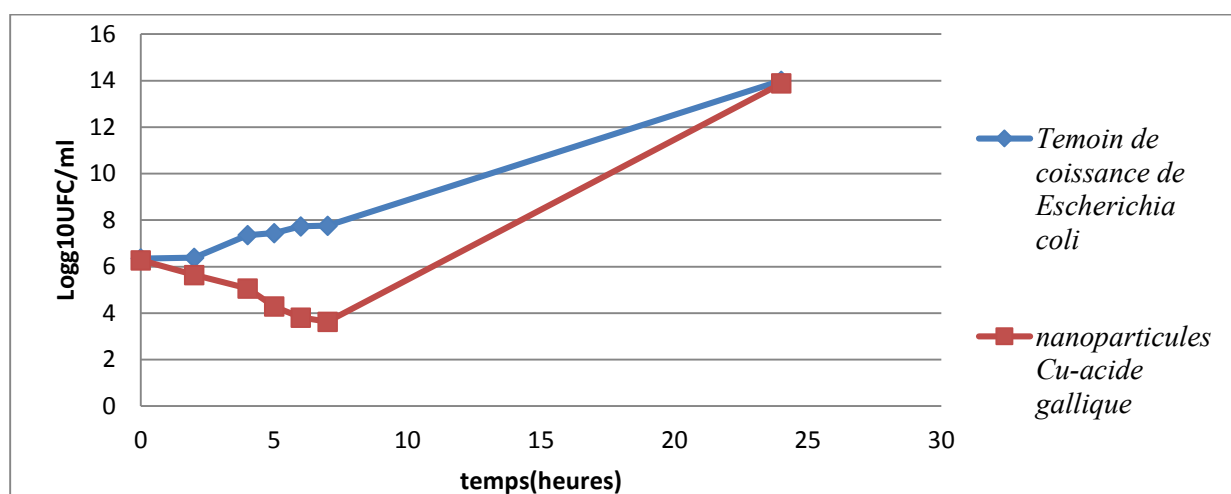


Figure 11. Courbe de croissance d'*Escherichia coli* en présence et absence des nanoparticules Cu-Ag

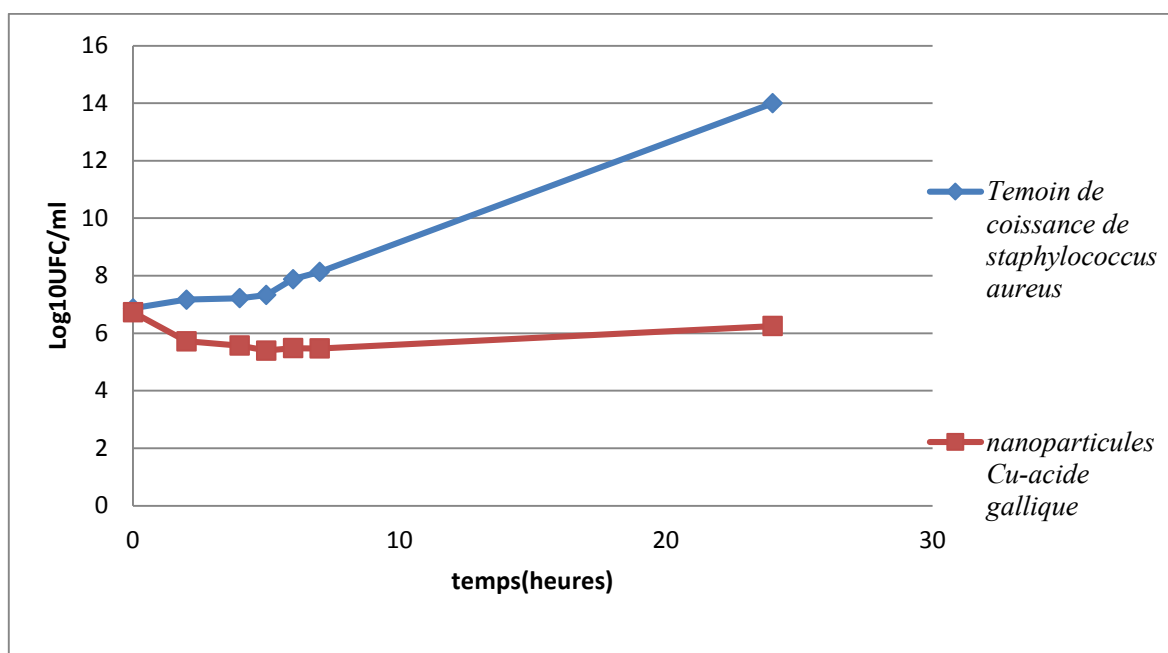


Figure 12. Courbe de croissance de *Staphylococcus aureus* en présence et absence des nanoparticules Cu-AG.

Tableau VIII. Résultat de croissance de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* vis-à-vis des nanoparticules Cu-acide tannique

| Temps (h) | <i>Staphylococcus aureus</i> – UFC/mL | <i>Escherichia coli</i> – UFC/mL |
|-----------|---------------------------------------|----------------------------------|
| T0 | Supérieur à 300 | Supérieur à 300 |
| T1 | 70 | 0 |
| T2 | 13 | 0 |
| T3 | 0 | 0 |
| T4 | 0 | 0 |
| T5 | 0 | 0 |
| T6 | 0 | 0 |
| T24 | 0 | 0 |

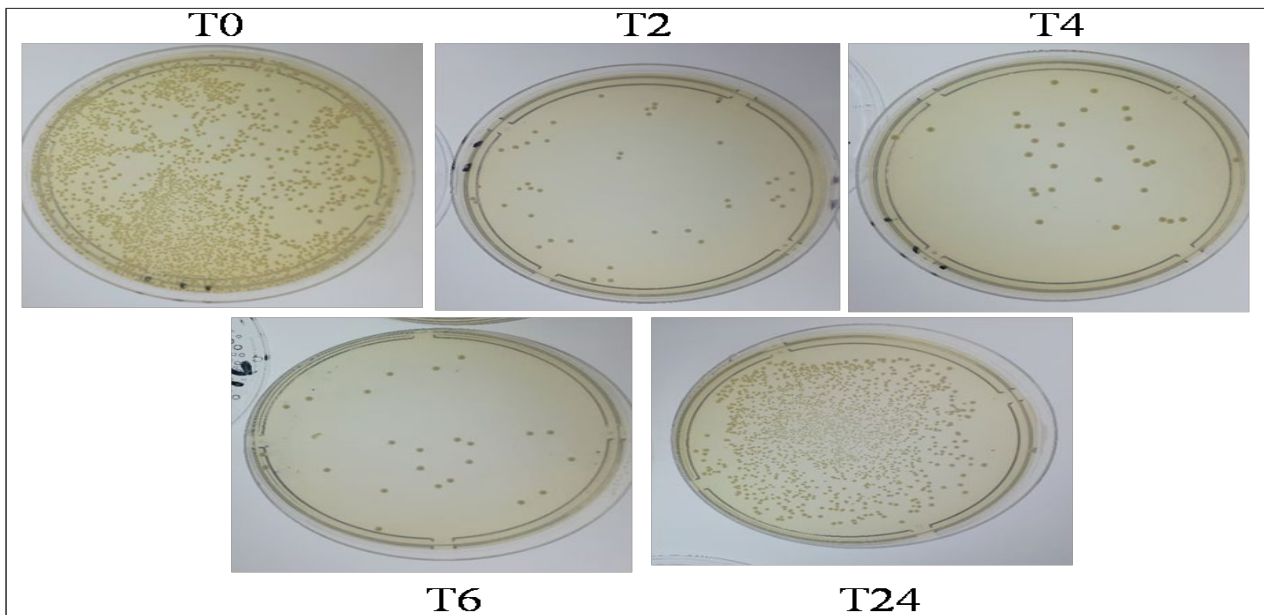


Figure 13. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide gallique sur *Staphylococcus aureus*.

