

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة 8 ماي 1945 قالمة
Université 8 Mai 1945 Guelma
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie
Filière : Biologie
Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée
Département : Écologie et Génie de l'Environnement

Thème

**Effet d'un flavonoïde extrait d'une plante médicinale
sur la formation de biofilm chez *Escherichia coli***

Présenté par :

- MAAMRIA Ouiame
- MOUHOUB Aya
- TOUBI Lidya

Devant le jury :

Dr. ZEB SA R.
Dr. AMRI S.
Dr. BENHALIMA L.

Président
Examinatrice
Promotrice

Université de Guelma
Université de Guelma
Université de Guelma

Année universitaire 2022/2023

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier ALLAH, le Tout puissant, qui nous a donné la force et la patience d'accomplir ce modeste travail.

Nous remercions particulièrement les membres de jury qui ont bien voulu consacré une partie de leur temps à juger ce travail :

*Nos sincères remerciements vont à **Mr. ZEBBA R.**, Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.*

*Nous remercions également **Mme. AMRI S.**, Docteur à l'Université de Guelma, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier, très sincèrement, **Dr. BENHALIMA L.**, pour son dévouement, nous avons l'honneur et la chance de bénéficier de ses connaissances et compétences, de ses précieux conseils et de son suivi tout au long de cette recherche. Son sens élevé du devoir, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique impose l'estime et le respect.*

Nous réservons une pensée spéciale à tous les enseignants qui ont su nous donner des informations didactiques et appréciables tout au long de notre cursus.

Enfin, autant des phrases d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer notre gratitude à nos familles qui nous ont éclairé le chemin par leurs patiences et leurs amours infinies ainsi que leurs soutiens sans faille tout au long de notre parcours de vie.

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Symboles et abréviations	
Introduction	01
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
I. Flavonoïdes	03
I.1. Définition	03
I.2. Classification des flavonoïdes	03
I.3. Biosynthèse et plantes médicinales riches en flavonoïdes	05
I.4. Extraction et dosage des flavonoïdes	06
I.5. Hespéridine et propriétés pharmacologiques	07
I.5.1. Définition	07
I.5.2. Propriétés pharmacologiques	08
II. Biofilm	09
II.1. Définition	09
II.2. Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien	09
II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm	11
II.4. <i>Escherichia coli</i> et formation du biofilm	12
II.4.1. Classification et caractères généraux	12
II.4.2. Résistance aux agents antibactériens	13
II.4.3. Formation de biofilm par <i>Escherichia coli</i>	14
II.5. Stratégies anti-biofilm	15
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel biologique	17

I.1. Choix et origine des souches bactériennes	17
I.2. Vérification de la pureté	17
I.2.1. Revivification	18
I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique	18
II. Étude de l'effet d'un flavonoïde naturel sur la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i>	18
II.1. Obtention de l'héspéridine	19
II.2. Préparation de la solution mère et les concentrations filles de l'héspéridine	19
II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI	20
II.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB	20
II.5. Préparation des cultures bactériennes	20
II.6. Activité anti-adhérence/ Essai d'adhésion	21
II.7. Essai de la formation de biofilm	21
III. Analyse statistique	22

Chapitre III : Résultats et Discussion

I. Caractérisation phénotypique et vérification de la pureté des souches bactériennes	24
II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'héspéridine vis-à-vis des souches d' <i>Escherichia coli</i>	25
III. Activité anti-adhérence de l'héspéridine	27
IV. Étude de l'effet de l'héspéridine sur la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i>	28
IV.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce	28
IV.2. Capacité de formation de biofilm mixte	30
Conclusion et perspectives	37
Références bibliographiques	38
Annexe	48

Résumé

La présente étude a pour objectif la détermination de l'effet de l'héspéridine sur la capacité de l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*) à former un biofilm. Cette capacité, de 04 souches obtenues à partir d'un milieu hospitalier, a été détectée par le test d'adhésion en microplaque par coloration au cristal violet. Huit concentrations d'héspéridine allant de 50 à 6400 µg/ml ont été testées sous l'influence de deux températures (ambiante et 37 °C). La formation de biofilm en mono-espèce et mixte (*E. coli* EC – *Klebsiella oxytoca* KO) a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que l'action de l'héspéridine sur les souches d'*E. coli* est bactériostatique avec une CMI de 800 µg/ml et que ce flavonoïde n'a montré qu'un faible pouvoir anti-biofilm vis-à-vis de ces souches en mono- et en double-espèces. Globalement, se pourvoir a été observé après des longues durées et avec différentes concentrations (AV1, $p < 0,05$). Les mono-souches ont marqué une forte production du biofilm dans les deux températures après 1 à 16 jours alors qu'une faible adhésion après 21 jours a été enregistrée. Des densités optiques importantes ($0,6 \pm 0,03$; $0,71 \pm 0,003$) ont été enregistrés par les souches EC3 et EC4 vis-à-vis de 2CMI et de la CMI d'héspéridine. Pour les biofilms mixtes, l'héspéridine a un effet anti-biofilm important à une température ambiante sur le couple EC1-KO1 et EC2-KO2 ($0,14 < DO < 0,3$) (T de Student, $p < 0,05$). En revanche, les couples EC3-KO3 et EC4-KO4 ont montré une hyper formation de biofilm durant la majorité du temps de contact même avec les fortes concentrations d'héspéridine. La capacité de formation de biofilm par l'espèce *E. coli* permet de conclure que l'héspéridine ne peut pas être considéré comme un meilleur agent anti-biofilm.

Mots clés : Activité anti-biofilm, héspéridine, *Escherichia coli*, biofilm mono-espèce, biofilm mixte.

The aim of the present study was to determine the effect of hesperidin on the ability of *Escherichia coli* (*E. coli*) species to form a biofilm. This ability of 04 strains obtained from a hospital environment, was detected by the microplate adhesion test using crystal violet staining. Eight concentrations ranging from 50 to 6400 µg/ml were tested under the influence of two temperatures (ambient and 37°C). Single-species and mixed biofilm (*E. coli* EC - *Klebsiella oxytoca* KO) formation was evaluated. The results obtained show that the action of hesperidin on *E. coli* strains is bacteriostatic with a MIC of 800 µg/ml and it showed only a weak anti-biofilm power towards these strains in mono- and double-species. Overall, this was observed after long durations and with different concentrations (AV1, $p < 0.05$). Mono-strains marked a high biofilm production in both temperatures after 1 to 16 days while a low adhesion after 21 days was recorded. Significant optical densities (0.6 ± 0.03 ; 0.71 ± 0.003) were recorded by strains EC3 and EC4 against to 2 MIC and MIC of hesperidin. For mixed biofilms, hesperidin has a significant anti-biofilm effect at room temperature on the EC1-KO1 and EC2-KO2 couples ($0.14 < OD < 0.3$) (Student's T-test, $p < 0.05$). In contrast, the EC3-KO3 and EC4-KO4 couples showed hyper biofilm formation during the majority of contact time even with the high concentrations of hesperidin. The ability of biofilm formation by *E. coli* species allows us to conclude that hesperidin cannot be considered as a better anti-biofilm agent.

Keywords: Anti-biofilm activity, hesperidin, *Escherichia coli*, single species biofilm, mixed biofilm.

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير الهسبيريدين على قدرة سلالة الإشريكية القولونية (*E. coli*) على تكوين غشاء حيوي. هذه القدرة تم الكشف عنها عند 04 سلالات متحصل عليها من بيئة مستشفى من خلال إختبار إلتصاق الصفائح الدقيقة بإستخدام التلوين بالبنفسج البلوري. تم إختبار ثمانية تراكيز من الهسبيريدين تتراوح من 50 إلى 6400 ميكروغرام / مل تحت تأثير درجتي حرارة (درجة حرارة الغرفة و 37 درجة مئوية). حيث قمنا بتقييم تكوين الأغشية الحيوية أحادية النوع والمختلطة (*E. coli* EC - *Klebsiella oxytoca* KO). أظهرت النتائج أن للهسبيريدين تأثير مثبط على سلالات الإشريكية القولونية بتركيز أدنى قيمته 800 ميكروغرام /مل وأن هذا الفلافونويد قد أظهر قوة ضعيفة كمضاد للغشاء الحيوي لهذه السلالات الأحادية والمزدوجة. إجمالاً، لوحظت هذه القدرة بعد فترات طويلة وبتراكيز مختلفة ($p < 0,05$ ، AV1). تميزت السلالات الأحادية بإنتاجية مرتفعة للأغشية الحيوية عند كلتا درجتي الحرارة بعد 1 الى 16 يوماً في حين سجلت نسبة إلتصاق منخفضة بعد 21 يوم. تم تسجيل كثافات ضوئية كبيرة، ($0,6 \pm 0,03$; $0,71 \pm 0,003$) بواسطة السلالات EC3 و EC4 مقابل 2CMI و CMI للهسبيريدين. بالنسبة للأغشية الحيوية المختلطة، كان للهسبيريدين تأثير كبير كمضاد لهذه الأغشية الحيوية في درجة حرارة الغرفة على الزوجين EC1-KO1 و EC2-KO2 ($0,14 < OD < 0,3$) (T de Student, $p < 0,05$). من ناحية أخرى، أظهرت الأزواج EC3-KO3 و EC4-KO4 تكوين فائق للأغشية الحيوية خلال معظم أوقات التلامس حتى مع تراكيز عالية من الهسبيريدين. إن قدرة أنواع الإشريكية القولونية على تكوين الأغشية الحيوية تؤدي إلى إستنتاج مفاده أنه لا يمكن إعتبار الهسبيريدين أفضل عامل مضاد للغشاء الحيوي.

الكلمات المفتاحية: النشاط المضاد للغشاء الحيوي، الهسبيريدين، الإشريكية القولونية، الأغشية الحيوية أحادية النوع، الأغشية الحيوية المختلطة.

Figure	Titre	Page
Figure 1	Structure générale des flavonoïdes	03
Figure 2	Structure chimique des sous-classes de flavonoïdes	04
Figure 3	Biosynthèse des flavonoïdes	05
Figure 4	Structure chimique de l'hespéridine	07
Figure 5	Étapes du développement d'un biofilm bactérien	10
Figure 6	Étude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress de l'hespéridine	23
Figure 7	Les résultats de l'isolement et des différents tests d'identification de la souche <i>Escherichia coli</i> EC1	24
Figure 8	Capacité de formation de biofilm chez des souches d' <i>Escherichia coli</i> à une température ambiante et en présence d'hespéridine	29
Figure 9	Capacité de formation de biofilm chez des souches d' <i>Escherichia coli</i> à la température 37°C et en présence d'hespéridine	30
Figure 10	Capacité de formation de biofilm mixte (<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella oxytoca</i>) à une température ambiante et en présence d'hespéridine	31
Figure 11	Capacité de formation de biofilm mixte (<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella oxytoca</i>) à la température 37°C et en présence d'hespéridine	32

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Exemples des molécules appartenant à chaque sous classe de flavonoïdes	04
Tableau 2	Principales plantes médicinales riches en flavonoïdes	06
Tableau 3	Propriétés pharmacologiques de l'hésperidine	08
Tableau 4	Stratégies anti-biofilm et les mécasimes correspondants	15
Tableau 5	Origine des souches d' <i>Escherichia coli</i> à étudier	17
Tableau 6	Identification des souches bactériennes à étudier	24
Tableau 7	Activité antibactérienne de l'hésperidine	25
Tableau 8	Taux d'adhérence des souches d' <i>Escherichia coli</i> en présence d'hésperidine (moyenne \pm ecartype)	27
Tableau 9	Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E	49
Tableau 10	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E	50

ADN : Acide DésoxyRibonucléique	FlhC et flhD : Flagellar transcriptional regulator
ANOVA : Analysis Of Variance	GN : Gélose Nutritive
API : Analytical Profile Index	H₂S : Sulfure d'Hydrogène
B-1,6-N-GlcNAc : B-1,6-N-Acétyl Glucosamine	HCl : Chlorure d'Hydrogène
Ca²⁺ : Calcium	HPLC : Chromatographie en Phase Liquide à Haute Performance
CAT : Catalase	IPEC : <i>Escherichia coli</i> Pathogène Intestinale
CMB : Concentration Minimale Bactéricide	KO : <i>Klebsiella oxytoca</i>
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice	LB : Milieu Luria Bertani
CoA : Coenzyme A	LPS : Lipopolysaccharides
CsgD : Curlin subunit gene D	M9 : Minimal Medium
dgcC : diguanylate cyclase	MEC : Matrice Extracellulaire
DMSO : DiméthylSulfoxide	MNEC : Méningite Néonatale
DO : Densité Optique	NR : Nitrate Réductase
E.coli : <i>Escherichia coli</i>	OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ECAD : <i>Escherichia coli</i> à Adhésion Diffuse	ONPG : 1' Orthonitrophényl - bêta- D-galactoside
ECEAg : <i>Escherichia coli</i> Entéro-Agrégative	OX : Oxydase
ECEH : <i>Escherichia coli</i> Entéro-Hémorragique	P : Probabilité
ECEI : <i>Escherichia coli</i> Entéro- Invasive	PBS : Phosphate -Buffered Saline
ECEP : <i>Escherichia coli</i> Entéro-Pathogène	Pfs : Polyadenylation factor subunit homolog
ECET : <i>Escherichia coli</i> Entéro-Toxinogène	QS : Quorum Sensing
EPS : Substances Polymériques Extracellulaires	RpoS : RNA polymerase Sigma factor
ExPEC : <i>Escherichia coli</i> Pathogène Extra- Intestinale	TB : Bouillon Terrific
	TSB : Bouillon Tryptone Soja
	UPEC : <i>Escherichia coli</i> Uropathogène

Introduction

Les micro-organismes peuvent coloniser pratiquement tous les environnements présentant généralement des conditions physico-chimiques distinctes. Du fait, ils ont appris à vivre ensemble dans une communauté organisée et bien orchestrée, le "biofilm" intégré dans une matrice extracellulaire autoproduite, la protection et la tolérance et/ou la résistance sont les aspects les plus bénéfiques de cet assemblage actif **(Santos et al., 2018)**. À ce jour, la formation de biofilm représente un problème majeur pour la santé publique rencontré dans plusieurs domaines en particulier l'environnement hospitalier **(Aifa et al., 2023)**. Parmi plusieurs microorganismes, *Escherichia coli* est un modèle type de la formation des biofilms à cause de ses divers appendices de surface cellulaires tels que les flagelles, les fimbriae de type I et les curli impliqués dans les premières étapes de l'adhésion tandis que la production d'une matrice riche en polysaccharides et de courtes adhésines participent à la maturation d'un biofilm très difficile à éliminer **(Da Re et al., 2007)**.

Durant la crise mondiale récente et l'inefficacité éventuelle de l'antibiothérapie, un grand besoin de nouveaux agents antimicrobiens a été apparu. De ce fait, plusieurs bases de données ont été consultées utilisant le mot clé flavonoïdes de bons candidats à cet égard **(Martinez et Campos, 2023 ; Sarbu et al., 2019)**. Les flavonoïdes sont des phyto-nutriments très répandus, souvent utilisés pour la prévention et le traitement de diverses maladies, présentant de fortes propriétés antimicrobiennes contre la microflore intestinale pathogène notamment l'héspéridine qui peut inhiber la croissance des bactéries ou d'agir sur la fonction de la membrane cytoplasmique en influençant la formation de biofilms **(Pyrzynska, 2022 ; Adamczak et al., 2020)**.

Plusieurs études ont confirmé l'activité antibiofilm des flavonoïdes, ces derniers ont permis de contrôler la formation et de réduire les biofilms de plusieurs souches d'*E. coli* parmi lesquelles *O157:H7* en inhibant la production de fimbriae, nécessaire à la formation du biofilm sans affecter la croissance des cellules planctoniques. Plus important encore, les flavonoïdes n'ont montré aucune activité inhibitrice contre le biofilm commensal d'*E. coli*. Ceci est particulièrement avantageux pour un agent antibiofilm potentiel car il doit inhiber sélectivement les souches pathogènes sans anéantir la flore commensale **(Rabin et al., 2015)**.

Actuellement, les pathotypes d'*E. coli* constituent un défi mondial pour la santé publique non en raison de leur pathogénicité mais de leur multi-résistance aux agents antibactériens (**Qian et al., 2022**). Cette résistance est mille fois intensifiée par la formation du biofilm due aux plusieurs mécanismes y compris la pénétration limitée, la croissance lente, l'expression de gènes impliqués en réponse au stress et l'émergence d'un phénotype spécifique au biofilm ce qui souligné la nécessité urgente de rechercher des sources alternatives des agents antibactériens et anti-biofilms efficaces (**Ribeiro et al., 2016 ; Borges et al., 2015 ; Ito et al., 2009**).