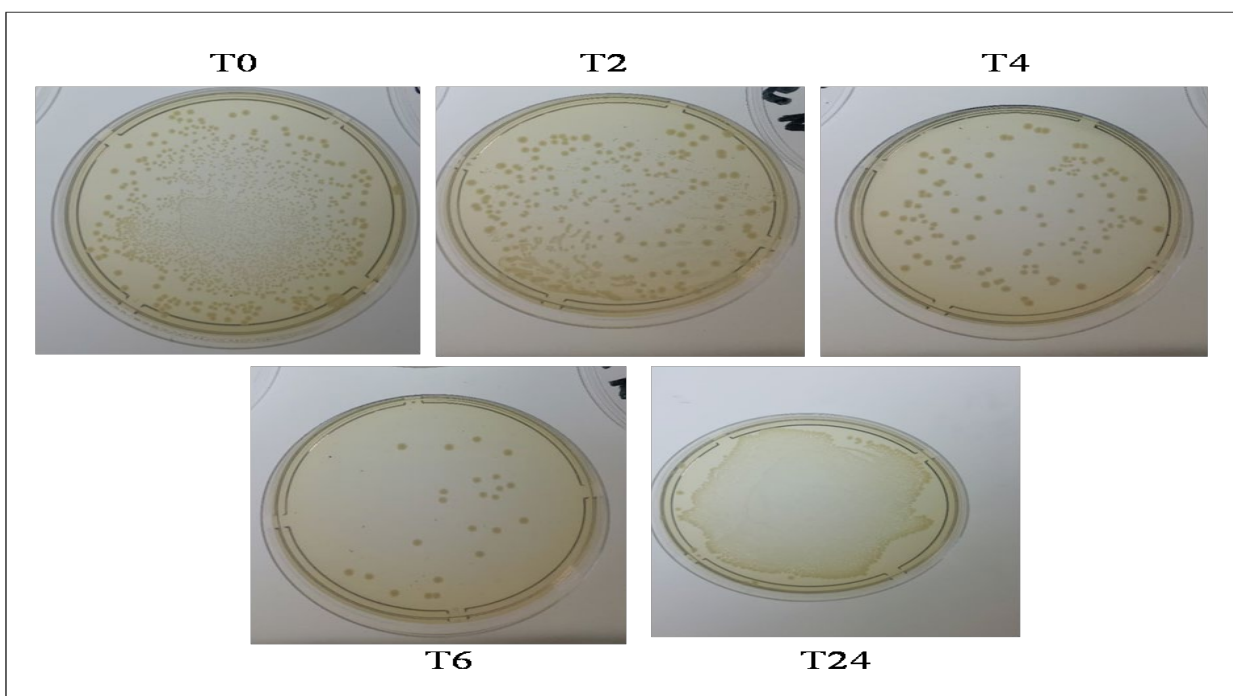


Figure 14. Résultat de Time kill des Nps Cu-acide gallique sur *Escherichia coli*.

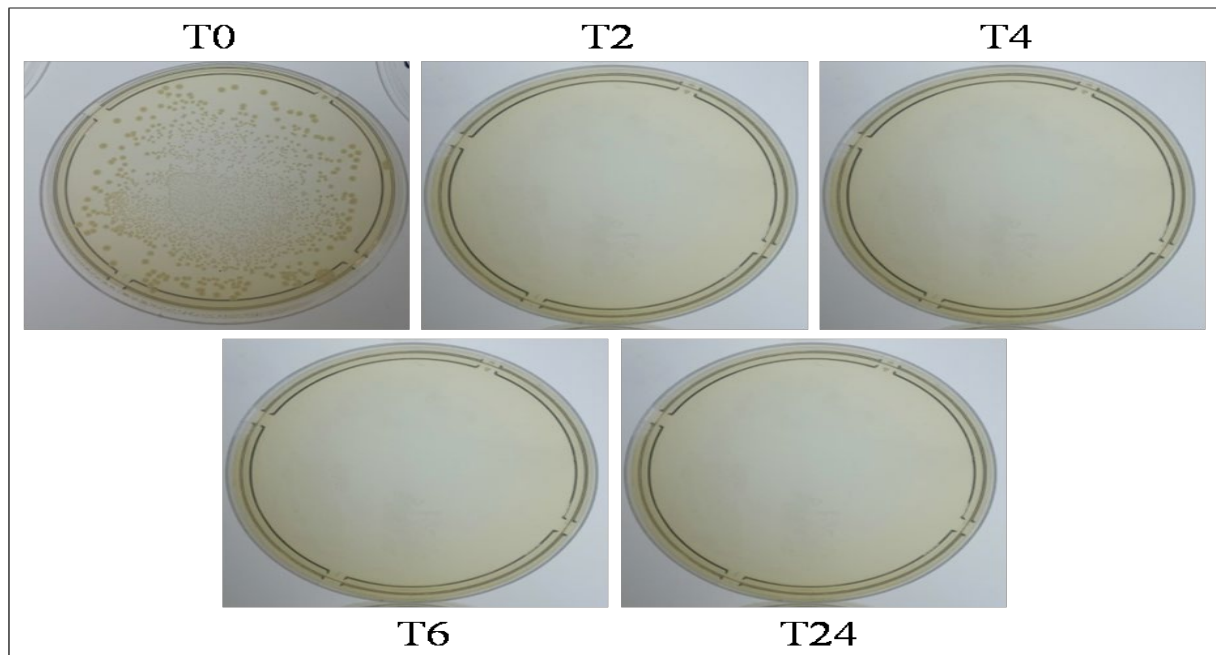


Figure 16 Résultat de Time kill des Nps Cu-acide tannique sur *Staphylococcus aureus*

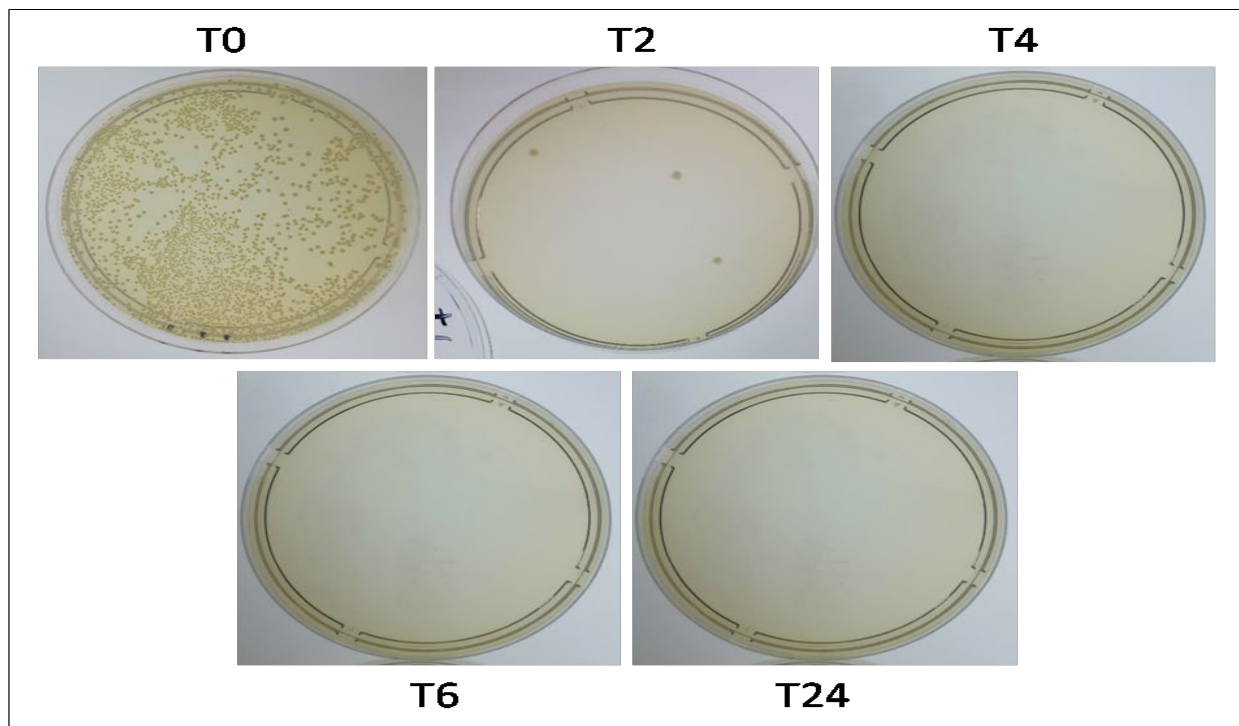


Figure 15 Résultat de Time kill des Nps Cu-acide tannique sur *Escherichia coli*

Les résultats du test de Time-kill, réalisés aux concentrations minimales inhibitrices (CMI), mettent en évidence une activité antibactérienne fortement dépendante de la nature du ligand polyphénolique, de la souche bactérienne et du temps d'exposition. Les nanoparticules Cu-acide gallique (Cu-AG) et Cu-acide tannique (Cu-AT) reposent sur des mécanismes d'action communs impliquant la libération d'ions Cu^{2+} , la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'induction de dommages oxydatifs affectant les membranes, les protéines et l'ADN bactériens. Toutefois, leurs performances diffèrent considérablement en raison de leurs propriétés structurales et de la cinétique de libération des ions cuivre, fortement influencées par le ligand organique (Zhang et al., 2023).