Dans la présente étude, nous avons évalué l'activité antibiofilm de l'hespéridine, un flavonoïde extrait d'une plante médicinale, en fonction de la température et de la durée vis-à-vis d'*Escherichia coli* isolée d'un milieu hospitalier.

Par conséquent, nous nous sommes fixés trois objectifs majeurs :

- Évaluation de la capacité de l'espèce étudiée à former un biofilm *in vitro* ;
- Détermination de l'effet antibactérien d'un flavonoïde « l'hespéridine » vis-à-vis de l'espèce à étudier ;
- Évaluation de la capacité anti-biofilm de l'hespéridine.

Ce manuscrit s'organise autour de trois parties :

- La première partie constitue un état de l'art de notre sujet d'étude. Elle présente une généralité sur les flavonoïdes ainsi que l'hespéridine et ses effets pharmacologiques, les caractéristiques structurales et fonctionnelles des biofilms bactériens et les caractères généraux et la capacité de formation de biofilm chez l'espèce bactérienne à étudier ;
- La deuxième est entièrement consacrée à la description de la méthodologie utilisée ;
- La troisième partie englobe les résultats expérimentaux obtenus, suivie d'une discussion engendrée par ces résultats. Enfin, cette étude est clôturée par une conclusion et des perspectives proposées.

Partie I :
Synthèse
bibliographique

I. Flavonoïdes

I.1. Définition

Les flavonoïdes sont des composés polyphénoliques constituent les pigments colorés des plantes allant du jaune au rouge, conférant à ces organismes la multitude de couleurs qu'ils empruntent. Ils sont très répandus chez les végétaux et abondamment présents dans les fruits et les légumes, mais aussi dans les boissons (thé, café...). Différents types de flavonoïdes sont distingués en fonction des noyaux (Fig. 01) : flavones, flavonols, flavanones, flavanonols, flavanes, flavan-3-ols, flavylum, chalcones, aurones, isoflavones, isoflavonols, isoflavanes, pterocarpanes, coumaronochromones, 3-arylcoumarines, ect. Les flavonoïdes rentrent dans la composition de divers remèdes à base de plantes utilisés en médecine traditionnelle (Emeraux, 2019 ; Hadj Salem, 2009).

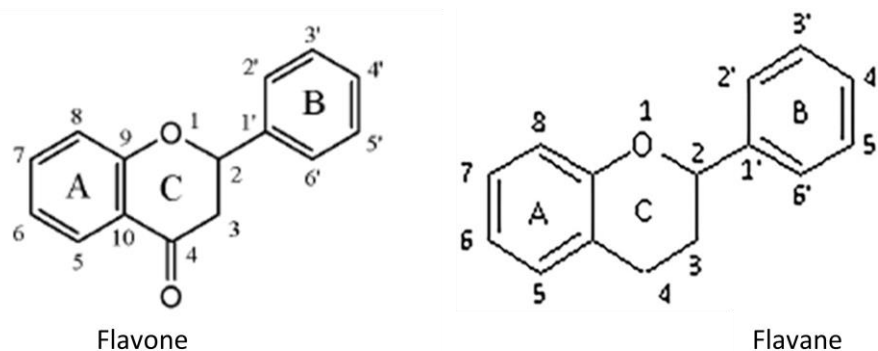


Figure 01: Structure générale des flavonoïdes (Koné, 2018).

I.2. Classification des flavonoïdes

Tous les flavonoïdes ont un squelette de base à quinze carbones (C6-C3-C6), comprenant deux cycles benzéniques à 6 carbones (cycle A et B) liée par un hétérocycle à 3 carbones (cycle C). Les flavonoïdes sont classés en six sous classes principales (Fig. 02). Les variations de structure au sein d'une même classe de composés se fait suivant à leur structure moléculaire. Elle se fait en fonction de :

- ✓ La position de la liaison entre les cycles B et C ;
- ✓ Le degré de saturation du cycle C ;
- ✓ Le degré d'oxydation et d'hydroxylation de l'hétérocycle centrale C (Emeraux, 2019).

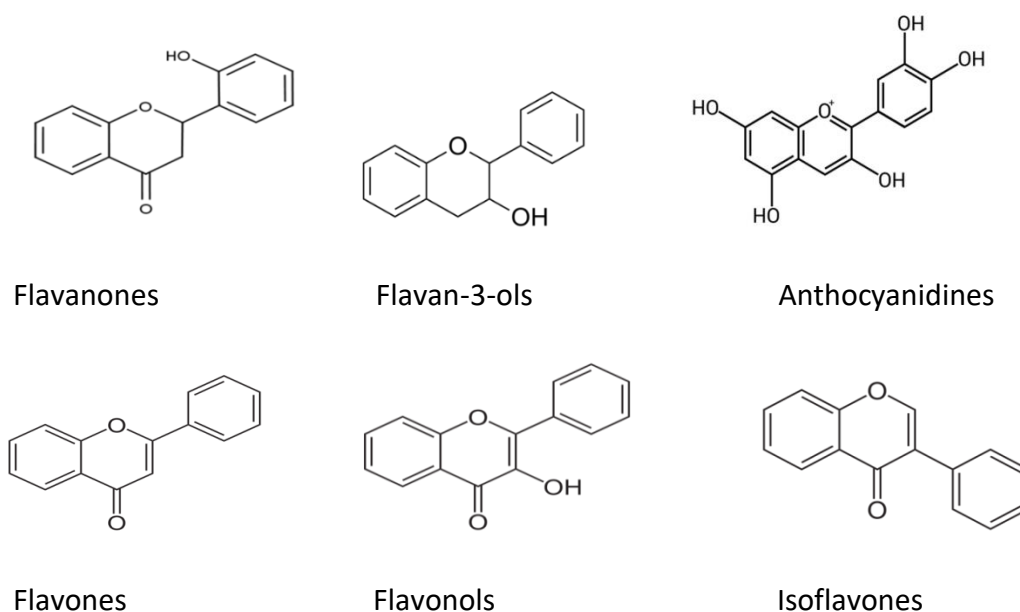


Figure 02: Structure chimique des sous-classes de flavonoïdes (Jacry, 2021).

Le tableau 01 résume d'une manière non exhaustive les molécules appartenant à chaque sous classe de flavonoïdes.

Tableau 01: Exemples des molécules appartenant à chaque sous classe de flavonoïdes (Dias *et al.*, 2021).

Sous classe de flavonoïdes	Molécules
Flavonols	Kaempferol, quercétine, myricétine, tamarixétine, isorhamanétine.
Flavones	Chryisine, apigénine, rutine, nobiletine et tangertine.
Flavanone	Naringine, naringénine, taxifoline et hespéridine.
Flavanol	Catéchine, épicatechine, épigallocatechin, glusan-3-épicatechine, proanthocyanidines .
Anthocyanidines	Apigénidine, cyanidine, delphinide, pélargonidine, malvidine, péonidine .
Isoflavone	Génisteine, daidzéine .

I.3. Biosynthèse et plantes médicinales riches en flavonoïdes

La biosynthèse des flavonoïdes fait appel à plusieurs enzymes (synthases, réductases, hydroxylase) qui contribuent à l'apparition des différentes classes de flavonoïdes. En se référant à la structure de base représentée par la figure 01, le cycle A est formé à partir de trois molécules de malonyl-coenzyme A (malonyl-CoA) provenant du métabolisme du glucose. Le cycle B et C proviennent eux aussi du métabolisme du glucose, mais par la voie de shikimate via la phénylalanine qui est convertie en p-coumaroyl-CoA (**Heller et forkmann, 1993**). Le p-coumaroyl-CoA et les 3 malonyl-CoA se condensent en une seule étape enzymatique pour former une chalcone, la 4,2',4',6'-tétrahydroxychalcone (réaction catalysée par la chalcone synthétase). Le cycle C se forme par cyclisation de la chalcone, réaction catalysée par la chalcone-isomérase qui induit une fermeture stéréospécifique du cycle conduisant à une seule 2(S)-flavanone : la naringénine. Ce cycle s'hydrate en suite pour former les différentes classes de flavonoïdes. Des étapes ultérieures principalement de glycosylation et acylation amènent les flavonoïdes à la forme définitive dans laquelle elles se trouvent *in vivo* (Fig. 03) (**Lhuillier, 2007 ; Marfak, 2003**).

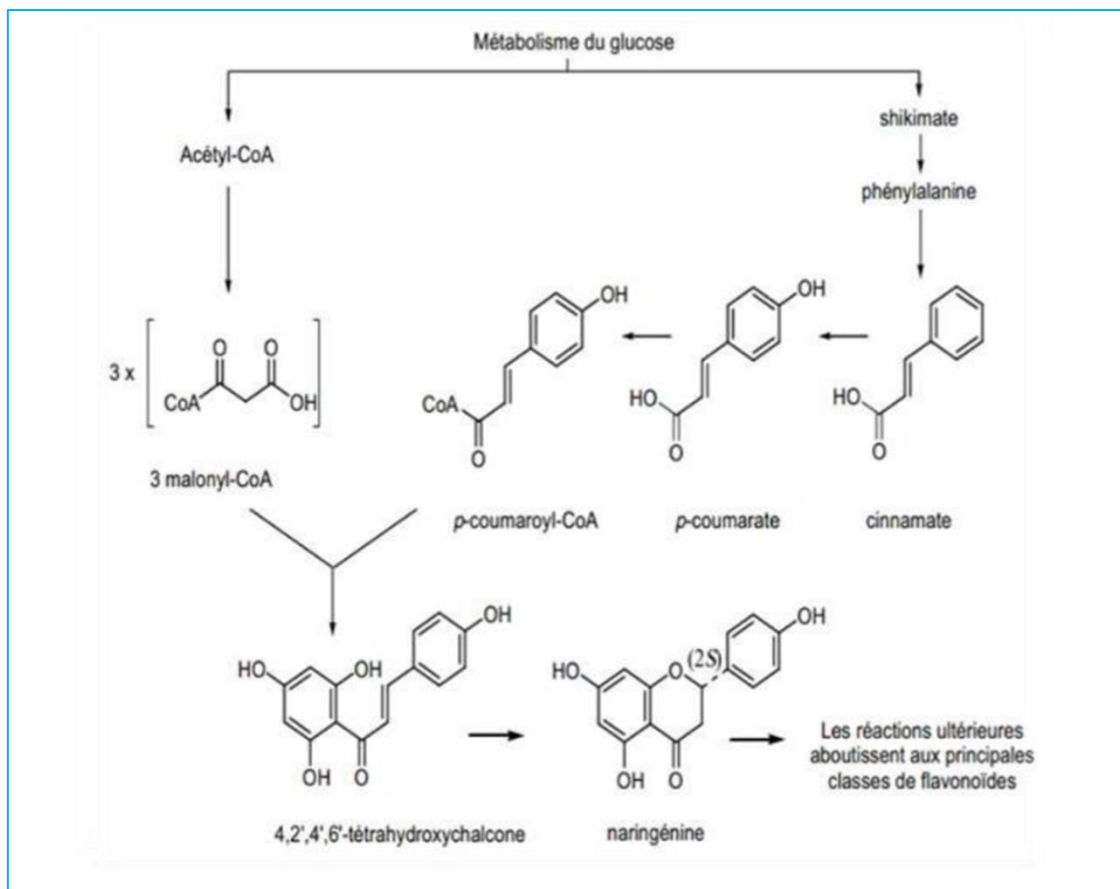


Figure 03: Biosynthèse des flavonoïdes (heller et forkmann, 1993).

Plusieurs plantes médicinales sont riches en flavonoïdes (Tab. 02), et leur teneur en flavonol et en flavone est fortement influencée par des facteurs tels que la variation du type de croissance, la saison, le climat et le degré de maturité (**Iugasi, 2003**).

Tableau 02 : Principales plantes médicinales riches en flavonoïdes.

Plante	Famille	Référence
<i>Aleo Vera</i> (Aloès vrai)	<i>Liliaceae</i>	Kelouili et bouchentouf (2018)
<i>Gleditsia triacanthos</i> (Févier d'Amérique)	<i>Fabaceae</i>	Saidi (2019)
<i>Scabiosa stellata</i> (Scabieuse étoilée)	<i>Dipsacaceae</i>	Mouffouk (2019)
<i>Artemisia herba alba asso</i> (Armoise blanche ou chih) <i>Artemisia absinthium L.</i> (Armoise absinthe)	<i>Asteraceae</i>	Mansour (2015)
<i>Scutellaria baicalensis</i> (Scutellaire de Baïkal) <i>Melissa officinalis L.</i> (Citronnelle) <i>Ocimum basilicum</i> (Basilic)	<i>Lamiaceae</i>	Wang et al. (2018) Youla et Latrous (2017) Purushothaman et al. (2018)
<i>Moricandia arvensis</i> (Morican die des champs)	<i>Brassicaceae</i>	Berreghioua (2016)
<i>Juniperus communis</i> (Genévrier)	<i>Cupressaceae</i>	Albrecht et Madisch (2022)
<i>Thapsia garganica</i> (Tapisia)	<i>Apiaceae</i>	Djerarda et al. (2022)

I.4. Extraction et dosage des flavonoïdes

L'extraction est un phénomène de transfert de masse où les solides solubles dans les structures végétales migrent dans un solvant d'extraction jusqu'à l'équilibre (**M'hiri, 2015**). Le principe utilisé pour l'extraction des flavonoïdes est basé sur le degré de solubilité des flavonoïdes dans les solvants organiques (eau, alcool, ect) signalant que certains ont des propriétés hydrosolubles extrêmement faibles (**Dias et al., 2021**).

Plusieurs méthodes d'extraction des flavonoïdes à partir des échantillons secs ou lyophilisés sont recommandées parmi lesquelles nous citons (**M'hiri, 2015**) :

- **Méthodes d'extraction conventionnelles** : telle que la macération, la décoction et l'infusion. Ces méthodes peuvent causer la dégradation des flavonoïdes par l'application de températures élevées et de longues durées d'extraction ;
- **Méthodes d'extraction innovantes** : comme l'extraction assistée par micro-ondes, par ultrasons et par solvant. Ces méthodes combinent l'extraction conventionnelle avec d'autres facteurs accélérant l'extraction tout en limitant la dégradation des composés.

Le dosage permet de déterminer la quantité de matière contenue dans un échantillon. Les méthodes classiques de dosage des flavonoïdes sont le plus souvent colorimétriques ou spectrophotométriques (**bruneton, 1999**). Aussi, l'HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance), est la plus puissante de toutes les techniques chromatographiques (**Koné, 2018**).

I.5. Hespéridine et propriétés pharmacologiques

I.5.1. Définition

Également appelé hespretin-7-O glucuronide (Fig. 04), appartient aux composés de flavanone, l'une des sous-classes de flavonoïdes (**Ramesh et al., 2021**). C'est un bioflavonoïde présent en fortes concentrations dans les agrumes (les oranges, les pamplemousses, les citrons...) (**Pyrzynska, 2022**).

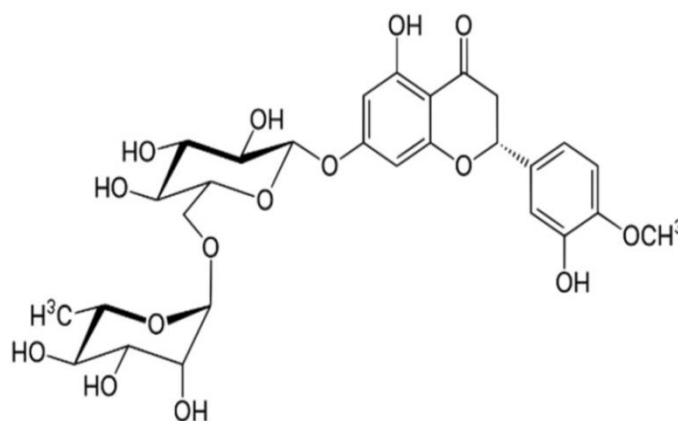


Figure 04: Structure chimique de l'hespéridine (**Pyrzynska, 2022**).

I.5.2. Propriétés pharmacologiques

La société scientifique moderne a reconnu les flavonoïdes comme une classe unique de molécules thérapeutiques en raison de leurs propriétés thérapeutiques variées. Parmi ceux-ci, l'hespéridine qui a été exploré pour un certain nombre d'effets pharmacologiques. Aujourd'hui, l'hespéridine est bien reconnue pour ses effets bénéfiques pour la santé (Tab. 03) (Ganeshpurkar et Saluja, 2019).

Tableau 03: Propriétés pharmacologiques de l'hespéridine.

	Propriétés pharmacologiques	Référence
Activités anti-oxydantes	Protection contre les dégâts pulmonaires provoqués par la nicotine, qui induit la peroxydation des lipides.	Aalikhani et al. (2022)
Prévention des maladies cardiovasculaires	L'homéostasie du glucose : augmente l'absorption de glucose, diminuer la résistance à l'insuline et donc la réduction de stress oxydatif et l'inflammation associés au diabète. Profil lipidique et adiposité : réduire l'accumulation de lipides dans les adipocytes et l'athérosclérose. Pression artérielle et la fonction endothéliale : diminuer le stress oxydatif et l'inflammation.	Mas-Capdevila et al. (2020)
Activités anti-inflammatoires	L'hespéridine à des effets anti-inflammatoires et anti- hypertenseurs dans le diabète de type 2. Abaissement de l'inflammation et l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires.	Xiao et al. (2018) Homayouni et al. (2018)
Activités anti-cancéreuses	L'ajustement des enzymes antioxydantes entraîne la suppression de la multiplication cancéreuse et le caractère invasif.	Dias et al. (2021)
Propriétés neurodégénératives	Prévention des troubles de la mémoire (maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les accidents vasculaires cérébraux et la maladie de Huntington)	Ali et al. (2020)
Propriétés anti-microbiennes	Capables d'inhiber la croissance de différents types de bactéries Gram (+), Gram (-) et des moisissures avec une intensité différente selon le microorganisme et l'écosystème dans lequel il se trouve.	Babayi et al. (2004)

II. Biofilm

II.1. Définition

La définition précise du biofilm fait toujours l'objet de débats au sein de la communauté scientifique. Bill Costerton a proposé le terme « biofilm » en 1978 et l'a défini en 2002 comme des communautés de microorganismes attachées à un substrat ou à une interface ou les unes aux autres, intégrées dans une matrice autoproduite de substances polymères extracellulaires (EPS) et elles montrent un phénotype modifié en termes de taux de croissance et de transcription génétique. En 2016, Hans Curt Flemming a complété cette définition en qualifiant les biofilms comme une forme émergente de vie microbienne, dans laquelle la vie communautaire est complètement différente des microbes qui vivent comme des cellules libres (**Lamret *et al.*, 2020 ; Miquel *et al.*, 2016**).

La structure de la matrice des EPS des biofilms est constituée d'un ou plusieurs polysaccharides extracellulaires, d'ADN et de protéines. Les canaux du biofilm permettent à l'eau, à l'air et aux nutriments de parvenir à toutes les parties de la structure (**Rabin *et al.*, 2015**).

Les biofilms peuvent coloniser tous les types d'environnement, abiotique ou biotique, et ils constituent un problème sanitaire dans tous les domaines. La plaque dentaire, la peau et l'intestin humains représentent l'un des biofilms les plus répandus dans les habitats eucaryotes. Il est important aussi de signaler le rôle bénéfique des biofilms qui sont largement utilisés dans différentes applications biotechnologiques, comme la production de biocarburants, la dégradation des eaux usées et la filtration de l'eau potable (**Mishra *et al.*, 2020**).

II.2. Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien

La formation de biofilm est généralement établie en plusieurs étapes (Fig. 05). Tout d'abord, un attachement à une surface s'établit, ensuite, le stade de maturation dans lequel les biofilms forment une architecture structurée à l'aide d'EPS. Enfin, la phase de dispersion, où la cellule quitte le biofilm. Chaque étape est influencée par différents facteurs environnementaux et constitue un processus hautement réglementé (**Toyofuku *et al.*, 2016**).

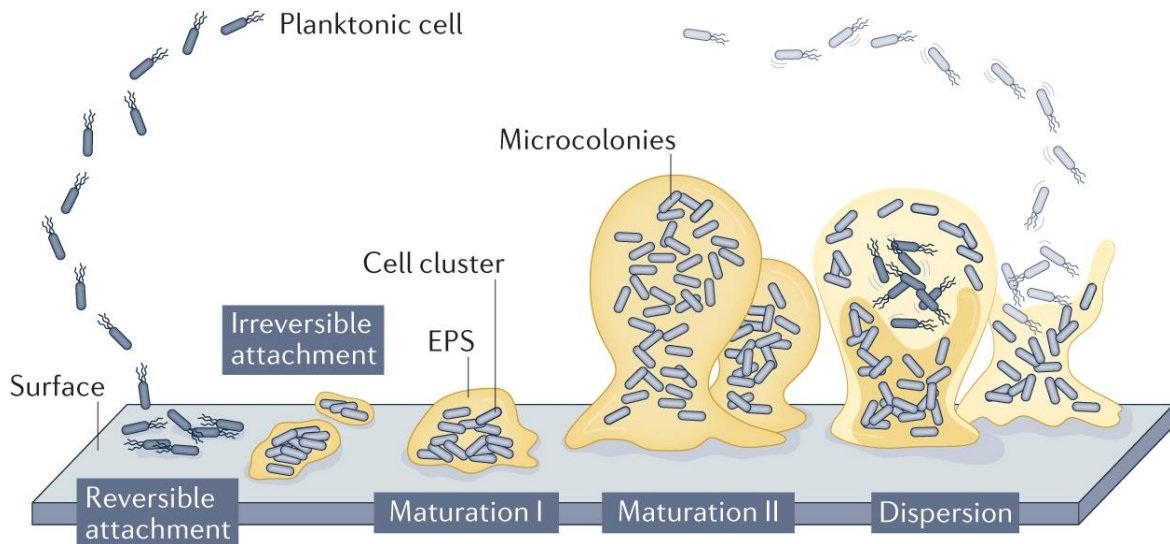


Figure 05: Étapes du développement d'un biofilm bactérien (Sauer *et al.*, 2022).

- **Attachement initial :** les appendices cellulaires comme les flagelles, les pili et les fimbriaes aident à l'attachement des cellules bactériennes à une surface de manière réversible au pôle des cellules. À ce stade, les bactéries peuvent entrer dans le mode de vie biofilm ou quitter la surface et revenir au mode de vie planctonique (Toyofuku *et al.*, 2016).
- **Attachement irréversible :** à ce stade, les microorganismes sont irréversiblement attachés à la surface et synthétisent l'EPS. La sécrétion d'EPS par les bactéries, constitue une forte interaction entre la bactérie et la surface. Au cours de cette étape, les agrégats sur le substrat sont formés par l'adhésion des micro-organismes planctoniques à différentes espèces d'organismes ou entre eux et l'adhésion devient irréversible en absence d'interférence physique ou chimique (Alotaibi et Bukhari, 2021).
- **Maturation I :** la multiplication et la division des cellules attachées de façon irréversible peuvent mettre au point des grappes et des agrégats tridimensionnels (3D) appelés microcolonies et synthétiser la matrice EPS pour l'adhésion aux surfaces, l'échafaudage des cellules ensemble, la cohésion entre les cellules, le maintien de l'architecture 3D et la protection des microcolonies contre divers stress (Amankwah *et al.*, 2021).
- **Maturation II :** les cellules stratifiées et les petits amas forment des microcolonies conduisant à la formation de biofilms fins avec la synthèse d'une matrice EPS à partir

des composants structurels principaux (polysaccharide, protéine et ADN électronique). Les amas deviennent des macrocolonies et les cellules sont déplacées du substrat pour former des canaux et des vides qui favorisent l'échange de nutriments et de déchets en injectant du fluide dans le biofilm. La maturation du biofilm par l'intermédiaire de molécules de signalisation se traduit par des changements structurels ainsi que par de nombreux changements dans l'expression des gènes codant pour différents facteurs de virulence. Ces changements comprennent la perte de la mobilité cellulaire par l'expression de phénotypes sans flagelle, la réduction de la synthèse des protéases, etc (**Amankwah et al., 2021**). Une fois mature, le biofilm comporte trois couches : une pellicule de liaison qui lie le biofilm à la surface, une pellicule de base composée d'une couche dense de bactéries et une pellicule de surface à partir de laquelle les bactéries flottant librement peuvent apparaître et se propager (**Alotaibi et Bukhari, 2021**).

- **Dispersion** : la dernière étape du développement du biofilm est la libération des cellules planctoniques du biofilm à la suite de conditions défavorables, du biofilm mature à la forme planctonique. La dispersion peut se produire dans l'ensemble du biofilm ou seulement dans une partie de celui-ci. Cette étape permet la propagation et la colonisation de nouvelles surfaces (**Rabin et al., 2015**).

II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm

La formation de biofilm est liée à plusieurs facteurs. Dans la suite, nous résumons brièvement l'effet de ces facteurs sur la formation du biofilm en trois grandes catégories (**Alotaibi et Bukhari, 2021 ; Ansari et al., 2017**) :

- **Propriétés de la surface** : divers facteurs peuvent influencer l'adhésion bactérienne telle que l'hydrophobie et la texture ou la rugosité. Cependant, l'attachement du biofilm se produira facilement sur des surfaces rugueuses, hydrophobes et recouvertes de films de conditionnement de surface.
- **Conditions environnementales** : il est connu que le développement de la forme planctonique à la forme sessile se produit en réponse aux changements des conditions environnementales. Ces facteurs environnementaux, tels que le niveau de nutriments, la température, le pH, salinité, humidité, nutriments inorganiques, et la force ionique, peuvent influencer la formation de biofilm.

- **Propriétés de la cellule** : les propriétés de la surface cellulaire, telles que l'hydrophobie (Les bactéries ayant des propriétés hydrophobes sont plus susceptibles de se fixer aux surfaces que les bactéries hydrophiles), la flagellation et la mobilité, divers exométabolites comme les molécules de signalisation (*Quorum Sensing*), les exopolysaccharides et les peptides antimicrobiens, certaines communautés microbiennes se défendent des autres en produisant des métabolites antimicrobiens (Les peptides lytiques se lient aux fragments LPS de la membrane cellulaire bactérienne et perturbent la stabilité de la membrane).

II.4. *Escherichia coli* et formation du biofilm

II.4.1. Classification et caractères généraux

Du genre *Escherichia* et d'espèce *coli*, *E. coli* est une des bactéries les plus étudiées, car les microbiologistes le considèrent comme un compagnon de laboratoire. Possédant les caractères classiques de la famille qu'elle appartient qui est la famille des *Enterobacteriaceae* (Tortora et al., 2011).

La classification actuelle d'*E. coli* basée sur la génétique moléculaire est la suivante (Faner et al., 2017) :

- Règne : *Bacteria*
- Phylum XII : *Proteobacteria*
- Classe : *Gamma proteobacteria*
- Ordre : *Enterobacteriales*
- Famille : *Enterobacteriaceae*
- Genre : *Escherichia*
- Espèce : *Escherichia coli*

En forme de bâtonnet à Gram négatif droit, le plus souvent mobile avec une ciliature péritriche, aéro-anaérobie facultatif, oxydase (-), catalase (+), gaz en glucose, lactose (+), ONPG (+) et H₂S (-). Facilement cultivé sur des milieux ordinaires ou lactosés ainsi que sur milieux sélectifs pour les entérobactéries. Elle pousse après 18 à 24 heures sur les milieux habituels donnant des colonies circulaires d'aspect lisses à bords réguliers en moyenne de

2 à 3 mm de diamètre, peuvent être rapidement développées dans les conditions optimales de croissance (**Tenaillon et al., 2016 ; Clave, 2015 ; Joly et Reynaud, 2009**).

E. coli est la bactérie prédominante du tube digestif où elle occupe une part importante du microbiote autochtone de l'être humain et des animaux à sang chaud. Elle est acquise chez les nouveau-nés à partir de microbiote maternel puis tout au long de sa vie par voie orale à partir de l'alimentation entraînent une coexistence à bénéfices mutuels. Par contre, ce colibacille souille les eaux et les aliments à partir des matières fécales où sa présence représente un indice d'une contamination fécale. Donc trois réservoirs sont présents : Homme – Animaux – Environnement (**Bidet, 2019 ; Poirel et al., 2018 ; Smati et al., 2015 ; Tortora et al., 2011**).

En règle générale elles sont inoffensives mais certaines souches apparues avoir acquis des gènes favorisant une infection dite intestinale (IPEC) ou bien les gastroentérites à *Escherichia coli* provoquant des diarrhées une fois ingérée classées en plusieurs « pathovars » qui diffèrent par leur mode de virulence ainsi que la gravité des dommages qu'ils provoquent (ECET-ECEI-ECEP-ECEAg-ECEH-ECAD). Les principaux symptômes comprennent des coliques et l'apparition de diarrhées et des vomissements entraînant une déshydratation avancée suivie d'un état de choc septique dans les formes les plus graves. Chaque groupe des souches possède un groupe distinct d'antigènes somatiques (O) et flagellaires (H) et des caractéristiques de virulence spécifiques généralement médiées par des plasmides (**Bush et Vazquez-Pertejo, 2022 ; Tortora et al., 2011**). D'autres souches appelées *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) peut provoquer des maladies extra-intestinales si les barrières anatomiques normales de l'intestin sont perturbées, comprennent l'*E. coli* uropathogène (UPEC), la méningite néonatale (MNEC) et celle responsable de la bactériémie (**Dale et Woodford, 2015**).

II.4.2. Résistance aux agents antibactériens

E. coli est normalement naturellement sensible aux antibiotiques agissant sur les Gram négatif mais malheureusement depuis les premiers cas signalés de sa résistance aux antibiotiques n'a cessé d'augmenter. En raison de son impact sur la santé humaine, elle est désormais incluse, avec le reste de sa famille, dans la liste de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des 12 familles de bactéries qui représentent la plus grande menace pour la

santé humaine. Parmi les genres bactériens qui appartiennent à cette famille, *E. coli* n'est dépassé que par *Klebsiella* en ce qui concerne le nombre d'infections humaines associées à des bactéries multi-résistantes. (**Garza-Gonzalez et al., 2019 ; Kaesbohrer et al., 2019 ; Cöplü et al., 2018**). *E. coli* résiste à de nombreux antibiotiques comme les β -lactamines, les quinolones, les aminoglycosides, les sulfamides et la fosfomycine. Elle représente un important réservoir des gènes de résistance qui peuvent être responsables de l'échec des traitements humains. Un nombre croissant de ces gènes a été identifié dans les isolats d'*E. coli* au cours des dernières décennies, et beaucoup ont été acquis par transfert horizontal des gènes. Dans le pool génétique entérobactérien, *E. coli* joue le rôle de receveur et de donneur de gènes de résistance (**Poirel et al., 2018**).

II.4.3. Formation de biofilm par *Escherichia coli*

Escherichia coli est un des microorganismes les plus répandus formant des biofilms sur plusieurs surfaces, ainsi qu'un modèle représentatif pour étudier la biologie et l'écologie des biofilms (**Nakao et al., 2018**).

La formation du biofilm d'*E. coli* est un processus complexe implique plusieurs étapes d'adhésion, de développement et de maturation régies par des gènes qui remplissent des fonctions spécifiques dans ce processus. La communication intercellulaire au sein de ce biofilm est due à des capteurs de *quorum* qui peuvent moduler les acteurs biochimiques clés permettant aux bactéries de proliférer et d'intensifier les infections qui en résultent (**Sharma et al., 2016**).

La matrice extracellulaire (MEC) d'*E. coli* contient deux polymères, un protéique majeur appelé curli et un glucidique, c'est la cellulose. Bien que les deux soient généralement les constituants les plus copieux du biofilm, cette MEC peut également comprendre des pili de type 1 et des flagelles, d'antigène 43, de l'ADN, de la β -1,6-N-acétylglucosamine (β -1,6-GlcNAc), de l'acide colanique et des sucres de capsule qui sont aussi des facteurs importants dans la formation du biofilm (**Hufnagel et al., 2015**).

Des nouvelles découvertes ont permis d'identifier des gènes de résistance au stress environnemental dans le processus de formation du biofilm. La régulation des protéines

structurelles et des gènes impliqués dans la synthèse et la dégradation du biofilm est assuré par le gène *rpoS* (Schellhorn, 2020).

La diversité des composants structurels du biofilm est aggravée par le développement de la résistance et malheureusement, cette résistance s'est étendue aux classes d'antibiotiques de dernière génération comme les polymyxines et les carbapénèmes. Cette résistance accrue observée aux antibiotiques courants constitue un défi pour le contrôle des infections. Récemment, il y avait des progrès, dans l'exploration et le développement de nouvelles méthodes et approches thérapeutiques pour traiter les infections liées aux biofilms d'*E. coli* (Sharma *et al.*, 2016).

II.5. Stratégies anti-biofilm

Plusieurs moyens pour prévenir la croissance des biofilms et/ou de les éliminer sont développées. Le tableau 04 résume la majorité des stratégies anti-biofilm et les mécanismes correspondants.

Tableau 04: Stratégies anti-biofilm et les mécanismes correspondants (Mishra *et al.*, 2020 ; Ong *et al.*, 2018 ; Li et Lee, 2017).