Les nanoparticules Cu-AG ont présenté une activité essentiellement bactériostatique. Chez *Escherichia coli*, une diminution initiale de la charge bactérienne a été observée au cours des premières heures d'incubation, traduisant une inhibition transitoire de la multiplication cellulaire. Cependant, après 24 heures, une reprise complète de la croissance a conduit à la formation d'un tapis bactérien, indiquant que les cellules survivantes ont retrouvé leur capacité de prolifération. En revanche, chez *Staphylococcus aureus*, la diminution progressive de la population bactérienne a été suivie d'une stabilisation de la croissance au cours de l'incubation, sans reprise massive ni élimination complète des bactéries. Ces observations confirment que les nanoparticules Cu-AG exercent principalement un effet inhibiteur de la multiplication bactérienne plutôt qu'un effet létal.

Chez *Escherichia coli*, cette reprise de croissance peut être attribuée à l'activation de mécanismes d'adaptation au stress cuivreux. La membrane externe riche en lipopolysaccharides favorise initialement l'interaction avec les nanoparticules ainsi que la diffusion des ions Cu^{2+} via les porines. Toutefois, la libération progressive des ions cuivre par les nanoparticules Cu-AG génère un stress oxydatif modéré compatible avec la survie d'une fraction de la population bactérienne. Les cellules survivantes activent alors les systèmes d'homéostasie du cuivre, notamment les pompes d'efflux CopA et CusCFBA, ainsi que les enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase et la catalase. La réparation des protéines oxydées et des lésions de l'ADN permet ensuite la restauration de l'activité métabolique et explique la reprise de croissance observée après 24 heures (Dupont et al., 2011 ; Lemire et al., 2013).

Chez *Staphylococcus aureus*, l'épaisse couche de peptidoglycane constitue une barrière limitant la diffusion des nanoparticules et des ions Cu^{2+} . Cette structure réduit l'intensité du stress oxydatif induit par les nanoparticules Cu-AG et ralentit les interactions avec les constituants intracellulaires (**Ramos-Zúñiga et al., 2023**). Bien que les bactéries ne soient pas totalement éliminées, les dommages cellulaires persistent suffisamment pour maintenir une inhibition durable de la prolifération. Cette stabilisation de la croissance traduit un équilibre entre les dommages induits par les nanoparticules et les mécanismes de réparation bactériens, caractéristique d'un effet bactériostatique.

À l'inverse, les nanoparticules Cu-AT ont présenté une activité bactéricide rapide et irréversible contre les deux souches. Aucune reprise de croissance n'a été observée pendant toute la durée de l'expérience, indiquant une destruction définitive de la population bactérienne. Cette efficacité supérieure peut être attribuée à la structure moléculaire de l'acide tannique, qui possède un nombre beaucoup plus élevé de groupements phénoliques que l'acide gallique. Ces nombreux groupements hydroxyles assurent une chélation plus importante des ions Cu^{2+} , améliorent la stabilité colloïdale des nanoparticules, limitent leur agrégation et favorisent une dispersion homogène ainsi qu'un contact plus étroit avec les cellules bactériennes (**Liu et al., 2024**). Cette organisation favorise une libération locale plus importante des ions cuivre et une production accrue de ROS au voisinage immédiat de la membrane bactérienne.

Le stress oxydatif généré dépasse rapidement les capacités de défense des bactéries. Les ions Cu^{2+} interagissent avec les groupements thiols des enzymes essentielles, perturbent la chaîne respiratoire, augmentent la perméabilité membranaire et provoquent la fuite du contenu cytoplasmique. Parallèlement, la production massive de ROS entraîne une peroxydation des lipides membranaires, une oxydation irréversible des protéines et des lésions sévères de l'ADN incompatibles avec la survie cellulaire (**Zhang et al., 2023 ; Lemire et al., 2013**). Chez *Escherichia coli*, les systèmes CopA et CusCFBA deviennent rapidement saturés, tandis que chez *Staphylococcus aureus*, les défenses antioxydantes ne suffisent plus à neutraliser les ROS, conduisant à une mort cellulaire irréversible (**Ramos-Zúñiga et al., 2023**).

Ces résultats mettent également en évidence l'intérêt de l'association entre le cuivre et les polyphénols. Utilisés seuls, les ions Cu^{2+} possèdent une activité antimicrobienne reconnue, mais leur efficacité est limitée par leur diffusion rapide, leur précipitation dans le milieu et l'activation des systèmes bactériens de détoxification. De leur côté, l'acide gallique et l'acide tannique présentent une activité antibactérienne modérée reposant principalement sur la perturbation de la membrane, la chélation des métaux essentiels et l'inhibition de certaines enzymes bactériennes. En revanche, leur combinaison sous forme de nanoparticules permet d'associer les propriétés antimicrobiennes intrinsèques du cuivre aux capacités réductrices, complexantes et stabilisatrices des polyphénols. Cette synergie améliore la stabilité des nanoparticules, contrôle la libération des ions Cu^{2+} , augmente les interactions avec la surface bactérienne et amplifie la production locale de ROS, ce qui conduit à une activité antibactérienne supérieure à celle des deux composants utilisés séparément.

Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la nature du polyphénol joue un rôle déterminant dans l'activité biologique des nanoparticules de cuivre. Alors que les nanoparticules Cu-AG induisent un stress oxydatif modéré permettant l'adaptation des bactéries et expliquant la reprise de croissance observée chez *Escherichia coli* ainsi que la stabilisation de la croissance chez *Staphylococcus aureus*, les nanoparticules Cu-AT génèrent un stress oxydatif beaucoup plus intense qui dépasse immédiatement les capacités d'adaptation bactériennes, conduisant à une activité bactéricide rapide, complète et irréversible. Cette différence souligne l'importance du choix du ligand polyphénolique dans la conception de nanoformulations antimicrobiennes performantes.

4. Activité anti-biofilms

4.1. Test de formation de biofilms

4.1.1. Méthode qualitative

Le test sur gélose Rouge Congo a montré que *Staphylococcus aureus* produit un biofilm important, caractérisé par des colonies noires sèches et cristallines, tandis qu'*Escherichia coli* présente une faible production de biofilm avec des colonies pâles et blanchâtres. Ces résultats confirment une forte capacité biofilmogène chez *Staphylococcus aureus* et une adhésion limitée chez *Escherichia coli* dans les conditions étudiées Figure 18.

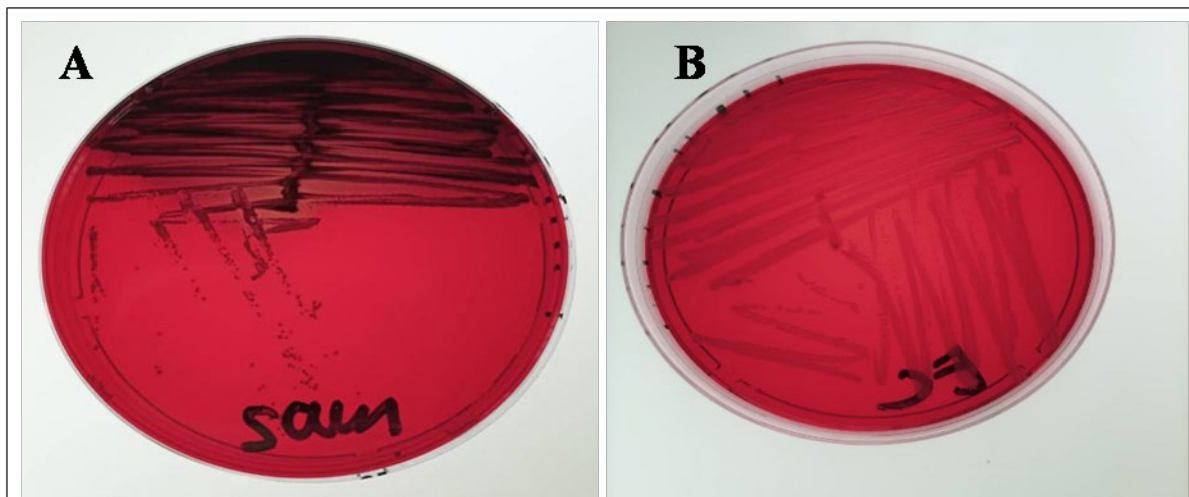


Figure 17. (A) aspect de *staphylococcus aureus* cultivée sur gélose rouge Congo
(B) aspect de *Escherichia coli* cultivée sur gélose rouge Congo

Le principe du test au Rouge Congo repose sur l'interaction entre le colorant Rouge Congo et les polysaccharides extracellulaires produits par les bactéries formant un biofilm. Les souches productrices de biofilm synthétisent une matrice riche en exopolysaccharides capables de fixer le colorant, ce qui entraîne l'apparition de colonies noires ou noirâtres. À l'inverse, les bactéries non productrices de biofilm ne retiennent pas efficacement le colorant et donnent des colonies rouges, rosées ou blanchâtres (Freeman et al., 1989).