Stratégie	Mécanismes
Surfaces hydrophiles anti-adhésives	<ul style="list-style-type: none"> - La modification des propriétés physicochimiques des surfaces ; - Le revêtement de surface avec des polymères hydrophiles (Le poly-N vinylpyrrolidone) ; - L'incorporation d'agents antimicrobiens sur les surfaces ;
Inhibiteurs de <i>Quorum Sensing</i> (QS)	<ul style="list-style-type: none"> - Interruption de la synthèse des signaux QS ; - Dégradation ou modification des signaux QS ; - Inhibiteur compétitif des signaux QS ;
Enzymes dégradant la matrice	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradation des polysaccharides, ADN et des composants protéiques dans la matrice du biofilm.
Agents tensioactifs	<ul style="list-style-type: none"> - Abaissement de la tension superficielle et détachement des cellules adhérentes ; - Induire la dispersion du biofilm.

Suite du Tableau 04 :

Acides gras libres	- Inhibition de l'attachement initial ou induction de la dispersion du biofilm, probablement en affectant la fonction de la membrane cellulaire.
Indole et ses dérivés	- Inhibition de la formation de biofilms et a répression de son expression de gènes impliqués dans la colonisation de la surface et la virulence.
Chélateurs de métaux	- L'élimination efficace des métaux à l'aide de chélateurs métalliques rend les cellules bactériennes plus sensibles à une variété d'agents antibactériens, provoquant la lyse cellulaire et la perte de viabilité.
Composants bioactifs naturels	- Perturbation de la membrane, privation de substrat et fixation au complexe adhésif et à la paroi cellulaire ; fixation aux protéines ; interaction avec l'ADN eucaryote et blocage de la fusion microbienne.

Partie II :
Matériel
et
Méthodes

Les travaux expérimentaux de la présente étude ont été réalisés au niveau du Laboratoire de Microbiologie de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université 8 Mai 1945 Guelma.

I. Matériel biologique

I.1. Choix et origine des souches bactériennes

Quatre souches bactériennes choisies pour la présente étude appartenant à l'espèce *Escherichia coli*. Ces souches ont été isolées à partir d'un milieu hospitalier de la région de Guelma (Tableau 05).

Le choix de cette espèce bactérienne est basé sur :

- ✓ Son caractère ubiquitaire dans l'environnement hospitalier ;
- ✓ Sa capacité de résistance vis-à-vis de différents agents chimiques ;
- ✓ Sa capacité de formation de biofilm selon des études antérieures (Suttasattakrit *et al.*, 2022).

Tableau 05 : Origine des souches d'*Escherichia coli* à étudier.

Espèce bactérienne	Code	Date de prélèvement	Point de prélèvement	Matériaux du point de prélèvement	Méthode de conservation
<i>Escherichia coli</i>	EC1	03/03/2019	Poignée de porte d'une chambre de patient	Inox	GN inclinée en tube
	EC2	03/03/2019	Lavabo	Céramique	GN inclinée en tube
	EC3	12/04/2020	Poignée de porte d'une chambre de patient	Inox	GN inclinée en tube
	EC4	12/04/2020	Lavabo	Céramique	GN inclinée en tube

GN : gélose nutritive.

I.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes

La purification est une étape très importante, elle conduira à la souche pure ce qui facilitera les études phénotypiques (Delarras, 2007).

Afin de vérifier la pureté des souches bactériennes étudiées, nous avons suivi les étapes suivantes :

I.2.1. Revivification des souches bactériennes

À partir de chaque bactérie conservée sur la gélose nutritive, des colonies ont été introduites dans des tubes contenant 5 ml du Bouillon Tryptone Soja (TSB) à l'aide d'une anse de platine stérile. Les tubes sont ensuite incubés à 37 °C pendant 24 heures (**Noyce et al., 2006**).

I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique des souches bactériennes

À partir du milieu TSB présentant une croissance bactérienne, nous avons ensemencé la gélose Hektoen qui est un milieu sélectif pour les entérobactéries pathogènes, il permet une première orientation quant à l'identification de l'espèce isolée sur la base de l'attaque de trois glucides : lactose, salicine et saccharose. Une différenciation supplémentaire (présence de thiosulfate et de citrate de fer dans le milieu) qui se traduit par des colonies à centre noir dû à la formation de sulfure de fer (**Joffin et Leyral, 2014**).

Les souches bactériennes ont subi une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologique selon les méthodes classiques de microbiologie décrites par **Guiraud (2003)** et la caractérisation biochimique par utilisation du système miniaturisé API 20 E (Annexe).

II. Étude de l'effet d'un flavonoïde naturel sur la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli*

Cette partie de l'expérimentation porte sur la détection de la capacité des souches bactériennes isolées des sites hospitaliers à former de biofilms sous l'effet d'un flavonoïde « l'hespéridine » extrait d'une plante médicinale.

La technique utilisée est celle du « Test d'adhésion en microplaque par coloration au cristal violet » (**Camps, 2011 ; Crémet et al., 2013**).

Cette méthode utilise la spectrophotométrie pour mesurer la capacité des souches bactériennes à adhérer à une surface et/ou à former un biofilm dans les puits des microplaques. Le cristal violet colore les bactéries et la matrice des biofilms (**Pantanella et al., 2013**).

II.1. Obtention de l'héspéridine

L'héspéridine a été fournie par un laboratoire pharmacologique sous forme de poudre pure à 99 %. Elle a été extraite à partir des feuilles de la plante médicinale *Mentha × piperita*. Les feuilles ont été collectées et séchées à l'air libre à l'ombre pendant 7 jours à la température ambiante puis elles sont broyées en une poudre grossière. Cette dernière a été tamisée à l'aide d'un tamis à pores de 1 mm et stockée dans des récipients en plastique étanches.

Différents extraits (aqueux, méthanolique, acétate éthylique) ont été préparés afin de chercher la présence des flavonoïdes. Après filtration sur papier Whatman et concentration sous vide des extraits, la présence de flavonoïdes a été confirmée par l'utilisation d'un ruban de magnésium et quelques gouttes d'HCl concentré dans de l'eau bouillante. La formation d'une couleur rouge indique la présence de flavonoïdes (flavanones, flavanols). L'héspéridine a été isolée par chromatographie sur colonne et HPLC (chromatographie en phase liquide haute performance ou haute pression qui est une technique d'analyse séparative, basée sur une migration progressive des composés dans une colonne supportant les hautes pressions) (De et al., 2010).

II.2. Préparation de la solution mère et les concentrations filles de l'héspéridine

L'héspéridine a été initialement dissoute dans du DMSO à 2 % (Le diméthylsulfoxyde, un solvant polaire, qui dissout à la fois des composés polaires et non-polaires, et qui est miscible dans une large gamme de solvants organiques, ainsi que dans l'eau) à raison de 200 mg/ml afin de préparer la solution mère et ensuite diluée dans du bouillon Muller-Hinton jusqu'à la concentration finale souhaitée.

La détermination de la capacité de formation de biofilm chez les souches sélectionnées a été réalisée en absence de l'héspéridine et en présence de huit concentrations filles allant de 50 µg/ml (1/16 CMI) jusqu'à 6400 µg/ml (8 CMI). La CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) a été déterminée à l'avance (§ II.3) (Dheilly et al., 2010).

II.3. Détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI

La CMI est la concentration la plus faible d'un agent antimicrobien (en mg/l) qui, dans des conditions *in vitro* définies, inhibe l'apparition d'une croissance visible d'un micro-organisme au cours d'une période définie.

La CMI est déterminée selon la méthode de micro-dilution en bouillon de la norme **EN ISO 20776-1 (2019)** :

- Sur une microplaque de 96 puits, mélanger 100 µl de la concentration désirée et 100 µl d'inoculum bactérien (ajusté à 0,5 Mac Farland) ;
- Incuber les microplaques empilées les unes sur les autres (Pour éviter le dessèchement) à 37 °C pendant 18 heures ;
- Examiner la croissance bactérienne dans chaque puits (se traduit par une turbidité). La CMI sera la plus petite concentration qui inhibe complètement la croissance visible. Il est important de vérifier le témoin de croissance positif auquel en comparant les autres cupules pour définir la CMI. Un témoin négatif peut être aussi utilisé (DMSO à 2 %).

II.4. Détermination de la concentration minimale bactéricide CMB

À partir de tous les puits dans lesquels il n'y avait pas de croissance visible (selon la présence de turbidité), 10 µl ont étéensemencés sur la gélose Mueller-Hinton. Après incubation à 37 °C pendant 24 h, la concentration la plus faible, à laquelle la croissance cellulaire était complètement supprimée, a été considérée comme la CMB (la réalisation d'un témoin bactéricide est recommandée) (**Frolov et al., 2022**).

II.5. Préparation des cultures bactériennes

La formation de biofilm en mono-espèce et mixte a été testée. Le biofilm mono-espèce est représenté par la souche bactérienne *E. coli*. Le biofilm mixte est représenté par le couple : *E. coli* – *Klebsiella oxytoca* (KO). Cette dernière a été isolée du même milieu hospitalier (Bacille à Gram négatif appartenant aux entérobactéries).

Les cultures bactériennes sont préparées comme suite :

- Préparer les monos- et les cultures bactériennes mixtes (ajustées à 0,5 Mac Farland) dans des tubes en verre contenant le bouillon TSB avec différentes concentrations de l'hespéridine ;
- Incuber les tubes pendant 1, 4, 8, 16 et 21 jours à 25 °C et à 37 °C sans agitation (**Florence, 2014**).

II.6. Activité anti-adhérence/ Essai d'adhésion

L'activité anti-adhérence de l'hespéridine a été déterminée selon la technique décrite par **Wang et al. (2017)**. Brièvement, 2 ml des cultures de 10^6 cellules/ml d'*E. coli* avec 0 CMI et ¼ CMI de l'hespéridine ont été répartis en 6 puits d'une microplaque puis incubées à 37 °C pendant 24 h. Les bactéries non adhérentes ont été décantées, et l'adhérence restante a été éliminée à l'aide de 0,5 M de l'hydroxyde de sodium, ensuite, les cellules ont été quantifiées à 600 nm.

Pourcentage d'adhérence (%) = $\left[\frac{\text{DO des cellules adhérentes}}{\text{DO des cellules adhérentes} + \text{DO des cellules surnageantes}} \right]$.

II.7. Essai de la formation de biofilm

D'après la technique de **Frolov et al. (2022)** :

- Répartir 200 µl de chaque suspension bactérienne dans les puits d'une microplaque de 96 puits à fond plat en polystyrène ;
- Incuber la microplaque à 37 °C pendant 24 heures ;
- Après incubation, vider la microplaque délicatement et laver les puits pendant 2 min avec une solution de PBS (Phosphate-buffered saline) afin d'enlever les bactéries non adhérentes au support ;
- Sécher la microplaque à 50 °C pendant 30 minutes afin de fixer les bactéries ;
- Introduire dans chaque puits 200 µl d'une solution de cristal violet à 0,1 % pendant 15 minutes à la température ambiante ;
- Éliminer la solution de cristal violet ensuite rincer trois fois avec la solution de PBS pour enlever le colorant en excès puis sécher 10 min à température ambiante ;

- Remettre en solution le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries par l'ajout de 200 μ l d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre ;
- Après 10 min d'attente, lire l'absorbance à 595 nm.

La figure 06 illustre le protocole suivi afin d'étudier l'effet de l'hésperidine sur la capacité de formation de biofilm chez *E. coli*.

III. Analyse statistique

Afin de visualiser et de comparer l'effet de différentes concentrations de l'hésperidine et des deux températures testées sur la capacité de la formation de biofilm, les résultats sont soumis au test ANOVA à un critère (AV1) et au test T de Student, respectivement (La normalité des distributions a été évaluée préalablement par la valeur W de Shapiro-Wilk's, les distributions étant la plupart du temps symétriques). Les différences ont été considérées significatives à une probabilité $p \leq 0,05$. L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique SPSS 25.0.

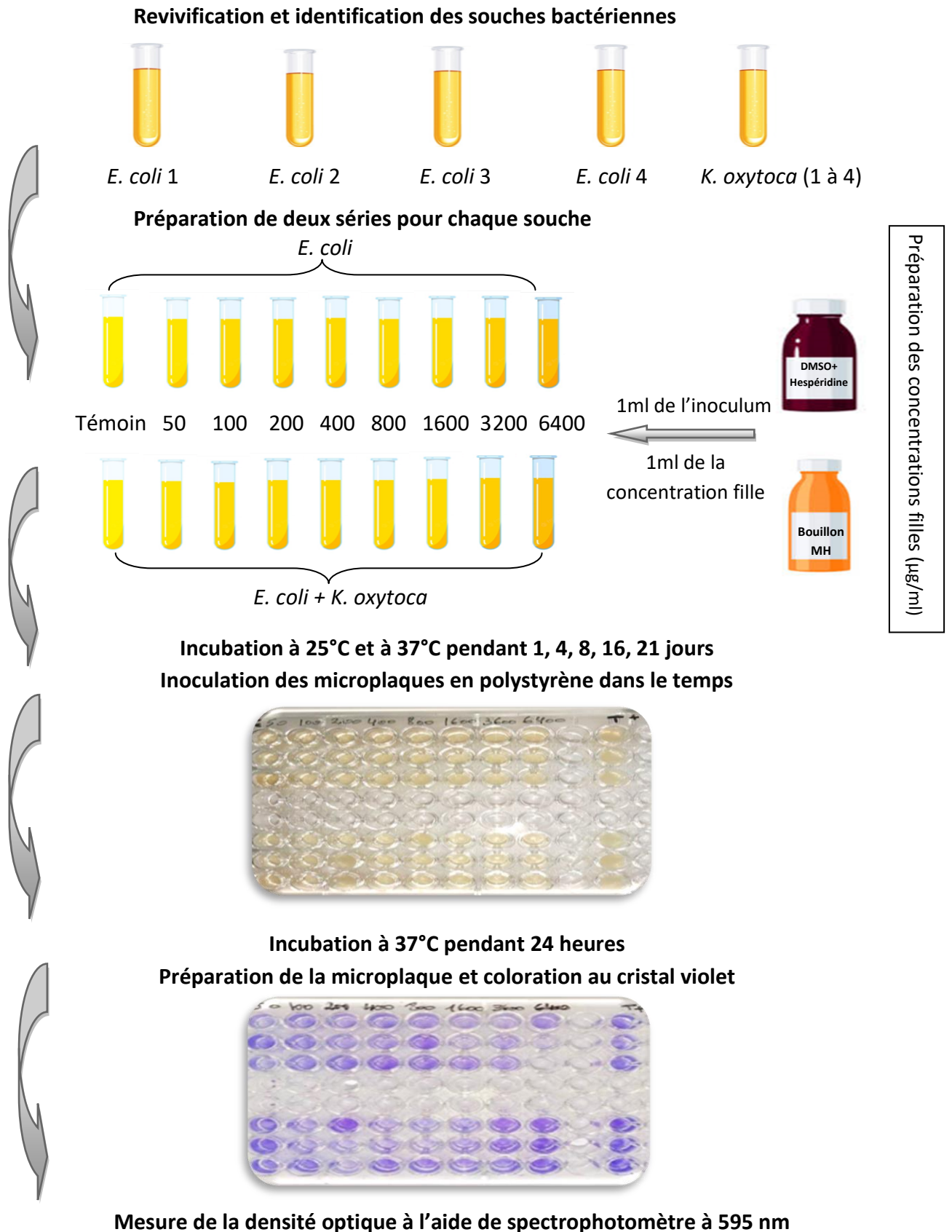


Figure 06 : Étude de la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* soumise au stress de l'hespéridine.

Partie III :

Résultats et

discussion

I. Caractérisation phénotypique et vérification de la pureté des souches bactériennes

La caractérisation phénotypique des souches bactériennes à étudier a confirmé la pureté de nos isolats (Tableau 06).

Tableau 06: Identification des souches bactériennes à étudier.

Bactérie	Code	Aspect microscopique	Enzymes respiratoires	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
<i>Escherichia coli</i>	EC1	Bacilles à Gram (-)	Cat (+) OX (-) NR (+)	API 20E	7104552	99 %
	EC2				1044572	99,9 %
	EC3				7144552	100 %
	EC4				4144512	99,8 %

Cat : catalase, OX : oxydase, NR : nitrate réductase, (+) : positif, (-) : négatif.

La figure 07 illustre les résultats de l'isolement et des différents tests d'identification de la souche *Escherichia coli* EC1.