Chez *Staphylococcus aureus*, la forte coloration noire observée peut être expliquée par une importante production de polysaccharides d'adhésion intercellulaire (PIA), favorisant l'accumulation bactérienne et la formation d'un biofilm mature. Cette matrice protège les

cellules bactériennes contre les antibiotiques et les défenses immunitaires, augmentant ainsi leur résistance et leur persistance dans les infections chroniques (**Costerton et al., 1999**).

En revanche, *Escherichia coli* montré une coloration pâle blanchâtre, suggérant une faible synthèse d'exopolysaccharides dans les conditions expérimentales utilisées. Cette différence peut être liée aux caractéristiques structurales et génétiques propres aux bactéries Gram négatives ainsi qu'aux conditions de culture influençant l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm (**Stepanović et al., 2007**).

4.1.2. Méthode quantitative

La capacité de formation du biofilm des souches bactériennes a été évaluée par la méthode de microplaque à 96 puits avec coloration au cristal violet. La densité optique critique (DOc),

Les résultats obtenus montrent que *Staphylococcus aureus* présente une densité optique moyenne de $1,821 \pm 0,111$, largement supérieure à $4 \times DOc$, indiquant une forte capacité de formation du biofilm. En revanche, *Escherichia coli* a enregistré une DO moyenne de $0,088 \pm 0,002$, inférieure à la valeur seuil, traduisant une absence ou une très faible production de biofilm. Ces résultats sont présentés dans le tableau IX, et la figure 19.

Tableau IX . Capacité de formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* évaluée par la méthode au cristal violet.

| Souche bactérienne | DO moyenne | Ecart-type | Capacité de formation du biofilm |
|------------------------------|------------|------------|----------------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1,82166667 | 0,11132984 | Forte productrice de biofilm |
| <i>Escherichia coli</i> | 0,088 | 0,002 | Non productrice de biofilm |

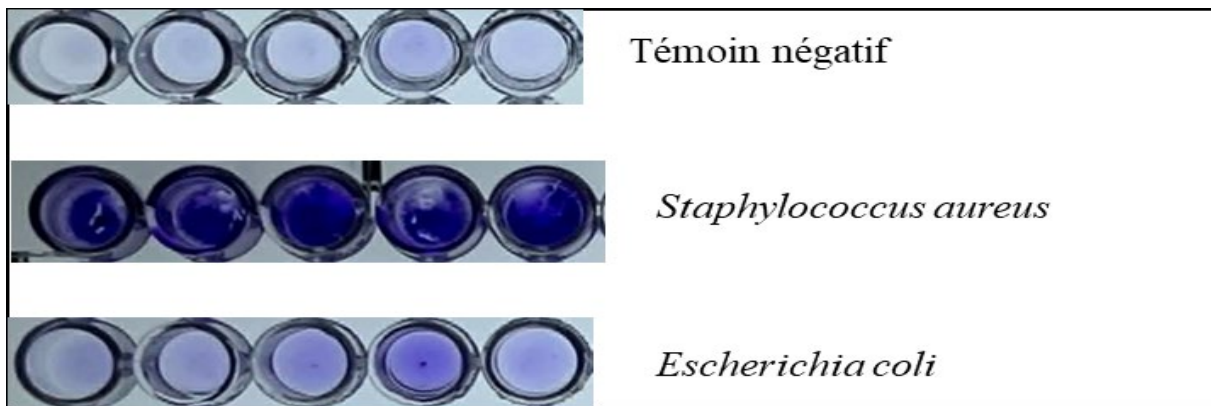


Figure 18. Résultats du test de formation de biofilm.

Les résultats obtenus avec *Staphylococcus aureus* sont cohérents avec plusieurs études rapportant sa forte capacité biofilmogène. (Ball et al.,2022), en utilisant le test au cristal violet en microplaque, ont montré que différentes souches de *Staphylococcus aureus* produisent des biofilms d'intensité variable, certaines présentant une biomasse élevée comparable à celle observée dans notre étude. De même, (Xu et al.,2016), à l'aide des tests Crystal Violet Assay et XTT assay, ont confirmé que certaines souches présentent une forte capacité d'adhésion et de maturation du biofilm. Bien que ces travaux concernent principalement des isolats cliniques, leurs résultats restent comparables à ceux obtenus avec la souche utilisée dans cette étude (Xu et al., 2016 ; Ball et al., 2022).

Concernant *Escherichia coli*, nos résultats concordent avec ceux de (Crémet et al.,2013), qui ont montré une forte variabilité de la capacité de formation du biofilm selon les souches et les conditions expérimentales. Dans leur étude utilisant également le cristal violet, plusieurs isolats ont présenté une faible production de biofilm, similaire à celle observée ici. Les auteurs soulignent que cette variabilité dépend des facteurs génétiques et des conditions de culture, ce qui explique la faible adhésion observée dans notre travail.

La forte densité optique obtenue avec *Staphylococcus aureus* reflète une importante biomasse adhérente, incluant les cellules bactériennes et la matrice extracellulaire. Selon (Ball et al.,2022), cette matrice est constituée de polysaccharides, protéines et ADN extracellulaire, jouant un rôle clé dans la stabilité du biofilm et la persistance des infections associées aux dispositifs médicaux (Stepanović et al., 2007).

À l'inverse, la faible densité optique observée chez *Escherichia coli* suggère une adhésion limitée et une production réduite de matrice extracellulaire dans les conditions utilisées. (Crémet et al., 2013) ont montré que cette capacité dépend notamment de l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion et la synthèse de la matrice, tels que les *fimbriaecurli* et le système *pga*.

Les différences observées entre les deux espèces s'expliquent par leurs mécanismes distincts de formation du biofilm. Chez *Staphylococcus aureus*, des gènes tels que *agrA*, *sarA*, *clfA* et *fnbA* favorisent l'attachement et la structuration d'un biofilm dense (Ball et al., 2022). Chez *Escherichia coli*, la formation du biofilm dépend plutôt du profil génétique de la souche et de gènes comme *csgA* et *pgaA*, ainsi que de facteurs environnementaux tels que la composition du milieu et l'oxygénation (Crémet et al., 2013).

Ainsi, les résultats confirment une forte capacité biofilmogène chez *Staphylococcus aureus* et une faible production chez *Escherichia coli* dans nos conditions expérimentales. Ils sont en accord avec les travaux de (Crémet et al. 2013 ; Xu et al. 2016 ; Ball et al. 2022), confirmant ainsi l'intérêt du test au cristal violet comme méthode fiable pour l'évaluation de la formation du biofilm in vitro.

4.2. Test d'inhibition de formation de biofilm

Afin d'évaluer l'activité antibiofilm des nanoparticules Cu-AT et Cu-AG, le pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* a été déterminé aux différentes concentrations testées (CMI/2, CMI et CMI×2). Les résultats correspondants sont présentés respectivement dans les figures 20,21, 22 et 23

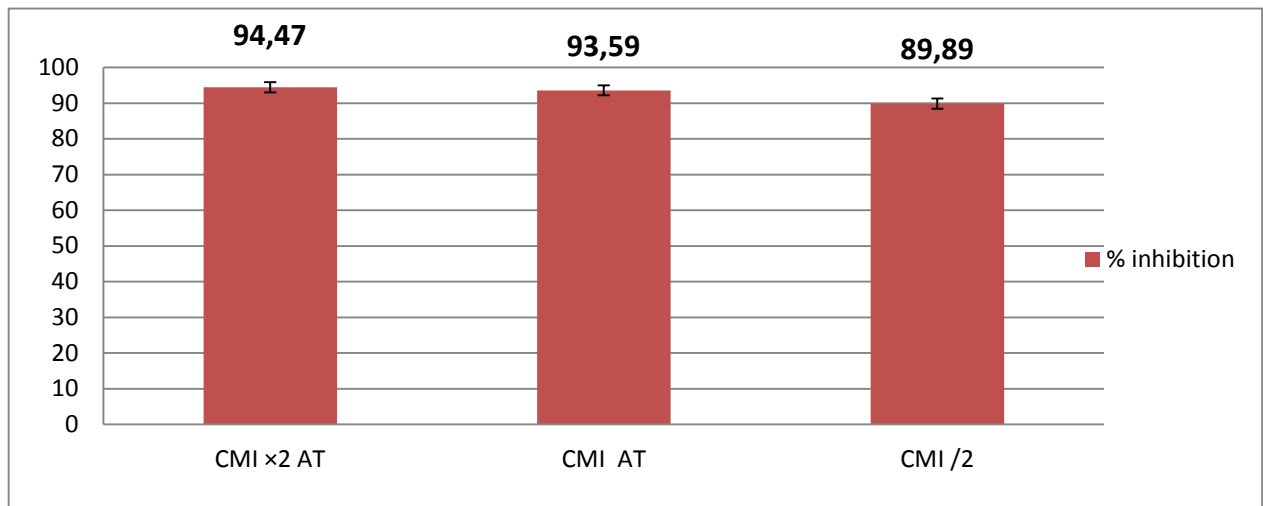


Figure 19. Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* par les Nps Cu-AT

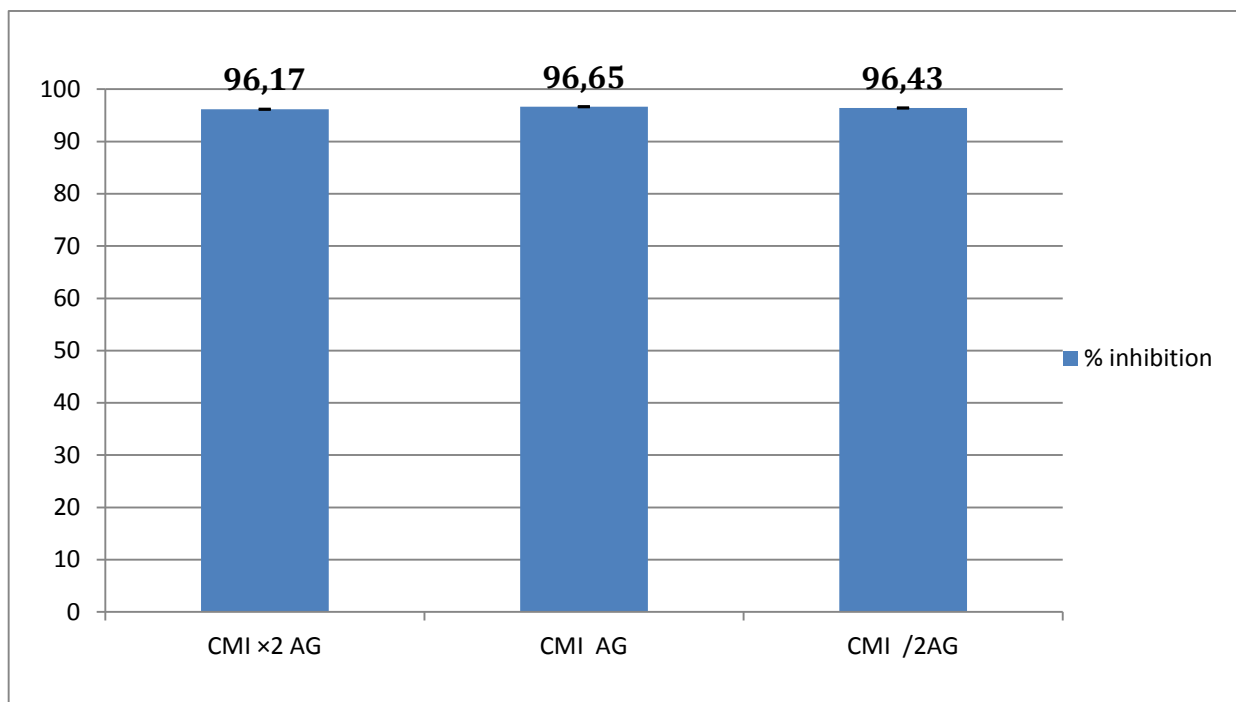


Figure 20. Pourcentage d'inhibition de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* par les Nps Cu-AG.

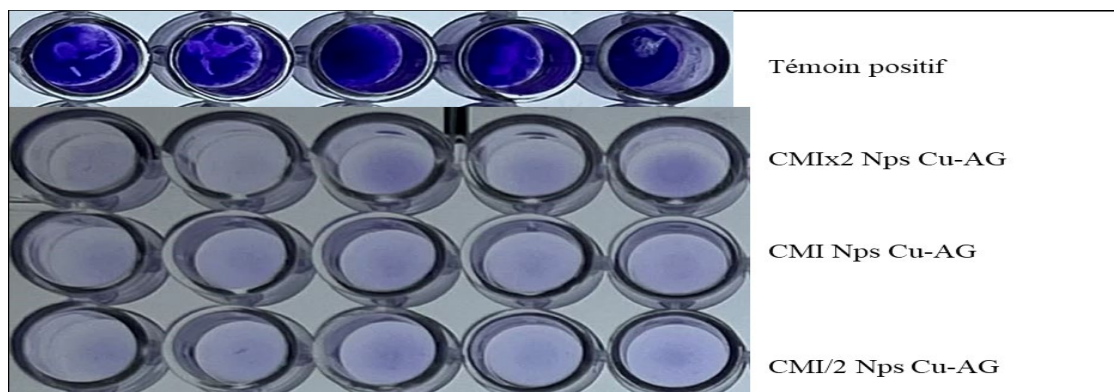


Figure 21. Résultats d'inhibition de formation de biofilms par les NpsCu-AT

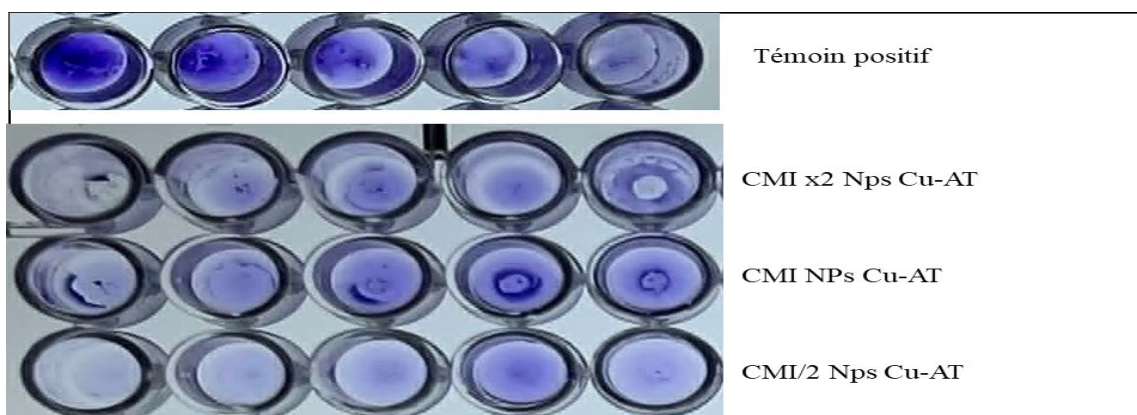


Figure 22. Résultats d'inhibition de formation de biofilms par les Nps Cu-AG.

Cette étude met en évidence l'activité antibiofilm des nanoparticules Cu-acide gallique et Cu-acide tannique vis-à-vis de *Staphylococcus aureus*, un aspect encore peu documenté dans la littérature actuelle concernant ce type de nanostructures.

Les nanoparticules Cu-AG ont présenté une très forte activité inhibitrice de la formation du biofilm de *Staphylococcus aureus* à toutes les concentrations testées. Les valeurs obtenues aux concentrations CMI (5 mg/mL) et CMI×2 (10 mg/mL) sont quasi maximales (99,95 %), tandis que la CMI/2 (2,5 mg/mL) reste également très élevée (98,72 %), traduisant une efficacité antibiofilm importante même à faible dose.

De l'autre côté, les nanoparticules Cu-AT ont montré une inhibition également élevée, supérieure à 95 % pour l'ensemble des concentrations. Les valeurs varient légèrement entre CMI/2 (96,46 %), CMI (95,47 %) et CMI×2 (95,38 %), indiquant une activité globalement stable et peu dépendante de la concentration.

La méthode utilisée (microplaque 96 puits avec coloration au cristal violet après 48 h) est largement reconnue pour la quantification de la biomasse du biofilm (**Borges et al., 2012 ; Liu et al., 2017 ; Dong et al., 2018**). Les résultats obtenus confirment une activité antibiofilmsignificative des deux nanoformulations contre *Staphylococcus aureus*, y compris à des concentrations sub-inhibitrices.

L'effet particulièrement élevé des nanoparticules Cu-AG peut être attribué aux propriétés de l'acide gallique, connu pour interférer avec les mécanismes moléculaires de formation du biofilm. (**Liu et al.2017**) ont montré qu'il inhibe le biofilm de *Staphylococcus aureus* via la régulation de l'opéron *ica*, en diminuant l'expression des gènes *icaA* et *icaD* impliqués dans la synthèse du PIA, tout en augmentant celle du régulateur *icaR*. Ces auteurs ont également observé une désorganisation structurale du biofilm par microscopie électronique.

De même, (**Borges et al. 2012**) ont rapporté que l'acide gallique agit sur l'adhésion bactérienne, le métabolisme cellulaire et les premières étapes de colonisation, en perturbant plusieurs fonctions essentielles à la formation du biofilm.