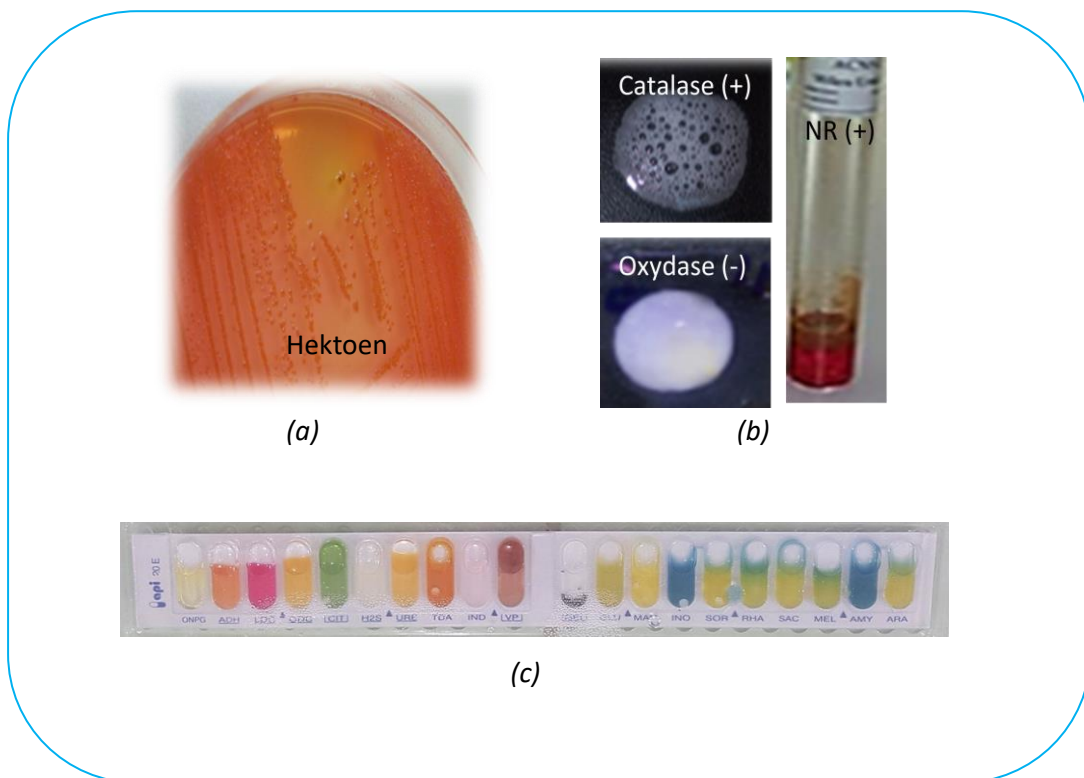


Figure 07: (a) Aspect macroscopique, (b) enzymes respiratoires et (c) profil biochimique d'*Escherichia coli* EC1.

II. Détermination de la concentration minimale inhibitrice et la concentration minimale bactéricide de l'hespéridine vis-à-vis des souches d'*Escherichia coli*

La valeur de la CMI de l'hespéridine obtenue est de 800 µg/ml pour la totalité des souches d'*Escherichia coli* étudiées. En milieu solide, les CMB de l'hespéridine enregistrées vont de 6400 µg/ml à plus de cette plus forte concentration utilisée dans la présente étude. La détermination du rapport CMB/CMI montre que l'action de ce flavonoïde sur les bactéries testées est globalement bactériostatique (Tableau 07).

Tableau 07: Activité antibactérienne de l'hespéridine.

Code de la souche	CMI (µg/ml)	CMB (µg/ml)	CMB/CMI	Activité antibactérienne*
EC1	800	6400	8	Bactériostatique
EC2	800	6400	8	Bactériostatique
EC3	800	>6400	>8	Bactériostatique
EC4	800	>6400	>8	Bactériostatique

*CMB/CMI<4 => activité bactéricide ; 4<CMB/CMI<32 => activité bactériostatique ; CMB/CMI>32 => Bactérie tolérante

Au cours de ces dernières années, plusieurs travaux sur les dérivés synthétiques des flavonoïdes ont suscité beaucoup d'intérêt en raison de leur potentiel en tant qu'agents antibactériens ont montrant des activités antibactériennes de 20 à 80 fois plus fortes et puissantes contre les bactéries à Gram négatif multirésistantes (y compris *E. coli*) que les médicaments standards connus (**Farhadi et al., 2018 ; Xie et al., 2015**). Selon nos résultats, il apparaît nettement que l'hespéridine montre un effet inhibiteur sur la croissance d'*Escherichia coli*. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature scientifique qui cite l'efficacité intrinsèque de l'hespéridine pour inhiber et/ou détruire rapidement plusieurs types de bactéries dont *E. coli*. **Choi et al. (2022)** ont déterminé la CMI de trois flavonoïdes : l'hespéretine, l'hespéridine et le glucoside d'hespéridine (dont la solubilité est différente), sur des souches d'*E. coli*. Ils ont montré que les trois formes ont un effet bactériostatique à bactéricide. La valeur de la CMI de l'hespéridine vis-à-vis d'*E. coli* était >2000 µg/ml et que parmi les composés testés, l'hespéretine a efficacement inhibé la croissance d'*E. coli* en montrant des valeurs de CMI de 500 µg/ml. En revanche, **Köksal**

Karayıldırım (2017) a indiqué que l'hespéridine inhibe de manière significative la croissance d'*E. coli* avec une CMI égale à 8 µg/ml.

Le mécanisme exact, par lequel l'hespéridine inhibe ou tue les bactéries, est aujourd'hui encore inconnues, cependant, plusieurs théories sont développées et étudiées. En outre, il a été montré que le mécanisme de toxicité des flavonoïdes vis-à-vis des micro-organismes se fait par privation des ions métalliques tels que le fer. Par conséquent, les flavonoïdes connus par leur pouvoir antioxydant puissant, pourraient avoir potentiellement un effet dans la chélation de fer et empêcher ainsi la pénétration intracellulaire du cofacteur Ca^{2+} à la cellule bactérienne, ce qui provoque l'inhibition de leur activité (**Basli et al., 2012**). **Djahra et al. (2012)** ont indiqué que les flavonoïdes, grâce à leur teneur en groupes phénoliques, peuvent se lier à certaines enzymes et protéines, et ainsi modifier les équilibres enzymatiques et par conséquent inhibe la croissance bactérienne. Aussi, les travaux de **Lee et al. (2010)** ont confirmé que l'effet bactériostatique de l'hespéridine sur *E. coli* soit à l'origine de la réduction de la production de LPS (Lipopolysaccharides).

L'enregistrement de valeurs importantes de CMI et/ou de CMB pourrait s'expliquer par la résistance de nos souches à l'hespéridine. Plusieurs études ont confirmé que les bactéries à Gram négatif sont résistantes aux flavonoïdes. **Donadio et al. (2021)** ont rapporté que les LPS des bactéries Gram négatif pourraient exercer un effet de charge répulsif sur les groupes phénoliques partiellement dissociés du flavonoïde, ce qui entraînerait une liaison inefficace à la surface de la membrane. De plus, **Jubair et al. (2021)** ont montré que les porines (protéines de la membrane externe bactérienne) contrôlent bien le passage de plusieurs matériaux y compris les flavonoïdes.

Outre la résistance bactérienne, **Shamsudin et al. (2022)** ont confirmé que l'aspect le plus important des flavonoïdes, afin d'exercer leur puissante action antibactérienne, est qu'ils doivent conserver leurs caractéristiques amphiphiles (portant à la fois un groupement hydrophobe et un autre hydrophile) pour leurs pénétrations dans les bactéries.

III. Activité anti-adhérence de l'héspéridine

L'activité anti-adhérence de l'héspéridine a été déterminée pour les mono-souches et pour les cultures mixtes (dont les souches KO sont des *Klebsiella oxytoca*). Les résultats obtenus montrent qu'après un jour, le taux d'adhésion de la majorité des souches était plus faible en présence de 800 µg/ml (CMI) d'héspéridine. Le pouvoir d'adhésion le plus faible a été enregistré chez la souche EC2, tandis que les cultures mixtes ont représenté des taux d'adhésion plus élevés (Tableau 08).

Tableau 08 : Taux d'adhérence des souches d'*Escherichia coli* en présence d'héspéridine (moyenne ± écartype)

Souche bactérienne	Adhésion en présence de ¼ CMI d'héspéridine (%)	Adhésion en présence de CMI d'héspéridine (%)
EC1	42,56 ± 0,7	31,05 ± 0,49
EC2	31,64 ± 0,27	25,65 ± 0,54
EC3	29,56 ± 0,42	25,7 ± 0,14
EC4	29,47 ± 0,45	26,07 ± 0,31
EC1-KO1	44,16 ± 0,3	38 ± 0,2
EC2-KO2	41,93 ± 0,06	28,59 ± 0,38
EC3-KO3	42,3 ± 0,11	36,9 ± 0,5
EC4-KO4	39,62 ± 0,3	27,61 ± 0,37

L'attachement des bactéries aux surfaces est la forme prédominante de survie des bactéries dans la nature et dans les différents écosystèmes créés par l'homme. Par conséquent, la production excessive de biomasses fixées sur les surfaces peut porter atteinte à la santé publique, en particulier en milieu hospitalier et essentiellement vis-à-vis des populations fragilisées (Masson, 2015). Selon nos résultats, il apparaît clairement que les cultures mixtes (isolées d'un milieu hospitalier) ont une capacité d'adhérer à une surface plus importante que celle des mono-cultures est cela en présence d'un agent anti-adhérence. Filloux et Vallet (2003) ont confirmé que les bactéries à Gram négatif, dont *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca*, ont une capacité d'adhésion grâce aux flagelles et aux pili de type IV (des structures fibrillaires présentes au pôle de certaines bactéries à Gram

négatif). Lorsque les deux bactéries sont présentes sur une même surface, dans un premier temps, chaque bactérie s'attache transitoirement, temps pendant lequel la bactérie va chercher à évaluer la surface sur laquelle elle se trouve, puis une association stable entre les deux micro-organismes s'établit. Ces rassemblements de bactéries conduisent à la formation de micro-colonies dont la différenciation mène à l'élaboration du biofilm (**Hancock et al., 2010**).

Ces dernières années, plusieurs études ont basé sur des composés naturels d'origine végétale afin de lutter contre l'adhésion des microorganismes sur les différentes surfaces. Dans la présente étude, nous avons constaté que l'héspéridine possède une activité anti-adhérence non négligeable surtout avec son CMI vis-à-vis de toutes les souches d'*Escherichia coli* en enregistrant des taux d'adhésion inférieur à 50 %. **Damte et al. (2013)** ont trouvé que les flavonoïdes des plantes médicinales peuvent réduire 71 % de la mobilité des bactéries à Gram négatif en réduisant leur attachement aux surfaces et par conséquent le développement du biofilm.

IV. Étude de l'effet de l'héspéridine sur la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli*

IV.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce

La formation de biofilm chez *E. coli* a été déterminée en modifiant la température pour mieux comprendre l'influence de ce paramètre impératif.

À une température approximative de 22 à 25 °C, nous avons observé que les souches EC1 et EC2 sont capables de former des biofilms après 1 à 16 jours. Par ailleurs, après 21 jours leur pouvoir adhérent était plus faible par rapport aux témoins. Les souches EC3 et EC4 ont montré une diminution d'adhésion dès le premier contact (un jour) et spécifiquement après 21 jours. Les concentrations de l'héspéridine qui ont montré un effet anti-adhésion important sont 400 µg/ml (1/2 CMI) vis-à-vis de la souche EC4, 800 µg/ml (CMI) vis-à-vis des souches EC1 et EC3 et 3200 µg/ml (3 CMI) vis-à-vis de la souche EC2 (Fig. 08).

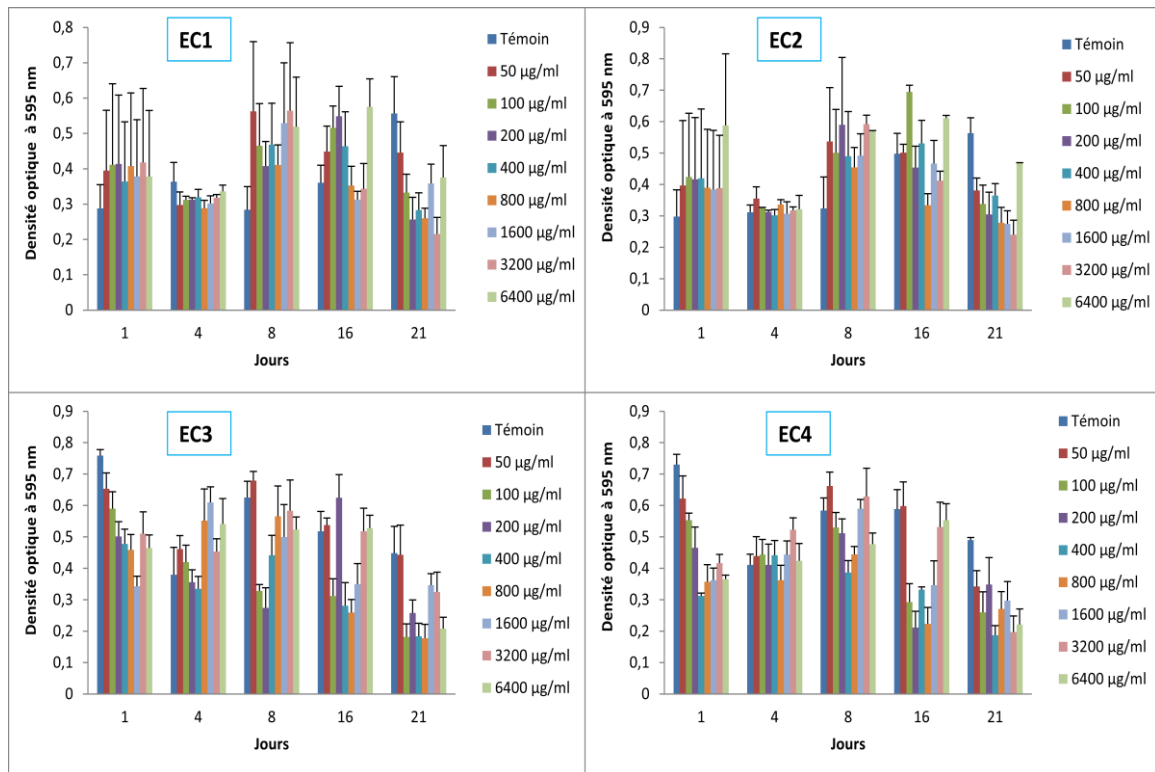


Figure 08: Capacité de formation de biofilm chez des souches *d'Escherichia coli* à une température ambiante et en présence d'hespéridine.

De même à 37 °C et en présence de différentes concentrations d'hespéridine, les souches *d'E. coli* montrent généralement une aptitude à la formation de biofilm. Les souches EC1 et EC2 présentent des densités optiques plus élevées que le contrôle après des courtes et de longues durées de contact avec l'hespéridine (1 à 16 jours). Les valeurs de DO les plus élevées des souches EC3 et EC4 sont enregistrés vis-à-vis de la 2CMI ($0,6 \pm 0,03$) et de la CMI d'hespéridine ($0,71 \pm 0,003$) après 8 jours, respectivement. La concentration de l'hespéridine qui a montré une plus forte réduction d'attachement des souches EC3 et EC4 après 21 jours de contact est 6400 µg/ml ($0,12 \pm 0,01$) (Fig. 09).