L'inhibition quasi totale observée avec Cu-AG suggère un effet synergique entre l'acide gallique et le cuivre, améliorant la diffusion dans la matrice biofilm et le contact avec les cellules bactériennes.

Concernant Cu-AT, les résultats concordent avec ceux de (**Dong et al. 2018**), qui ont montré que l'acide tannique inhibe fortement le biofilm de *Staphylococcus aureus* même à faibles concentrations, avec altération de la paroi bactérienne observée par microscopie électronique. (**Miao et al. 2024**) ont également mis en évidence, par analyses protéomiques, des perturbations des voies métaboliques impliquées dans la formation et la stabilité du biofilm.

La différence d'activité entre Cu-AG et Cu-AT pourrait s'expliquer par la structure moléculaire des polyphénols. L'acide gallique, plus simple et de plus faible masse moléculaire, diffuse plus facilement dans la matrice biofilm et agit spécifiquement sur l'opéron *ica*, ce qui pourrait expliquer son efficacité quasi totale. À l'inverse, la structure plus complexe de l'acide tannique pourrait limiter partiellement sa diffusion malgré une forte activité globale.

(**Badra et al.2022**) ont également confirmé l'activité antibiofilm de l'acide gallique contre *Staphylococcus aureus*, en mettant en évidence une inhibition des mécanismes d'adhésion bactérienne. Enfin, (**Elkhalifa et al. 2024**) ont souligné que les nanoformulations à base de polyphénols améliorent la stabilité, la biodisponibilité et la pénétration dans les biofilms, ce qui renforce l'efficacité observée dans cette étude.

Ainsi, les résultats confirment que les polyphénols, en particulier l'acide gallique et l'acide tannique, associés au cuivre, constituent des agents antibiofilm prometteurs contre *Staphylococcus aureus*. Les nanoparticules Cu-AG apparaissent comme les plus performantes, suggérant un rôle majeur de l'acide gallique dans l'inhibition des mécanismes moléculaires de formation du biofilm.

Conclusion

Conclusion

L'antibiorésistance constitue aujourd'hui l'un des principaux défis de santé publique, rendant indispensable le développement de nouvelles stratégies antimicrobiennes capables de compléter ou de remplacer les antibiotiques conventionnels. Dans ce contexte, la présente étude s'est intéressée à la synthèse verte de nanoparticules de cuivre fonctionnalisées par deux polyphénols naturels, l'acide gallique et l'acide tannique, ainsi qu'à l'évaluation de leurs activités antibactérienne et antibiofilm contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922.

La synthèse des nanoparticules a été réalisée avec succès selon une approche respectueuse de l'environnement, conduisant à des rendements élevés de 99,6 % pour les nanoparticules Cu-AG et de 87,5 % pour les nanoparticules Cu-AT. Ces résultats confirment l'intérêt des polyphénols comme agents réducteurs et stabilisants efficaces dans les procédés de synthèse verte.

L'évaluation de l'activité antibactérienne a mis en évidence une nette amélioration de l'efficacité des systèmes cuivre-polyphénols par rapport aux composés utilisés individuellement, démontrant l'existence d'un effet synergique entre les ions cuivre et les polyphénols. Les nanoparticules Cu-AG ont présenté les plus faibles valeurs de CMI (5 mg/mL), traduisant une excellente capacité à inhiber la croissance bactérienne. En revanche, les nanoparticules Cu-AT, malgré une CMI plus élevée (10 mg/mL), ont montré un rapport CMB/CMI égal à 1, confirmant une activité bactéricide. Les essais de Time-Kill ont renforcé ces observations : les nanoparticules Cu-AG ont induit une inhibition transitoire de la croissance bactérienne suivie d'une reprise de la prolifération, traduisant un effet essentiellement bactériostatique, tandis que les nanoparticules Cu-AT ont provoqué une élimination complète et irréversible des deux souches bactériennes, sans reprise de croissance durant toute la durée de l'essai.

Les essais antibiofilm ont également confirmé le potentiel remarquable des deux nanoformulations contre *Staphylococcus aureus*. Les nanoparticules Cu-AG ont présenté les meilleurs pourcentages d'inhibition de la formation du biofilm, atteignant près de 100 % aux concentrations CMI et CMI×2, tout en conservant une activité très élevée à la concentration CMI/2. Les nanoparticules Cu-AT ont également montré une inhibition supérieure à 95 %

quelle que soit la concentration testée, confirmant leur forte efficacité contre les biofilms bactériens.

Ainsi, cette étude met clairement en évidence que l'association cuivre–polyphénols constitue une stratégie particulièrement prometteuse pour développer de nouveaux agents antimicrobiens capables d'agir simultanément sur la croissance bactérienne et sur la formation des biofilms. Les nanoparticules Cu–AG apparaissent comme les plus performantes pour prévenir le développement des biofilms, tandis que les nanoparticules Cu–AT représentent les meilleurs candidats lorsqu'un effet bactéricide est recherché. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour le développement de nouvelles formulations antimicrobiennes destinées à limiter les infections associées aux bactéries résistantes. En conclusion, les nanoparticules Cu–acide gallique et Cu–acide tannique synthétisées par voie verte constituent des nanoformulations prometteuses dans la lutte contre les infections bactériennes et l'antibiorésistance. Les résultats obtenus fournissent une base scientifique solide pour la poursuite de recherches visant leur valorisation dans des applications biomédicales futures.

Perspectives

Au regard des résultats obtenus, plusieurs perspectives peuvent être envisagées afin d'approfondir cette étude :

- Réaliser une caractérisation physicochimique complète des nanoparticules (TEM, SEM, DLS, potentiel zêta, FTIR, XRD et XPS) afin d'établir des corrélations entre leurs propriétés structurales et leurs activités biologiques.
- Étudier la cytotoxicité et la biocompatibilité des nanoparticules sur des lignées cellulaires eucaryotes, puis confirmer leur innocuité par des essais *in vivo*.
- Évaluer leur activité sur des souches cliniques multirésistantes, notamment les SARM, les BLSE et d'autres bactéries prioritaires.
- Étudier leur efficacité sur des biofilms matures ainsi que leur capacité à détruire des biofilms déjà établis.
- Explorer les mécanismes moléculaires impliqués dans leur activité antibactérienne et antibiofilm, notamment la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'altération membranaire, la libération des ions Cu^{2+} et l'expression des gènes impliqués dans la formation du biofilm.

- Évaluer l'association des nanoparticules avec des antibiotiques conventionnels afin de rechercher un éventuel effet synergique permettant de réduire les doses thérapeutiques.
- Développer des formulations innovantes (revêtements antimicrobiens, pansements, hydrogels ou films biomatériaux) destinées à prévenir les infections bactériennes et la formation des biofilms sur les dispositifs médicaux.

Références
bibliographiques

Références bibliographiques

1. Abbasi, R., et al. (2023). Structural parameters of nanoparticles affecting toxicity. *Journal of Nanoparticle Research*, 25, 43. <https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w>
2. Abia, A. L. K., etEssack, S. Y. (2023). Antibiotic resistance in the environment: A One Health perspective. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1294241. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1294241>
3. Ahmed, S., Khan, T., Rehman, A., etUllah, H. (2024). Bacterial infections and antimicrobial resistance: Current trends and future perspectives. *New Microbes and New Infections*, 57, 101234. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2024.101234>
4. Akunne, C. E., Ezeh, P. A., etOkoye, C. O. (2025). Antibiotic resistance: The growing threat and potential solutions. *Asian Journal of Pharmaceutical and Pharmaceutical Sciences*, 10(1), 45–60. <https://ajpps.org/antibiotic-resistance-the-growing-threats-and-potential-solutions/>
5. Algadi, H., Alhoot, M. A., Al-Maleki, A. R., etPurwitasari, N. (2024). *Effects of metal and metal oxide nanoparticles against biofilm-forming bacteria: A systematic review*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 1748–1756. <https://doi.org/10.4014/jmb.2403.03029>
6. Aminzai, M. T., Yildirim, M., etYabalak, E. (2024). Metallic nanoparticles unveiled: Synthesis, characterization, and applications. *Talanta*, 280, 126790. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2024.126790>
7. Appiah, T., Boakye, Y. D., etAgyare, C. (2017). Antimicrobial activities and time-kill kinetics of extracts of selected Ghanaian mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 4534350. <https://doi.org/10.1155/2017/4534350>
8. Arya, G., Kumari, R. M., Sharma, N., et Gupta, N. (2023). Potential antimicrobial and antibiofilm properties of copper oxide nanoparticles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 195(4), 2345–2363. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04120-2>
9. Azam, A., Ahmed, A. S., Oves, M., Khan, M. S., Habib, S. S., etMemic, A. (2012). Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A comparative study. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 6003–6009. <https://doi.org/10.2147/IJN.S35347>
10. Badra, B., et al. (2022). Antimicrobial, antibiofilm, and probiofilm effects of gallic acid. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 11(6). file:///C:/Users/TRISTAR/Downloads/officejmbfs,+jmbfs_1781_Boubakeur.pdf
11. Ball, A. L., et al. (2022). Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms. *Microbial Pathogenesis*, 167, 105554. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105554>
12. Balouiri, M., Sadiki, M., etIbnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
13. Bei, Z., Ye, L., Tong, Q., Yang, T., He, X., Chu, B., et Qian, Z. (2026). *Tannic acid as a bioactive polyphenol for hydrogel engineering in wound healing*. *CollagenetLeather*, 8(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s42825-025-00227-4>

14. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., et Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of phenolic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265. <https://doi.org/10.1089/mdr.2012.0244>
15. Borges, A., Saavedra, M. J., et Simões, M. (2012). The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention. *Biofouling*, 28(7), 755–767. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.706751>
16. Castro-Valenzuela, B. E., et al. (2024). Antibacterial efficacy of nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1376669. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1376669>
17. CheLah, N. A., et al. (2022). Physical and optical studies of tannic acid functionalized copper oxide nanostructures. *Scientific Reports*, 12, 14281. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14281-z>
18. Cheung, G. Y. C., et al. (2023). Pathogenicity and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1187654. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1187654>
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2025). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M100)*, 35th ed. CLSI.
20. Cometta, S., et al. (2024). Physicochemical and antimicrobial properties of tannic acid-based systems. *Journal of Materials Research and Technology*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452199X2400361X>
21. Costerton, J. W., Stewart, P. S., et Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
22. Crémet, L., et al. (2013). Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.019>
23. Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.007>
24. Dikshit, P. K., et al. (2021). Green synthesis of metallic nanoparticles: Applications and limitations. *Catalysts*, 11(8), 902. <https://doi.org/10.3390/catal11080902>
25. Dong, G., et al. (2018). Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Natural Product Research*, 32(18), 2225–2228. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1366485>
26. Dupont, C. L., Grass, G., et Rensing, C. (2011). Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—New insights and applications. *Metallomics*, 3(11), 1109–1118. <https://doi.org/10.1039/C1MT00107H>

27. Ejima, H., Richardson, J. J., Liang, K., Best, J. P., van Koeverden, M. P., Such, G. K., Cui, J., & Caruso, F. (2013). One-step assembly of coordination complexes for versatile film and particle engineering. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6142), 154–157. <https://doi.org/10.1126/science.1237265>
28. Elkhalfa, M. E. M., et al. (2024). Polyphenols and nanoformulations as antibiofilm agents. *Future Microbiology*, *19*(3), 255–279. <https://doi.org/10.2217/fmb-2023-0175>
29. Fisher Scientific. (n.d.). Acidegallique. <https://www.fishersci.fr>
30. Freeman, D. J., Falkiner, F. R., et Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production. *Journal of Clinical Pathology*, *42*(8), 872–874. <https://doi.org/10.1136/jcp.42.8.872>
31. Friedman, M. (2014). Antibacterial, antiviral, and antifungal properties of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(26), 6025–6042. <https://doi.org/10.1021/jf501266s>
32. Gauba, A., et Rahman, K. M. (2023). Evaluation of antibiotic resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Antibiotics*, *12*(11), 1590. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12111590>
33. Geioushy, R. A., et al. (2024). Hybrid nanoparticles antibacterial activity. *Scientific Reports*, *14*, 29722. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-79265-7>
34. Grass, G., Rensing, C., & Solioz, M. (2011). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*(5), 1541–1547. <https://doi.org/10.1128/AEM.02766-10>
35. Grass, G., Rensing, C., etSolioz, M. (2011). Metal-based antibacterial strategies. *Nature Reviews Microbiology*, *9*(12), 873–885. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2532>
36. Habibah, F. F., Rizki, W. O. S., Ivansyah, A. L., Astuti, D. I., etHertadi, R. (2024). Green synthesis of copper ions nanoparticles functionalized with rhamnolipid as potential antibacterial agent for pathogenic bacteria. *Heliyon*, *10*(1), e24242. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e24242>
37. Hadidi, M., et al. (2024). Therapeutic and food applications of gallic acid. *Antioxidants*, *13*(8), 1001. <https://doi.org/10.3390/antiox13081001>
38. Hao, Y., et al. (2024). Zinc oxidenanoparticlesantibacterialactivity. *Biomedical Reports*, *21*(5), 161. <https://doi.org/10.3892/br.2024.1856>
39. Harrison, J. J., Ceri, H., et Turner, R. J. (2004). Biofilm susceptibility to metal toxicity. *EnvironmentalMicrobiology*, *6*(12), 1220–1227. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00656.x>
40. Hemeg, H. A. (2017). Nanomaterials for antibacterial therapy. *International Journal of Nanomedicine*, *12*, 8211–8225. <https://doi.org/10.2147/IJN.S132163>
41. Ho, C. S., et al. (2025). Antimicrobialresistance: A concise update. *The Lancet Microbe*, *6*(1), 100947. <https://doi.org/10.1016/j.lanmic.2024.07.010>
42. Hossain, M. A. (2024). Antimicrobial susceptibility testing. *Microbial Pathogenesis*, *186*, 106514. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.106514>
43. Hossain, T. J. (2024). Methods for screening antimicrobial activity: A review. *European Journal of Microbiology and Immunology*, *14*(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>

44. Huo, D., et Liu, W. (2022). *Controlled synthesis of Cu₂ Onanorods in aqueous solution using gallic acid as both reductant and crystal growth modifier*. *Catalysis Communications*, 170, 106494. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2022.106494>
45. Huo, D., et Liu, W. (2022). Copper nanoparticles synthesis using gallic acid. *Colloids and Surfaces A*, 641, 128549. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128549>
46. Iravani, S. (2011). Green synthesis of metal nanoparticles using plants. *Green Chemistry*, 13(10), 2638–2650. <https://doi.org/10.1039/C1GC15386B>
47. Jamkhande, P. G., et al. (2019). Metal nanoparticles synthesis overview. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53, 101174. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
48. Jiang, H., et al. (2024). Metalnanoparticlesantibacterialmechanisms. *BiomedicalMicrodevices*, 26, 12. <https://doi.org/10.1007/s10544-023-00686-8>
49. Joshi, A. A., etPatil, R. H. (2023). Metalnanoparticles vs *Staphylococcus aureus*. *InfectiousMedicine*, 2(4), 294–307. <https://doi.org/10.1016/j.imj.2023.09.004>
50. Joudeh, N., etLinke, D. (2022). Nanoparticle classification review. *Journal of Nanobiotechnology*, 20, 262. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
51. Karnwal, A., et al. (2025). Antimicrobial resistance strategies. *Frontiers in Microbiology*, 16, 1517772. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1517772>
52. Karypidis, M., et al. (2023). Antimicrobial textiles. *Coatings*, 13(4), 693. <https://doi.org/10.3390/coatings13040693>
53. Katzung, B. G., & Vanderah, T. W. (2024). *Katzung's Basic & Clinical Pharmacology* (16th ed.). McGraw Hill. AccessMedicine (McGraw Hill)<https://accessmedicine.mhmedical.com/book.aspx?bookid=3382&isMissingChapter=true#281742313>
54. Khosravi, Z., et al. (2024). Tannic acid metal coordination adhesive. *Carbohydrate Polymers*.<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0144861724001991>
55. Koščák, L., et al. (2023). Essential oilsantimicrobialeffects. *Microorganisms*, 11(11), 2735. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112735>
56. Kumar, V., et al. (2019). Nanoparticletoxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 908–931. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>
57. Laxminarayan, R., et al. (2023). Global antimicrobial resistance burden. *PLOS Medicine*, 20(2), e1004100. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004100>
58. Lemire, J. A., Harrison, J. J., et Turner, R. J. (2013). Antimicrobial activity of metals: Mechanisms, molecular targets and applications. *Nature ReviewsMicrobiology*, 11(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3028>
59. Li, J., et al. (2021). Copper–tannic acid nanomaterials antimicrobial applications. *ACS Applied Materials et Interfaces*. <https://doi.org/10.1021/acsami.0c22321>
60. Liu, F., Liu, X., Chen, F., et Fu, Q. (2021). *Tannic acid: A green and efficient stabilizer of Au, Ag, Cu and Pd nanoparticles for the 4-nitrophenol reduction, Suzuki–Miyaura coupling reactions and click reactions in aqueous solution*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 604, 281–291. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.07.015>
61. Liu, M., et al. (2017). Gallic acid anti-biofilm mechanism. *Food Control*, 73, 613–618. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.09.015>

62. Lungu, I. I., et al. (2026). Green-synthesized copper nanoparticles. *Antioxidants*, 15(3), 339. <https://doi.org/10.3390/antiox15030339>
63. McKie, J. E., Seo, J., & Arvesen, J. N. (1980). Rapid determination of minimum inhibitory concentrations of antimicrobial agents by regression analysis of light scattering data. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 17(5), 813–823. <https://doi.org/10.1128/AAC.17.5.813>
64. Miao, Y., et al. (2024). Tannic acid inhibition of MRSA biofilm. *Frontiers in Pharmacology*, 15, 1413669. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1413669>
65. Mittal, A. K., et al. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnology Advances*, 31(2), 346–356. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.01.003>
66. Moreno, X., et al. (2023). Biofilm formation assessment methods. *Biomédica*, 43(Suppl 1), 77–88. <https://doi.org/10.7705/biomedica.6732>
67. Mourdikoudis, S., et al. (2018). Nanoparticle characterization. *Nanoscale*, 10, 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>
68. Mueller, M., de la Peña, A., & Derendorf, H. (2004). *Issues in pharmacokinetics and pharmacodynamics of anti-infective agents: Kill curves versus MIC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 369–377. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.369-377.2004>
69. Narayanan, K. B., et Sakhivel, N. (2010). Biological synthesis of nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 156, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001>
70. NCBI. (2026). PubChem: tannic acid. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
71. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
72. Nikaido, H. (2003). Outer membrane permeability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>
73. Nowacka, M., et al. (2024). Antimicrobial activity evaluation. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1456358. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1456358>
74. Pankey, G. A., et Sabath, L. D. (2004). Bacteriostatic vs bactericidal activity. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>
75. Patel, P., et al. (2023). Antibiotics. *StatPearls*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/>
76. Pelgrift, R. Y., et Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology against resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1803–1815. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>
77. Prestinaci, F., et al. (2023). Antibiotic resistance overview. *Pathogens and Global Health*, 117(2), 67–82. <https://doi.org/10.1080/20477724.2023.2170345>
78. Radulescu, D. M., Surdu, V. A., Fikai, A., Fikai, D., Grumezescu, A. M., et Andronescu, E. (2023). Green Synthesis of Metal and Metal Oxide Nanoparticles: A Review of the Principles and Biomedical Applications. *International journal of molecular sciences*, 24(20), 15397. <https://doi.org/10.3390/ijms242015397>
79. Ramos-Zúñiga, J., Bruna, N., et Pérez-Donoso, J. M. (2023). *Toxicity mechanisms of copper nanoparticles and copper surfaces on bacterial cells and viruses*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10503. <https://doi.org/10.3390/ijms241310503>

80. Ren, Z., Zhang, Y., Liu, Y., et Wang, G. (2025). In situ Antibiotic-Loaded Copper Tannic Acid Coordination Nanospheres Targeting Biofilms for the Treatment of Chronic Osteomyelitis. *International journal of nanomedicine*, 20, 13641–13659. <https://doi.org/10.2147/IJN.S548765>
81. Rezić, I., et Meštrović, E. (2023). Antimicrobial coatings. *Coatings*, 13(11), 1830. <https://doi.org/10.3390/coatings13111830>
82. Rodríguez-Melcón, C., et al. (2021). MIC and MBC methods. *Biology*, 11(1), 46. <https://doi.org/10.3390/biology11010046>
83. Sabath, L. D. (1976). *The assay of antimicrobial compounds*. *Human Pathology*, 7(3), 287–295. [https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(76\)80039-1](https://doi.org/10.1016/S0046-8177(76)80039-1)
84. Santos, S. A. O., et al. (2020). Gallic acid toxicity study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 79, 103419. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103419>
85. Scalbert, A., et Williamson, G. (2000). Polyphenols bioavailability. *The Journal of Nutrition*, 130(8), 2073S–2085S. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10917926/>
86. Shahidi, F., et Yeo, J. (2018). *Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6), 1573. <https://doi.org/10.3390/ijms19061573>
87. Shehabeldine, A. M., et al. (2023). Copper oxide nanoparticles antibiofilm activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04120-2>
88. Stepanović, S., et al. (2007). Biofilm quantification methods. *APMIS*, 115(8), 891–899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
89. Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). *A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation*. *Journal of Microbiological Methods*, 40(2), 175–179. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
90. Tanwar, S. N., et al. (2024). Antibiofilm nanoparticles. *Luminescence*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39223925/>
91. Tarannum, N., Pooja, K., Singh, A., Jain, P., Raghav, S., et Lahari, V. (2025). *The evolution of antimicrobial fabrics: Nanoparticles as key agents in textiles innovation*. *Journal of Industrial Textiles*, 54(4), 1–25. <https://doi.org/10.1177/15280837251322535>
92. Turu, D., et Canli, K. (2025). Biofilm detection methods. *Gazi University Journal of Science*, 38(4), 1663–1684. <https://doi.org/10.35378/gujs.1670270>
93. Ventola, C. L. (2024). Antibiotic resistance crisis. *PetT*, 49(11), 659–663.
94. Vrinceanu, N., et al. (2022). Nanoparticle textile coatings. *Textile Research Journal*. <https://doi.org/10.1177/00405175211070613>
95. Wahab, S., et al. (2023). Metallic nanoparticles vs resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(19), 14897. <https://doi.org/10.3390/ijms241914897>
96. Wang, B., Pham, L. B., et Adhikari, B. (2024). *Complexation and conjugation between phenolic compounds and proteins: mechanisms, characterisation and applications as novel encapsulants*. *Sustainable Food Technology*, 2, 1206–1227. <https://doi.org/10.1039/D4FB00013G>

97. Wang, L., et al. (2017). Nanoparticles antimicrobial activity. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227–1249. <https://doi.org/10.2147/IJN.S121956>
98. Wang, W. B., et Clapper, J. C. (2022). Copper nanoparticles nanofibers. *Nanomaterials*, 12(13), 2139. <https://doi.org/10.3390/nano12132139>
99. Warnes, S. L., et al. (2012). Copper surface toxicity. *Environmental Microbiology*, 14(7), 1730–1743. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02677.x>
100. Weber, D. J., et Rutala, W. A. (2013). *Self-disinfecting surfaces: Review of current methodologies and future prospects*. American Journal of Infection Control, 41(5 Suppl), S31–S35. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.005>
101. Wianowska, D., et Olszowy-Tomczyk, M. (2023). Gallic acid profile. *Molecules*, 28(3), 1186. <https://doi.org/10.3390/molecules28031186>
102. Xu, Z., et al. (2016). Crystal violet assay biofilms. *Current Microbiology*, 73(4), 474–482. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1081-1>
103. Zhang, X., et al. (2024). Nanocomposites vs *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials*, 475, 135123. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.135123>
104. Zhang, X.-F., et al. (2016). Silver nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. <https://doi.org/10.3390/ijms17091534>
105. Zhao, J., et al. (2017). Tannic acid–copper interaction. *Water Research*, 127, 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.006>

Annexe

Milieux de cultures

1. Mueller-Hinton Broth (MH bouillon)

Le Mueller-Hinton Broth est un milieu nutritif liquide largement utilisé pour la culture bactérienne et les tests d'activité antibactérienne. Il favorise une bonne croissance des bactéries non exigeantes telles que *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*.

- Composition générale (pour 1 L)

Extrait de bœuf : 2 g

Hydrolysate acide de caséine : 17.5 g

Amidon : 1.5 g

Eau distillée : 1000 mL

2. Gélose Rouge Congo (Congo Red Agar)

La gélose Rouge Congo est utilisée pour l'évaluation qualitative de la production de biofilm chez les bactéries. Les souches productrices de biofilm forment généralement des colonies noires ou foncées, tandis que les souches non productrices présentent des colonies rouges ou rosées.

- Composition générale (pour 1 L)

Brain Heart Infusion agar : 37 g

Saccharose : 50 g

Rouge Congo : 0.8 g

Eau distillée : 1000 mL

3. TrypticSoyBroth (TSB)

Le TrypticSoyBroth est un milieu liquide riche utilisé pour la croissance bactérienne et la formation de biofilm.

- Composition générale (pour 1 L)

Digest pancréatique de caséine : 17 g

Digest papaique de farine de soja : 3 g

Chlorure de sodium : 5 g

Phosphate dipotassique : 2.5 g

Glucose : 2.5 g

Eau distillée : 1000 mL

4. Eau physiologique

L'eau physiologique (solution saline stérile) est utilisée pour la dilution bactérienne et la préparation des suspensions microbiennes.

- Composition

Chlorure de sodium (NaCl) : 9 g

Eau distillée : 1000 mL