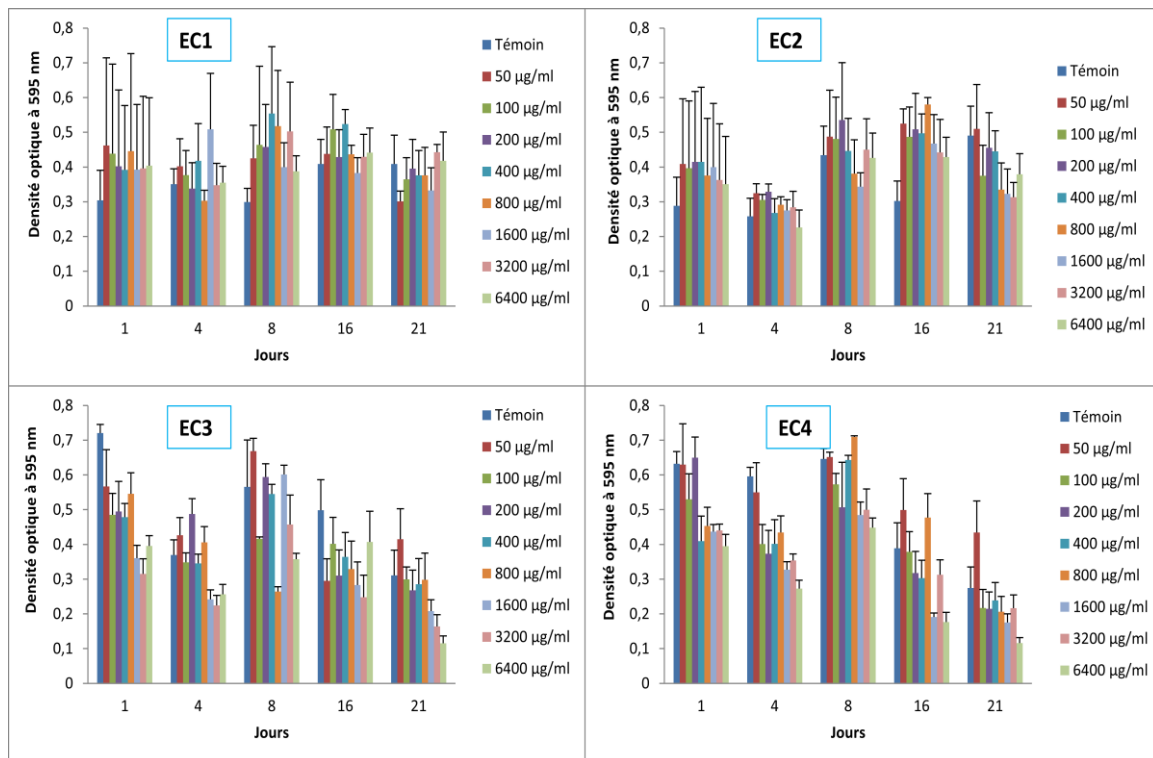


Figure 09: Capacité de formation de biofilm chez des souches *d'Escherichia coli* à la température 37°C et en présence d'héspéridine.

IV.2. Capacité de formation de biofilm mixte

En analysant la figure 10, nous pouvons constater que l'héspéridine a un effet antibiofilm important à une température ambiante sur le couple EC1-KO1 et EC2-KO2. Après 16 jours les concentrations allant de 400 à 6400 µg/ml ont réduit les densités optiques du couple EC1-KO1 à une valeur inférieure à 0,16. Tandis que, le couple EC2-KO2 a faiblement produit un biofilm ($DO < 0,3$) après 4 et 21 jours globalement en présence de différentes concentrations d'héspéridine.

Par ailleurs, la formation de biofilm a été plus élevée en présence d'héspéridine chez le couple EC3-KO3 et EC4-KO4. Des pics de formation de biofilm ont été enregistrés chez la souche mixte EC3-KO3 en présence de 50 et 800 µg/ml d'héspéridine au cours du 1^{er} jour, de 200 µg/ml au cours du 16^{ème} jour et en présence de 1600 µg/ml au cours du 21^{ème} jour. Le couple EC4-KO4 a formé un biofilm modéré à important ($0,3 \leq DO \leq 0,7$) durant la majorité du temps de contact avec les différentes concentrations d'héspéridine ce qui reflète leur faible effet anti-biofilm (Fig. 10).

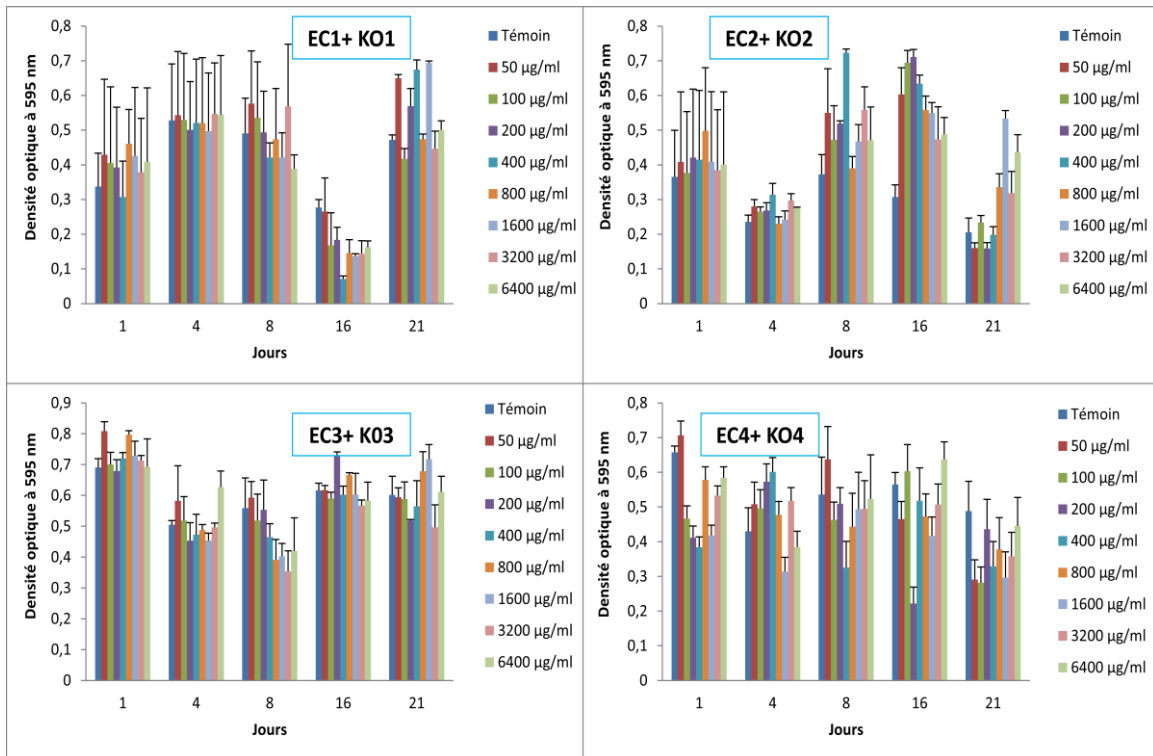


Figure 10: Capacité de formation de biofilm mixte (*Escherichia coli* – *Klebsiella oxytoca*) à une température ambiante et en présence d’hespéridine.

Les résultats illustrés par la figure 11 indiquent que les souches EC3-KO3 et EC4-KO4 sont fortement productrices de biofilm même à 37 °C. Une stabilité remarquable a été enregistrée vis-à-vis des différentes concentrations d’hespéridine durant toute la période d’étude pour le couple EC3-KO3. Une hyper augmentation de la densité optique du couple EC4-KO4 a été enregistré durant les premières durées de contact. En revanche, les valeurs minimales de densité optique ont été notées avec les concentrations 3200 et 6400 µg/ml d’hespéridine pendant le 21^{ème} jour (DO < 0,14).

Généralement, le couple EC1-KO1 montre une capacité modérée de production du biofilm. Cette capacité a connu une diminution importante après 16 jours de contact avec 3200 µg/ml d’hespéridine. Le couple EC2-KO2 a également donné des DO < 0,2 en présence de 3200 et 6400 µg/ml d’hespéridine après 21 jours de contact (Fig. 11).

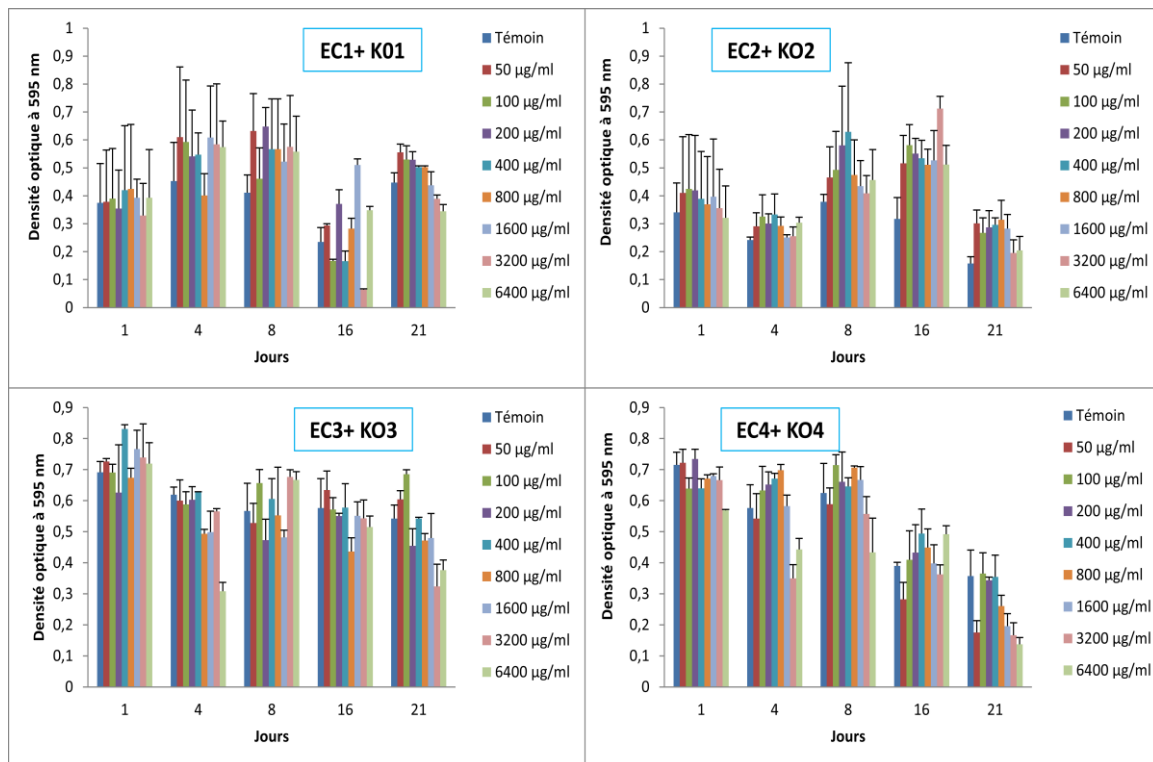


Figure 11: Capacité de formation de biofilm mixte (*Escherichia coli* – *Klebsiella oxytoca*) à la température 37°C et en présence d’hespéridine.

Les maladies associées aux biofilms sont devenues de plus en plus trop complexes pour être traitées avec les remèdes antimicrobiens conventionnels disponibles dans les pratiques de soins de santé (**Koo et al., 2017**). *Escherichia coli* est une des espèces les plus fréquemment impliquées dans ces maladies du fait que leur biofilm lui confèrent la capacité d’être jusqu’à mille fois plus résistantes aux antibiotiques et d’échapper à l’action du système immunitaire de l’hôte (**Ballén et al., 2022**). C’est pourquoi diverses stratégies ont été orchestrées pour remédier aux complications graves liées aux biofilms. À cet égard, les produits naturels, à savoir les flavonoïdes, ont été suggérés en raison de leurs effets pharmacologiques polyvalents pour traiter ce problème (**Shamsudin et al., 2022**).

La présente étude montre que l’hespéridine, un flavonoïde naturel, n’a qu’un faible pouvoir anti-biofilm vis-à-vis des biofilms d’*E.coli* en mono- et en double-espèces. Globalement, se pourvoir a été observé après des longues durées et avec différentes concentrations (AV1, $p < 0,05$). En revanche, notre espèce bactérienne répond par une

adaptation qui augmente dans certains cas avec le temps. Nos résultats sont en concordance avec les travaux de **Vikram et al. (2010)** qui ont montré que l'hespéridine n'a pas un grand effet anti-biofilm d'*E. coli*. Par contre, **Yarmolinsky et al. (2023)** ont confirmé que les flavonoïdes, y compris l'hespéridine, ont inhibé d'une manière significative ($p < 0,001$) la formation du biofilm d'*E. coli* et que l'hespéridine a des propriétés anti-*quorum sensing*. **Pruteanu et al. (2022)** ont étudié les effets anti-biofilm de différents flavonoïdes végétaux sur différents types de biofilms formés par des bactéries Gram négatives et Gram positives. Ils ont montré que les flavones et les flavonols testés réduisent la morphogénèse des macrocolonies d'*E. coli*, ce qui indique une diminution de la formation de la matrice dans ces biofilms par l'inhibition de la formation de fibres amyloïdes curli (agrégat de protéines constituant des fibrilles extracellulaires servant à promouvoir le comportement de la communauté cellulaire par la formation de biofilm dans la matrice extracellulaire).

L'instabilité de l'effet de l'hespéridine pourrait s'expliquer d'une part par l'interaction de la molécule et la souche bactérienne ainsi que les différents facteurs environnementaux tels que l'abondance des nutriments, le pH et la température, et d'autre part, par la résistance des souches d'*E. coli*. **Choi et al. (2022)** ont rapporté que le changement de solubilité de l'hespéridine pouvait affecter leurs efficacités biologiques. **Agarwal et al. (2011)** ont montré que les biofilms de différentes souches d'un même genre peuvent se comporter différemment même s'ils sont incubés dans les mêmes conditions, de telles observations ont été attribuées à des variations de sérovars, à l'origine des souches ou à des mutations dans les gènes qui contrôlent les biofilms.

La capacité de formation des biofilms de nos isolats remarquée après une diminution importante des densités optiques, confirme que nos souches ont développé des mécanismes d'adaptation à l'hespéridine. Et comme il a été signalé précédemment, ces résultats peuvent être s'expliquer par le fait que *E. coli* a d'une part la capacité à résister aux flavonoïdes ce qui est confirmé par les études de **Santas et al. (2010)** et **Ulanowska et al. (2007)** qui ont trouvé que les Gram négatives y compris *E. coli* étaient plus résistants que les bactéries Gram positives à l'effet des flavonoïdes, ce qui peut être attribué à l'effet protecteur de la couche de lipopolysaccharides. D'autre part, *E. coli* à plusieurs propriétés qui l'aident à former des biofilms même en présence des agents antibactériens comme l'hespéridine. **Wojnicz et al.**

(2012) ont montré que deux isolats cliniques d'*E. coli* étaient producteurs de biofilms en présence de sub-CMIs, CMI et 0,75 CMI des extraits végétaux. Ils ont noté aussi que les fimbriae permettent à cette bactérie de coloniser et de produire un biofilm et en outre de résister aux agents antibactériens. **Bekri et Racelma (2015)** ont confirmé que plusieurs souches d'*E. coli* exposées aux extraits des plantes médicinales ont une capacité de formation d'un biofilm via l'implication des molécules adhésifs, à savoir des flagelles, des fimbriae ou pili (type 1), des pili de conjugaison, des curli, des polysaccharides de la surface bactérienne (LPS et capsules) et des protéines membranaires.

En ce qui concerne le biofilm mixte, la présente étude montre que le couple *E.coli* et *K. oxytoca* peut être un meilleur producteur de biofilm ce qui est représenté par les couples EC3-KO3 et EC4-KO4, comme il peut présenter un potentiel plus faible par rapport aux biofilms en mono-espèces (le cas des couples EC1-KO1 et EC2-KO2). Les conditions qui permettent la formation d'un biofilm mixte ne sont pas clairement établies mais **Nielsen et al. (2000)** ont suggéré que la mixité des populations est en partie dépendante de la nourriture. **Chitlapilly Dass et al. (2020)** ont rapporté que les biofilms mixtes se forment dans le milieu grâce à des interactions synergiques au sein de la communauté microbienne, par le biais de réponses adaptatives mutuelles à leur coexistence à long terme. Selon **Wang et al. (2021)**, la mobilité et les flagelles d'*E. coli* jouent un rôle important dans l'interaction synergique et la co-agrégation avec d'autres espèces microbiennes. En revanche, **Juarez et Galvan (2018)** ont élucidé les interactions compétitives entre *Klebsiella* et *E. coli* dans les biofilms d'espèces mixtes. Les interactions entre ces deux micro-organismes ont été étudiées sur une période de neuf jours par comptage des unités formatrices de colonies et par microscopie confocale à balayage laser. Les résultats suggèrent que *Klebsiella* est plus efficace qu'*E. coli* pour se développer dans des milieux où la disponibilité en fer est limitée. Aussi, ils ont montré qu'au sein d'un biofilm hétérogène, le genre *Klebsiella* a induit un effet néfaste sur *Escherichia coli*, qui se traduit par une compétition des nutriments. Des résultats similaires ont été également mis en évidence par **Galvan et al. (2016)**, qui ont expliqué la réduction du nombre de cellules d'*E. coli* cultivables dans les biofilms à deux espèces par l'hypothèse du détachement cellulaire favorisé par l'association avec *Klebsiella* et l'existence d'un probable effet du *Klebsiella* sur la souche étudiée. Cela peut être justifié par la

production des métabolites et de polymères spécifiques conduisent à des activités antagonistes entre les deux espèces.

La résistance de nos biofilms mixtes à l'hespéridine pourrait s'expliquer par le fait que les biofilms peuvent présenter une résistance aux antimicrobiennes supérieures de trois fois ou plus à celle trouvée chez des cellules planctoniques de la même souche. De plus, une communauté bactérienne mixte constitue une forme de barrière supplémentaire par rapport aux biofilms monospécifiques en raison d'une certaine forme d'interaction synergique (**Klayman et al., 2009**). La diminution de la sensibilité aux antimicrobiens n'est pas liée à un seul mécanisme de résistance, mais à une synergie de plusieurs mécanismes comme le ralentissement de la pénétration des antimicrobiens par la matrice exopolysaccharidique et l'augmentation du transfert génétique au sein de biofilm (**Seghir et al., 2017**).

L'application du test T de Student montre qu'il existe des différences significatives entre les températures d'incubation ($p < 0,05$), donc ces dernières ont un effet direct sur la capacité de formation de biofilm chez *E. coli*. Plusieurs études sont similaires à nos résultats. **Prüb et al. (2010)** ont contrôlé la biomasse du biofilm produite par un ensemble de souches d'*E. coli* K-12 cultivées dans des combinaisons de conditions environnementales. Cette expérimentation a révélé que les deux conditions environnementales qui influencent le plus la formation du biofilm sont la composition du milieu de croissance et la température d'incubation. Plus précisément, la souche a formé la plus grande quantité de biofilm lorsqu'elle a été cultivée dans du TSB à 37 °C et par contre cette quantité a diminué à mesure que la température d'incubation augmentait et à mesure que la richesse du milieu diminuait de TSB à TB, tandis que la réduction de la température de 37 à 32 °C a encore diminué la biomasse du biofilm. **Hu et al. (2022)** ont étudié les effets du stress environnemental et des conditions nutritives sur la formation de biofilms d'*E. coli*. Leurs résultats ont montré que la capacité de formation de biofilm était la plus forte à 25 °C dans le milieu LB par rapport à l'incubation à 37 °C, trois gènes liés au biofilm (*csgD*, *dgcC* et *pfs*) ont été significativement régulés à la hausse et deux gènes (*flhC* et *flhD*) ont été régulés à la baisse température, ce qui a entraîné une diminution de la motilité. Cependant, la formation du biofilm était la plus forte dans le milieu M9 supplémenté en glucose à 37 °C, et le nombre de bactéries vivantes était le plus élevé. D'autres études ont rapporté que la formation de

biofilms était plus faible à 37 °C par rapport à ceux formés à des températures plus basses. Cette observation a été attribuée à l'épuisement rapide des nutriments, l'absence de biosynthèse du curli et à la diminution de la viscosité des exopolysaccharides à des températures d'incubation plus élevées (**Shatila et al., 2021 ; Wang et al., 2016**).

Le temps de contact avec l'agent anti-biofilm joue également un rôle important dans la capacité de formation d'un biofilm. Plusieurs études ont signalé que plus que la bactérie est résistante plus que la formation de biofilm augmente principalement avec l'augmentation de la durée de contact. Cependant, le temps nécessaire à la formation du biofilm peut varier en raison de l'interaction entre différents facteurs environnementaux tels que l'abondance des nutriments et la température (**Shatila et al., 2021**).

À l'issue de ce travail, il ressort que les souches d'*E. coli* isolées d'un environnement hospitalier sont considérées comme résistantes et capables à former des biofilms en mono-espèce et mixte en présence de l'héspéridine et à différentes températures. Donc, une limite de l'utilisation de l'héspéridine peut être discutée, il s'agit du risque de diminution de son activité antibactérienne en raison de résistances et la capacité de formation des biomasses.

Conclusion et Perspectives

Les résultats du suivi de l'effet de l'hespéridine sur la capacité de formation du biofilm d'*Escherichia coli*, ainsi que l'étude de son activité antibactérienne, permettent la mise en évidence de la conclusion suivante :

- L'hespéridine exerce une activité bactériostatique sur les souches d'*Escherichia coli* ;
- Le test d'adhésion confirme que l'hespéridine a un pouvoir anti-adhérence non négligeable surtout avec son CMI vis-à-vis de toutes les souches d'*E. coli* en enregistrant des taux d'adhésion inférieurs à 50 % ;
- Toutes les souches d'*E. coli*, isolées à partir d'un milieu hospitalier, ont la capacité de former un biofilm monospécifique et mixte en absence et en présence d'hespéridine ;
- Les cultures mixtes ont une capacité d'adhérer à une surface plus importante que celle des monocultures même en présence d'un agent anti-adhérence ;
- Le paramètre température semble avoir une influence importante sur la formation du biofilm ;
- À une température ambiante, l'hespéridine a montré un effet antibiofilm appréciable sur les biofilms en mono-espèces et mixtes (EC1, EC2, EC1-KO1 et EC2-KO2) ;
- À 37 °C, des pics de formation de biofilm ont été enregistrés chez le couple EC3-KO3 en présence de l'hespéridine ;
- L'instabilité de l'effet anti-biofilm de l'hespéridine en fonction des souches, des concentrations et des durées de contact.

En perspectives, il s'avère donc intéressant de prendre en considération dans le futur de :

- Faire une étude approfondie sur l'hespéridine visant à l'identification de leurs cibles d'interaction et de comprendre leurs mécanismes d'action avant d'en tirer des avantages thérapeutiques ;
- Étudier le mécanisme et les facteurs favorisant l'adhésion et le développement de biofilm chez *Escherichia coli* seule et en association avec *Klebsiella oxytoca* en présence de composés naturels anti-biofilms ;
- Étudier l'effet synergique possible entre les flavonoïdes et d'autres agents antibactériens comme les antibiotiques sur la formation de biofilm bactérien.

Références Bibliographiques

A

- Aalikhani, M., Safdari, Y., Jahanshahi, M., Alikhani, M., Khalili, M. (2022).** Comparison between hesperidin, coumarin, and deferoxamine iron chelation and antioxidant activity against excessive iron in the iron overloaded mice. *Frontiers in Neuroscience*, 15: 1902.
- Adamczak, A., Ożarowski, M., Karpiński, T. M. (2020).** Curcumin, a Natural Antimicrobial Agent with Strain-Specific Activity. *Pharmaceuticals*, 13(7): 153.
- Agarwal, R., Singh, S., Bhilegaonkar, K. N., Singh, V. (2011).** Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*, 18: 1493-1498.
- Albrecht, U. W., Madisch, A. (2022).** Therapeutic potentials associated with biological properties of Juniper berry oil (*Juniperus communis* L.) and its therapeutic use in several diseases—A Review. *Bioactive Compounds in Health and Disease*, 5(9): 174-185.
- Ali, A. M., Abdel-Gabbar, M., Abdel-Twab, S. M., Fahmy, E. M., Ebaid, H., Alhazza, I. M., Ahmed, O. M. (2020).** Antidiabetic potency, antioxidant effects, and mode of actions of Citrus reticulata fruit peel hydroethanolic extract, hesperidin, and quercetin in nicotinamide/streptozotocin-induced Wistar diabetic rats. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020: 1-21.
- Alotaibi, G. F., Bukhari, M. A. (2021).** Factors influencing bacterial biofilm formation and development. *Am. J. Biomed. Sci. Res*, 12(6): 617-626.
- Amankwah, S., Abdella, K., Kassa, T. (2021).** Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents. *Nanotechnology, Science and Applications* : 161-177.
- Ansari, F. A., Jafri, H., Ahmad, I., Abulreesh, H. H. (2017).** Factors affecting biofilm formation in in vitro and in the rhizosphere. *Biofilms in plant and soil health*: 275-290.

B

- Babayi, H., Kolo, I., Okogun, J. I., & Ijah, U. J. J. (2004).** The antimicrobial activities of methanolic extracts of *Eucalyptus camalctulensis* and *Terminalia catappa* against some pathogenic microorganisms.
- Ballén, V., Cepas, V., Ratia, C., Gabasa, Y., Soto, S. M. (2022).** Clinical *Escherichia coli* : From Biofilm Formation to New Antibiofilm Strategies. *Microorganisms*, 10(6), Article 6.
- Basli, A., Chibane, M., Madani, K., Oukil, N. (2012).** Activité antibactérienne des polyphénols extraits d'une plante médicinale de la flore d'Algérie: *Origanum glandulosum* Desf. *Phytothérapie*, 10(1): 2-9.
- Bekri, K., Racelma, K. (2015).** Sensibilité de quelques microorganismes uropathogenes vis-à-vis d'extraits de feuilles d'ortie, géranium et sous produits de l'olivier. [Thesis, Université Mouloud Mammeri].
- BERREGHIOUA, A. (2016).** Investigation phytochimique sur des extraits bioactifs de deux Brassicaceae médicinales du sud Algérien: *Moricandia arvensis* et *Zilla macroptera*. Thèse de Doctorat en Chimie, Université de Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Algérie.

- Bidet, P. (2019).** Rapport scientifique : *Escherichia coli* / *Shigelle*. Société Française de Microbiologie.
- Borges, A., Saavedra, M. J., Simoes, M. (2015).** Insights on Antimicrobial Resistance, Biofilms and the Use of Phytochemicals as New Antimicrobial Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 22(21): 2590-2614.
- Bruneton, J. (1999).** pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3^{ème} Édition. tec & Doc(Ed). Paris, 575.
- Bush, L. M., Vazquez-Pertejo, M. T. (2022).** Infections par *Escherichia coli*. Edition professionnelle du Manuel MSD.

C

- Camps, M. (2011).** Bio-essais anti-adhésion sur bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling. Thèse de Doctorat en Biologie marine, Université de Toulon, France. 42p
- Chitlapilly Dass, S., Bosilevac, J. M., Weinroth, M., Elowsky, C. G., Zhou, Y., Anandappa, A., Wang, R. (2020).** Impact of mixed biofilm formation with environmental microorganisms on *E. coli* O157: H7 survival against sanitization. *npj Science of Food*, 4(1): 16.
- Choi, S.-S., Lee, S.-H., Lee, K.-A. (2022).** A Comparative Study of Hesperetin, Hesperidin and Hesperidin Glucoside : Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antibacterial Activities In Vitro. *Antioxidants*, 11(8), Article 8.
- Clave, D. (2015).** FICHE TECHNIQUE : *Escherichia coli*. TOULOUSE, Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique.
- Çöplü, N., Şimşek, H., Gür, D., Gözalan, A., Hasdemir, U., Gülay, Z., Bayramoğlu, G., Aydemir, Ş., Gürler, N., Eyigör, M., Perçin, D., Aktaş, D. (2018).** The First Results of National Antimicrobial Resistance Surveillance System in Turkey. *Turk Hij Den Biyol Derg*, 75(4): 333-344.
- Crémet, L., Corvec, S., Batard, E., Auger, M., Lopez, I., Pagniez, F., Dauvergne, S., Caroff, N. (2013).** Comparison of three methods to study biofilm formation by clinical strains of *Escherichia coli*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3): 252-255.

D

- Da Re, S., Le Quéré, B., Ghigo, J. M., Beloin, C. (2007).** Tight modulation of *Escherichia coli* bacterial biofilm formation through controlled expression of adhesion factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(10): 3391-3403.
- Dale, A. P., Woodford, N. (2015).** Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *Journal of Infection*, 71(6): 615-626.
- Damte, D., Gebru, E., Lee, S. H., Suh, J., Park, S. (2013).** Evaluation of Anti-Quorum Sensing Activity of 97 Indigenous Plant Extracts From Korea through Bioreporter Bacterial Strains *Chromobacterium violaceum* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 05(02).
- De, S., Dey, Y. N., Ghosh, A. K. (2010).** Phytochemical investigation and chromatographic evaluation of the different extracts of tuber of *Amorphophallus paeoniifolius* (Araceae). *Int J Pharm Biol Res*, 1(5): 150-7.

- Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Technique et Documentation*. p: 289- 476.
- Dheilly, A., Soum-Soutéra, E., Klein, G. L., Bazire, A., Compère, C., Haras, D., Dufour, A. (2010).** Antibiofilm activity of the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. strain 3J6. *Applied and environmental microbiology*, 76(11): 3452-3461.
- Dias, M. C., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S. (2021).** Plant flavonoids: Chemical characteristics and biological activity. *Molecules*, 26(17): 5377.
- Djahra, A. B., Bordjiba, O., Benkherara, S. (2015).** Activité antibactérienne des flavonoïdes d'une plante médicinale spontanée *Marrubium vulgare* L. de la région d'El Tarf (Nord-Est Algérien). *Synthèse: Revue des Sciences et de la Technologie*, 24: 29-37.
- Djerarda, H., Boussaidia, G., Bouafia, S. (2022).** Etude De L'activité Antioxydante Et Antibactérienne Des Extraits Et De L'huile Essentielle Des Racines De *Thapsia Garganica*.
- Donadio, G., Mensitieri, F., Santoro, V., Parisi, V., Bellone, M. L., De Tommasi, N., Izzo, V., Dal Piaz, F. (2021).** Interactions with Microbial Proteins Driving the Antibacterial Activity of Flavonoids. *Pharmaceutics*, 13(5), Article 5.

E

- Emeraux, E. (2019).** Propriétés biologiques des flavonoïdes: étude bibliographique et évaluation de l'activité antioxydante. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université de Lorraine, France.
- EN ISO 20776-1 (2019).** Sensibilité in vitro des agents infectieux et évaluation des performances des dispositifs pour antibiogrammes — Partie 1: Méthode de référence de microdilution en bouillon pour la détermination de la sensibilité in vitro aux agents antimicrobiens des bactéries aérobies à croissance rapide impliquées dans les maladies infectieuses. Valable sur : iso.org/fr

F

- Faner, R., Sibila, O., Agusti, A., Bernasconi, E., Chalmers, J. D., Huffnagle, G. B., Manichanh, C., Molyneaux, P. L., Paredes, R., Brocal, V. P., Ponomarenko, J., Sethi, S., Dorca, J., Monsó, E. (2017).** The microbiome in respiratory medicine: current challenges and future perspectives. *The European Respiratory Journal*, 49(4): 1602086.
- Farhadi, F., Khameneh, B., Iranshahi, M., Iranshahy, M. (2019).** Antibacterial activity of flavonoids and their structure–activity relationship: An update review. *Phytotherapy Research*, 33(1): 13–40.
- Fathima, A., Arafath, Y., Hassan, S., Prathiviraj, R., Kiran, G. S., Selvin, J. (2023).** Microbial biofilms: A persisting public health challenge. In *Understanding Microbial Biofilms* (pp. 291-314). Academic Press.
- Filloux, A., Vallet, I. (2003).** Biofilm : Mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *médecine/sciences*, 19(1), Article 1.
- Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biochimie, Université de Toulon, France. 76p.

Frolov, N., Detusheva, E., Fursova, N., Ostashevskaya, I., Vereshchagin, A. (2022). Microbiological evaluation of novel bis-quaternary ammonium compounds: clinical strains, biofilms, and resistance study. *Pharmaceuticals*, 15(5): 514.

G

Galván, E. M., Mateyca, C., Ielpi, L. (2016). Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed in vitro by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*, 32(9): 1067-1077.

Ganeshpurkar, A., Saluja, A. (2019). The pharmacological potential of hesperidin.

Garza-González, E., Morfin-Otero, R., Mendoza-Olazarán, S., Bocanegra-Ibarias, P., Flores-Treviño, S., Rodríguez-Noriega, E., Ponce-De-León, A., Sanchez-Francia, D., Franco-Cendejas, R., Arroyo-Escalante, S., Velázquez-Acosta, C., Rojas-Larios, F., Quintanilla, L. G., Maldonado-Anicacio, J. Y., Martínez-Miranda, R., Ostos-Cantú, H. L., Gomez-Choel, A., Jaime-Sanchez, J. L., Aviles-Benitez, L. K., . . . Camacho-Ortiz, A. (2019). A snapshot of antimicrobial resistance in Mexico. Results from 47 centers from 20 states during a six-month period. *PLOS ONE*, 14(3), e0209865.

Guiraud J. (2003). Microbiologie alimentaire. Dunod. p : 185-265.

H

Hadj Salem, J. (2009). Extraction, identification, caractérisation des activités biologiques de flavonoïdes de *Nitraria retusa* et synthèse de dérivés acyles de ces molécules par voie enzymatique. Thèse de doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires, Institut National Polytechnique de Lorraine, France.

Hancock, V., Dahl, M., Klemm, P. (2010). Abolition of Biofilm Formation in Urinary Tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* Isolates by Metal Interference through Competition for Fur. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(12): 3836-3841.

Heller, W., Forkmann, G. (1993). Biosynthesis of flavonoïds . In: The flavonoïds: Advances in research since 1986. Chapman and Hall. London: 499-535.

Homayouni, F., Haidari, F., Hedayati, M., Zakerkish, M., Ahmadi, K. (2018). Blood pressure lowering and anti-inflammatory effects of hesperidin in type 2 diabetes; a randomized double-blind controlled clinical trial. *Phytotherapy Research*, 32(6): 1073-1079.

Hu, J., Lv, X., Niu, X., Yu, F., Zuo, J., Bao, Y., Yin, H., Huang, C., Nawaz, S., Zhou, W., Jiang, W., Chen, Z., Tu, J., Qi, K., Han, X. (2022). Effect of nutritional and environmental conditions on biofilm formation of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(6): 4236-4251.

Hufnagel, D. A., Depas, W. H., Chapman, M. R. (2015). The biology of the *Escherichia coli* extracellular matrix. *Microbiology spectrum*, 3(3): 3-3.

I

Ito, A., Taniuchi, A., May, T., Kawata, K., Okabe, S. (2009). Increased Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* in Mature Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(12): 4093–4100.

J

- Jacry, C. (2021).** Découverte de nouvelles molécules antibiotiques et caractérisation de leurs modes d'action. Thèse de Doctorat en Science, Université Paris-Saclay, France.
- Joffin J.N. et G. Leyral (2014).** Microbiologie technique. Tome 1 : Dictionnaire des techniques, (CRDPA).Ed. Scérène.368 p.
- Joly, B., Reynaud, A. (2009).** Entérobactéries - systématique et méthodes de diagnostic. Paris: Edition Médicales internationales.
- Juarez, G. E., Galván, E. M. (2018).** Role of nutrient limitation in the competition between uropathogenic strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in mixed biofilms. *Biofouling*, 34(3): 287-298.
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Abdullah, N. B., Fatima, A. (2021).** Review on the antibacterial mechanism of plant-derived compounds against multidrug-resistant bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021: 1-30.

K

- Kaesbohrer, A., Bakran-Lebl, K., Irrgang, A., Fischer, J., Kämpf, P., Schiffmann, A., Werckenthin, C., Busch, M., Kreienbrock, L., Hille, K. (2019).** Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. *Veterinary Microbiology*, 233: 52-60.
- Kelouili, A. F., Bouchentouf, Z. (2018).** Polyphénols et activité antioxydante de l'Aloe Vera.
- Klayman, B. J., Volden, P. A., Stewart, P. S., Camper, A. K. (2009).** *Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell. *Environmental Science & Technology*, 43(6): 2105-2111.
- Köksal Karayıldırım, Ç. (2017).** Characterization and in vitro Evolution of Antibacterial Efficacy of Novel Hesperidin Microemulsion . *Celal Bayar University Journal of Science* , 13 (4): 943-947.
- Koné, K. P. F. O. (2018).** Applications des techniques de chromatographie et de spectroscopie dans l'identification des métabolites secondaires de trois plantes antidiabétiques et antihypertensives de la pharmacopée ivoirienne. Thèse de Doctorat en Science, Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny, Côte d'Ivoire.
- Koo, H., Allan, R. N., Howlin, R. P., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. (2017).** Targeting microbial biofilms : Current and prospective therapeutic strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 15(12), Article 12.

L

- Lamret, F., Colin, M., Mongaret, C., Gangloff, S. C., Reffuveille, F. (2020).** Antibiotic tolerance of *Staphylococcus aureus* biofilm in periprosthetic joint infections and antibiofilm strategies. *Antibiotics*, 9(9): 547.
- Lee, K. A., Moon, S. H., Kim, K. T., Mendonca, A. F., Paik, H. D. (2010).** Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157: H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Science and Biotechnology*, 19: 257-261.

- Lhuillier, A. (2007).** Contribution à l'étude phytochimique de quatre plantes malgaches: *Agauria salicifolia* Hook. f ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (Ericaceae), *Tambourissa trichophylla* Baker (Monimiaceae) et *Embelia concinna* Baker (Myrsinaceae). Thèse de Doctorat en Transferts, Dynamique des Fluides, Energie et Procédés, L'institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Li, X. H., Lee, J. H. (2017).** Antibiofilm agents: A new perspective for antimicrobial strategy. *Journal of Microbiology*, 55: 753-766.
- Lugasi, A. (2003).** The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases. *Acta biologica szegediensis*, 47(1-4): 119-125.

M

- M'Hiri, N. (2015).** Étude comparative de l'effet des méthodes d'extraction sur les phénols et l'activité antioxydante des extraits des écorces de l'orange «Maltaise demi sanguine» et exploration de l'effet inhibiteur de la corrosion de l'acier au carbone. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques et Procédés Biotechnologiques et Alimentaires, Université de Lorraine, France.
- Mansour, S. (2015).** Evaluation de l'effet anti inflammatoire de trois plantes médicinales: *Artemisia absinthium* L, *Artemisia herba alba* Asso et *Hypericum scarboides*, Étude in vivo. Thèse de Doctorat en Science, Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf, Algérie.
- Marfak, A. (2003).** Radiolyse gamma des flavonoïdes, Etude de leur réactivité avec les radicaux issus des alcools: formation de depsides, thèse de doctorat, Limoges.
- Mas-Capdevila, A., Teichenne, J., Domenech-Coca, C., Caimari, A., Del Bas, J. M., Escoté, X., Crescenti, A. (2020).** Effect of hesperidin on cardiovascular disease risk factors: The role of intestinal microbiota on hesperidin bioavailability. *Nutrients*, 12(5): 1488.
- Masson, J. (2015, June 22).** Le cuivre sur les surfaces en milieu de santé pour lutter contre les infections nosocomiales.
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., Forestier, C. (2016).** Anti-biofilm activity as a health issue. *Frontiers in microbiology*, 7: 592.
- Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., Khan, J. (2020).** Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11: 566325.
- MOUFFOUK, C. (2019).** Evaluation des activités biologiques et étude de la composition chimique de la plante *Scabiosa stellata* L. Thèse de Doctorat en Science, Université de Batna 2, Algérie.

N

- Nakao, R., Myint, S. L., Wai, S. N., Uhlin, B. E. (2018).** Enhanced biofilm formation and membrane vesicle release by *Escherichia coli* expressing a commonly occurring plasmid gene, *kil*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2605.
- Nielsen, A. T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K. B., Molin, S. (2000).** Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environmental microbiology*, 2(1): 59-68.

Noyce, J. O., Michels, H., Keevil, C. W. (2006). Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *Journal of Hospital Infection*, 63(3): 289-297.

O

Ong, K. S., Mawang, C. I., Daniel-Jambun, D., Lim, Y. Y., Lee, S. M. (2018). Current anti-biofilm strategies and potential of antioxidants in biofilm control. *Expert review of anti-infective therapy*, 16(11): 855-864.

P

Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig*, 25(1): 31-42.

Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4): 6-4.

Prüß, B. M., Verma, K., Samanta, P., Sule, P., Kumar, S., Liu, T., Christianson, D. W., Horne, S. M., Stafslie, S. J., Wolfe, A. J., Denton, A. (2010). Environmental and genetic factors that contribute to *Escherichia coli* K-12 biofilm formation. *Archives of Microbiology*, 192(9): 715–728.

Pruteanu, M., Hernández Lobato, J. I., Stach, T., Hengge, R. (2020). Common plant flavonoids prevent the assembly of amyloid curli fibres and can interfere with bacterial biofilm formation. *Environmental Microbiology*, 22(12): 5280-5299.

Purushothaman, B., PrasannaSrinivasan, R., Suganthi, P., Ranganathan, B., Gimbin, J., Shanmugam, K. (2018). A Comprehensive Review on *Ocimum basilicum*. *Journal of Natural Remedies*, 18(3): 71-85

Pyrzynska, K. (2022). Hesperidin: A review on extraction methods, stability and biological activities. *Nutrients*, 14(12): 2387.

Q

Qian, W., Li, X., Yang, M., Liu, C., Kong, Y., Li, Y., Wang, T., Zhang, Q. (2022). Relationship Between Antibiotic Resistance, Biofilm Formation, and Biofilm-Specific Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Ningbo, China. *Infection and Drug Resistance*, 15: 2865-2878.

Quintal Martínez, J. P., & Segura Campos, M. R. (2023). Flavonoids as a therapeutical option for the treatment of thrombotic complications associated with COVID-19. *Phytotherapy Research*, 37(3): 1092-1114

R

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future medicinal chemistry*, 7(4): 493-512.

Ramesh, P., Jagadeesan, R., Sekaran, S., Dhanasekaran, A., Vimalraj, S. (2021). Flavonoids: classification, function, and molecular mechanisms involved in bone remodelling. *Frontiers in Endocrinology*, 1564.

Ribeiro, S. M., Felício, M. R., Boas, E. V., Gonçalves, S., Costa, F. F., Samy, R. P., Santos, N. C., Franco, O. L. (2016). New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, 160: 133-144.

S

- SAIDI, I. (2019).** Caractérisation et valorisation d'une plante de la famille des fabaceae: *Gleditsia triacanthos* de la région de Sidi Bel Abbès: Extraction des substances bioactives. Thèse de Doctorat en Enzymes, Micro-organismes et Bio-industries, Université DJILLALI LIABÈS de Sidi Bel Abbès, Algérie.
- Santas, J., Almajano, M. P., Carbó, R. (2010).** Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. *International journal of food science & technology*, 45(2): 403-409.
- Santos, A. L. S. D., Galdino, A. C. M., Mello, T. P. D., Ramos, L. D. S., Branquinha, M. H., Bolognese, A. M., Columbano Neto, J., Roudbary, M. (2018).** What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 113, e180212.
- Sarbu, L. G., Bahrin, L. G., Babii, C., Stefan, M., Birsa, M. L. (2019).** Synthetic flavonoids with antimicrobial activity : A review. *Journal of Applied Microbiology*, 127(5): 1282-1290.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., Bjarnsholt, T. (2022).** The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10): 608-620.
- Schellhorn, H. E. (2020).** Function, Evolution, and Composition of the RpoS Regulon in *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 11.
- Seghir, A., Boucherit-Otmani, Z., Sari-Belkharroubi, L., Boucherit, K. (2017).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (*Candida* – bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal De Mycologie Medicale*, 27: 20-27.
- Shamsudin, N. F., Ahmed, Q. U., Mahmood, S., Ali Shah, S. A., Khatib, A., Mukhtar, S., Alsharif, M. A., Parveen, H., Zakaria, Z. A. (2022).** Antibacterial Effects of Flavonoids and Their Structure-Activity Relationship Study : A Comparative Interpretation. *Molecules*, 27(4), Article 4.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., Gabrani, R. (2016).** *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2): 309–319.
- Shatila, F., Yaşa, İ., Yalçın, H. T. (2021).** Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Strains. *Current Microbiology*, 78(4): 1150-1158.
- Smati, M., Clermont, O., Bleibtreu, A., Fourreau, F., David, A., Daubié, A.-S., Hignard, C., Loison, O., Picard, B., Denamur, E. (2015).** Quantitative analysis of commensal *Escherichia coli* populations reveals host-specific enterotypes at the intra-species level. *MicrobiologyOpen*, 4(4): 604-615.
- Suttasattakrit, K., Khamkeaw, A., Tangwongsan, C., Pavasant, P., Phisalaphong, M. (2021).** Ionic Silver and Electrical Treatment for Susceptibility and Disinfection of *Escherichia coli* Biofilm-Contaminated Titanium Surface. *Molecules* : 27(1): 180.

T

- Tenaillon, O., Barrick, J. E., Ribeck, N., Deatherage, D. E., Blanchard, J. L., Dasgupta, A., Wu, G. C., Wielgoss, S., Cruveiller, S., Médigue, C., Schneider, D., Lenski, R. E. (2016).** Tempo and mode of genome evolution in a 50,000-generation experiment. *Nature*, 536(7615): 165–170.

Tortora, G., Funke, B., Case, C. (2011). Introduction à la microbiologie .2eme Edition .Québec.Pearson .Edition du renouveau pédagogique INC.420-421 P.

Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1): 7-12.

U

Ulanowska, K., Majchrzyk, A., Moskot, M., Jakóbkiewicz-Banecka, J., Węgrzyn, G. (2007). Assessment of antibacterial effects of flavonoids by estimation of generation times in liquid bacterial cultures. *Biologia*, 62(2): 132–135.

V

Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., Jesudhasan, P. R., Pillai, S. D., Patil, B. S. (2010). Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2): 515-527.

W

Wang, H., Li, F., Xu, L., Byun, H., Fan, J., Wang, M., Li, M., Zhu, J., Li, B. (2021). Contributions of *Escherichia coli* and its motility to the formation of dual-species biofilms with *Vibrio cholerae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(18).

Wang, J., Stanford, K., McAllister, T. A., Johnson, R. P., Chen, J., Hou, H., Zhang, G., Niu, Y. D. (2016). Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 Shiga toxin–producing *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease*, 13(6): 316-324.

Wang, S., Wang, C., Gao, L., Cai, H., Zhou, Y., Yang, Y., Xu, C., Ding, W., Chen, J., Ishfaq, M., Chen, X., He, X., Liu, D., Li, Y. (2017). Rutin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation by affecting CPS biosynthesis. *Frontiers in Pharmacology*, 8: 379.

Wang, Z. L., Wang, S., Kuang, Y., Hu, Z. M., Qiao, X., Ye, M. (2018). A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*. *Pharmaceutical biology*, 56(1): 465-484.

Wojnicz, D., Sycz, Z., Walkowski, S., Gabrielska, J., Aleksandra, W., Alicja, K., Sokół-Łętowska, A., Hendrich, A. B. (2012). Study on the influence of cranberry extract Żuravit S· O· S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine*, 19(6): 506-514.

X

Xiao, S., Liu, W., Bi, J., Liu, S., Zhao, H., Gong, N., Xing, D., Gao, H., Gong, M. (2018). Anti-inflammatory effect of hesperidin enhances chondrogenesis of human mesenchymal stem cells for cartilage tissue repair. *Journal of inflammation*, 15: 1-8.

Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., Ren, L. (2015). Antibacterial Activities of Flavonoids : Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1): 132-149.

γ

- Yarmolinsky, L., Nakonechny, F., Budovsky, A., Zeigerman, H., Khalfin, B., Sharon, E., Yarmolinsky, L., Ben-Shabat, S., Nisnevitch, M. (2023).** Antimicrobial and Antiviral Compounds of *Phlomis viscosa* Poiret. *Biomedicines*, 11(2), Article 2.
- Youla, A., Latrous, I. (2017).** Contribution à l'étude phytochimique des flavonoïdes chez l'espèce (*Melissa Officinalis* L.) et évaluation de leur pouvoir antibactérien.

Annexe

1. Composition des milieux de culture et colorant (Camille, 2014 ; www.grosseron.com)

- **Bouillon Tryptone-Soja (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone de caséine (bovin)	17 g
Peptone de soja	3,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
phosphate bipotassique	2,5 g
Glucose	2,5 g

pH = 7,3 ± 0,2/ autoclavage 15min à 121°C.

- **Bouillon Mueller-Hinton (g/ litre d'eau distillée)**

Extrait de viande	2,0 g
Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Amidon soluble	1,5 g

pH = 7,4 ± 0,1/ autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

- **Gélose Mueller Hinton (g/ litre d'eau distillée)**

Hydrolysate acide de caséine	17,5 g
Infusion de viande	2,0 g
Amidon soluble	1,5 g
Agar	17 g

pH = 7,3 ± 0,1/ autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

- **Solution de cristal violet**

Cristal violet	2,0 g
Ethanol	20 mL
Oxalate d'ammonium	0,8 g
Eau distillée	80 mL

2. Galerie biochimique miniaturisé API 20 E.

Tableau 09: Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E

(Source: <http://www.biomerieux.com>).

Type de l'API	Caractéristiques	Préparation Galerie/inoculum	Inoculation de la galerie	Lecture	Identification
API 20 E	<ul style="list-style-type: none"> - Comporte 20 tests - Destinée aux entérobactéries et à autre bacilles à Gram négatif. 	<ul style="list-style-type: none"> - Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ; - Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ; - Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile. 	<ul style="list-style-type: none"> - Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ; - Remplir uniquement les tubes des autres tests ; - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Lecture directe ou après addition de réactifs : se référant au tableau de lecture spécifique à l'API ; - Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun. - Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. Un nombre à 7 chiffres est obtenu, il sert de code d'identification. 	<p>L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification <i>apiweb</i>™.</p> <p>Enter manuellement au clavier le profil numérique à 7 chiffres.</p>

Tableau 10 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

(Source : <http://www.biomerieux.com>).

Test	Groupements active	Réactions / Enzymes	Résultats	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative incolore	Positive jaune
ADH	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge-Orangé
LDC	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ODC	L-Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
[CIT]	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Incolore	Rose
IVPI	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
[GELI]	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GLU tube)	Potassium nitrate	Production de NO2	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N2	Zn / 5 min	
			Orange-rouge	jaune
OF-O	glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
OF-F	glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune