

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 Biologiques  
Spécialité/Option : Microbiologie Appliquée  
Département : Écologie et Génie d'Environnement

### Thème

**Suivi de la formation de biofilm par *Escherichia coli*  
soumise à une exposition métallique : cas du zinc**

Présenté par :

- ZEROUEL Sarra
- ZOUAKRI Nesrine

Devant le jury :

Dr. ZEBSA R.  
Dr. AMRI S.  
Dr. BENHALIMA L.

Président  
Examinatrice  
Promotrice

Université de Guelma  
Université de Guelma  
Université de Guelma

Année universitaire 2021/2022

# *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.*

*Nous tenons particulièrement à remercier notre promotrice **Dr. BENHALIMA L.**, nous avons eu la chance de travailler parmi votre équipe et d'apprécier vos valeurs. Votre sérieuse et compétence, vos qualités scientifiques et pédagogiques nous ont énormément marqués.*

*Notre tâche n'aurait jamais été accomplie sans vos précieuse orientation. Merci beaucoup.*

*Grand merci à tous les enseignants et tous les personnes qui ont intervenu par leurs conseils et leurs savoirs, durant notre parcours académique.*

*Nous remercions vivement nos chers parents, qui ont toujours été là, pour leurs amours et leurs sacrifices pour nos études, leurs conseils, ainsi que pour leurs soutiens et générosité.*

*Aussi, nous remercions nos amis, nos familles, nos collègues qui ont toujours été à nos côtés.*

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
<b>Introduction</b>	<b>01</b>
<b>Chapitre I: Synthèse bibliographiques</b>	
I. Biofilm bactérien	03
I.1. Définition d'un biofilm	03
I.2. Mécanismes de formation d'un biofilm bactérien	03
I.2.1. Adhérence réversible	03
I.2.2. Adhérence irréversible	04
I.2.3. Formation des micro-colonies	04
I.2.4. Maturation du biofilm	04
I.2.5. Dispersion	05
I.3. Facteur favorisant la formation d'un biofilm bactérien	05
I.4. Stratégies anti-biofilm	06
II. Espèce bactérienne <i>Escherichia coli</i>	07
II.1. Taxonomie	07
II.2. Habitat	07
II.3. Caractères morphologiques et culturels	07
II.4. Caractères biochimiques	08
II.5. Caractères antigéniques	09
II.6. Pouvoir pathogène	09
II.7. Résistance aux agents antibactériens	11
II.8. Capacité de formation de biofilm	11
III. Zinc	12

III.1. Définition et utilisation du zinc	12
III.2. Interactions bactérie – zinc	13
III.3. Effet antibactérien du zinc sur les bactéries	14
III.4. Effet et réponse du biofilm bactérien au zinc	15
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes</b>	
I. Matériel biologique	17
I.1. Choix et origine des souches bactériennes	17
I.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes	17
I.2.1. Revivification des souches bactériennes	18
I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique des souches bactériennes	18
II. Etude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress du zinc	18
II.1. Préparation de différentes concentrations du zinc	19
II.2. Préparation des cultures bactériennes	19
II.3. Inoculation de la microplaque	19
II.4. Détermination du pouvoir adhérent	20
III. Analyse statistique	20
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion</b>	
I. Vérification de la pureté du matériel biologique	22
II. Etude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress du zinc	22
II.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce ( <i>Escherichia coli</i> )	22
II.2. Capacité de formation de biofilm mixte ( <i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella oxytoca</i> )	24
III. Discussion	26
<b>Conclusion et perspectives</b>	30
<b>Références bibliographiques</b>	31
<b>Annexe</b>	40

# Résumé

La présente étude a pour objectif la détermination de l'effet du zinc 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. Six concentrations d'oxyde de zinc et de chlorure de zinc allant de 25 à 800 µg/ml ont été testées. La formation de biofilm en mono-espèce et mixte (*E. coli* – *Klebsiella oxytoca* KO) a été évaluée. Les résultats obtenus montrent que la formation de biofilm en mono-espèce est forte pour les quatre souches durant les différentes périodes d'incubation et avec les deux formes du zinc testées. Des densités optiques  $\geq 0,8$  ont été enregistrées vis-à-vis de concentrations importantes du zinc (100 et 200 µg/ml). L'application du test T de Student confirme qu'il n'y a pas de différences significatives entre l'effet de ZnO et de ZnCl<sub>2</sub>. La production de biofilm mixte est plus élevée dans un milieu sans ZnO durant le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour pour le couple *E.coli* 1-KO. Par ailleurs, le couple *E.coli* 2-KO est fortement producteur de biofilm à partir du 1<sup>er</sup> jour, il montre une adaptation à toutes les concentrations du zinc. Une hyper-formation de biofilm a été remarquée chez le couple *E.coli* 3-KO au cours du 8<sup>ème</sup> jour d'incubation en présence de 25 µg/ml de ZnCl<sub>2</sub>. Le couple *E.coli* 4-KO semble adapter avec les différentes concentrations du zinc au cours de toute la durée d'incubation (DO > 0,24). La capacité de formation de biofilm par l'espèce *E.coli* en présence du zinc, agent antibactérien, peut constituer un grand problème de santé publique.

**Mots clés :** *Escherichia coli*, biofilm mon-espèce, biofilm mixte, zinc.

The aim of the present study was to determine the effect of zinc 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. Six zinc oxide and zinc chloride concentrations ranging from 25 to 800 µg/ml were tested. Single-species and mixed biofilm (*E. coli* - *Klebsiella oxytoca* KO) formation was evaluated. The results obtained show that single-species biofilm formation is strong for all four strains during the different incubation periods and with both forms of zinc tested. Optical densities > 0.8 were recorded against high concentrations of zinc (100 and 200 µg/ml). The application of Student's T-test confirms that there are no significant differences between the effect of ZnO and ZnCl<sub>2</sub>. The production of mixed biofilm is higher in a medium without ZnO during the 8th and 12th day for the *E.coli* 1-KO pair. On the other hand, the *E.coli* 2-KO pair is strongly biofilm producing from the first day; it shows an adaptation to all zinc concentrations. A hyper-formation of biofilm was noticed in the *E.coli* 3-KO pair during the 8th day of incubation in the presence of 25 µg/ml of ZnCl<sub>2</sub>. The *E.coli* 4-KO pair appears to adapt with different concentrations of zinc throughout the incubation period (OD > 0.24). The ability of *E.coli* species to form biofilm in the presence of zinc, an antibacterial agent, may constitute a major public health problem.

**Key words:** *Escherichia coli*, single-species biofilm, mixed biofilm, zinc.

تهدف هذه الدراسة الى تحديد تأثير الزنك على قدرة السلالة البكتيرية القولونية *Escherichia coli* (*E. coli*) لتكوين اغشية حيوية. تم اختبار قدرة أربع أنواع من هذه السلالة التي تم الحصول عليها من بيئة المستشفى بواسطة اختبار الالتصاق عن طريق التلوين بالبنفسج البلوري في صحيفة دقيقة. اختبرت ستة تراكيز من أكسيد وكلوريد الزنك تتراوح من 25 ال 800 ميكروغرام/ مليلتر. حيث قمنا بتقييم تكوين الاغشية الحيوية أحادية النوع و المختلطة (*E. coli - klebsiella*) (*oxytoca KO*). أظهرت النتائج ان تكوين الاغشية الحيوية الأحادية بصفة قوية للسلالات الأربعة خلال فترات زمنية مختلفة من الحضانة مع كلا أنواع الزنك المختبرة. سجلت كثافات بصرية  $\leq 0,8$  فيما يتعلق بتراكيز الزنك العالية 100 و200 ميكروغرام/ مليلتر. يبين تطبيق *T de student* انه لا يوجد اختلافات مهمة بين تأثير  $ZnCl_2$  و  $ZnO$ . تم تكوين غشاء حيوي مختلط النوع أكثر تطورا في وسط خالي من  $ZnO$  خلال اليوم الثامن والثاني عشر للثنائي *E. coli1 - KO* بالمقابل فان الثنائي *E. coli2 - KO* قام بتكوين كثيف للأغشية الحيوية من اليوم الأول، يظهر هذا الأخير تأقلماً مع مختلف تراكيز الزنك. لوحظ تكوين أكثر شدة لهذه الاغشية لثنائي *E. coli3 - KO* خلال اليوم الثامن من الحضانة في وجود 25 ميكروغرام/ مليلتر من  $ZnCl_2$ . اما الثنائي *E. coli4 - KO* يبدو متأقلم مع تراكيز الزنك المختلفة خلال فترة الحضانة ( $DO > 0,24$ ). ان قدرة تكوين الاغشية الحيوية من طرف *E. coli* في وجود الزنك، مضادا للبكتيريا، يعد مصدر لإحداث مشكلة كبيرة للصحة العامة.

**الكلمات المفتاحية:** *Escherichia coli*، غشاء حيوي احادي النوع، غشاء حيوي مختلط النوع، الزنك.



Figure	Titre	Page
<b>Figure 1</b>	Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérienne <b>(Lebeaux et Ghigo, 2012)</b> .	03
<b>Figure 2</b>	Différentes interactions entre métaux et bactéries <b>(Ledin, 2000)</b> .	14
<b>Figure 3</b>	Différentes étapes de l'action du zinc sur la cellule bactérienne et le biofilm <b>( Zaidi et al., 2018)</b> .	16
<b>Figure 4</b>	Etude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress du zinc.	21
<b>Figure 5</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC1.	22
<b>Figure 6</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC2.	22
<b>Figure 7</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC3.	23
<b>Figure 8</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC4.	23
<b>Figure 9</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC1- KO.	24
<b>Figure10</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC2- KO.	24
<b>Figure 11</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC3- KO.	25
<b>Figure 12</b>	Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC4- KO.	25

## Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
<b>Tableau 1</b>	Principaux caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> ( <b>Denis et al., 2011</b> ).	08
<b>Tableau 2</b>	Caractéristiques cliniques et pathologiques des maladies causées par les principaux pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> chez l'homme ( <b>El Achaoui, 2020 ; Mégane, 2019</b> ).	10
<b>Tableau 3</b>	Origine des souches d' <i>Escherichia coli</i> à étudier.	17
<b>Tableau 4</b>	Identification des souches d' <i>Escherichia coli</i> à étudier.	21
<b>Tableau 5</b>	Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E ( <b>Source: <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a></b> ).	41
<b>Tableau 6</b>	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E ( <b>Source : <a href="http://www.biomerieux.com">http://www.biomerieux.com</a></b> ).	42

# Introduction

Les biofilms qui sont des amas structurés de cellules bactériennes adhérentes à une surface éventuellement intégrées dans une matrice extracellulaire, protègent les bactéries et permettent leur survie dans des conditions environnementales hostiles (**Gomes et al., 2020**). La capacité à former un biofilm est actuellement reconnu comme un caractère propre à plusieurs micro-organismes. Il a été démontré qu'*Escherichia coli* se caractérise par l'existence des appendices extracellulaires (flagelle, curli, fimbriae, pili) qui sont essentiels à l'adhérence aux surfaces dans l'initiation de la formation de biofilms (**Wojnicz et al., 2012**). Ces derniers ont un effet positif sur la multiplication de l'écosystème bactérien mais négatif au niveau du système industriel, alimentaire et bien évidemment dans le secteur hospitalier en raison de leur rôle dans la propagation de certaines maladies infectieuses (**Bezoui, 2016**).

Selon des études antérieures, certains métaux ont un effet bénéfique dans les mécanismes de lutte contre les micro-organismes et la formation des biofilms. Le zinc est l'un des métaux prometteurs à exploiter comme un agent antibactérien et anti-biofilm. Il a la capacité d'induction du stress oxydatif générer par efflux de son ion ( $Zn^{2+}$ ) entraînant ainsi la réduction de la charge bactérienne et de biofilm (**Raghunath et al., 2017 ; Gaffet, 2011**). Cet élément est également reconnu par son efficacité contre le biofilm bactérien en ralentissant la cinétique de formation et réduisant la production de produits extracellulaires de la matrice (**Bispo et al., 2015**).

Les bactéries peuvent développer des systèmes de résistances aux métaux dans le but d'adaptation aux concentrations élevées et de la protection de leurs composants cellulaires sensibles. Dans le cas du zinc, certaines bactéries comme *Escherichia coli* pourraient être y résistantes en véhiculant des gènes codant pour maîtriser l'homéostasie à l'intérieur de la cellule (**Blencowe et al., 2003**). À cet égard, il y a une possibilité de former des biofilms en présence de ces agents antimicrobiens à partir de la persistance des bactéries planctoniques (**Abskharon et al., 2008**).

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur la capacité d'*Escherichia coli* isolée d'un milieu hospitalier, soumise à une exposition du zinc, à se multiplier et à former un biofilm dans le temps.

Par conséquent, nous nous sommes fixés deux objectifs majeurs :

- Evaluation de la capacité de l'espèce étudiée, exposée au zinc, à former un biofilm *in vitro* ;
- Détermination de l'effet antibactérien du zinc vis-à-vis de l'espèce à étudier.

Ce manuscrit s'organise autour de trois parties :

- La première partie constitue une synthèse bibliographique de notre sujet d'étude. Elle présente les caractéristiques structurales et fonctionnelles des biofilms bactériens, les caractères généraux de l'espèce bactérienne étudiée et une généralité sur le zinc ainsi que ces effets antibactériens.
- La deuxième est entièrement consacrée à la description de la méthodologie utilisée.
- La troisième 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.

# **Chapitre I :**

## **Synthèse**

### **Bibliographique**

## I. Biofilm bactérien

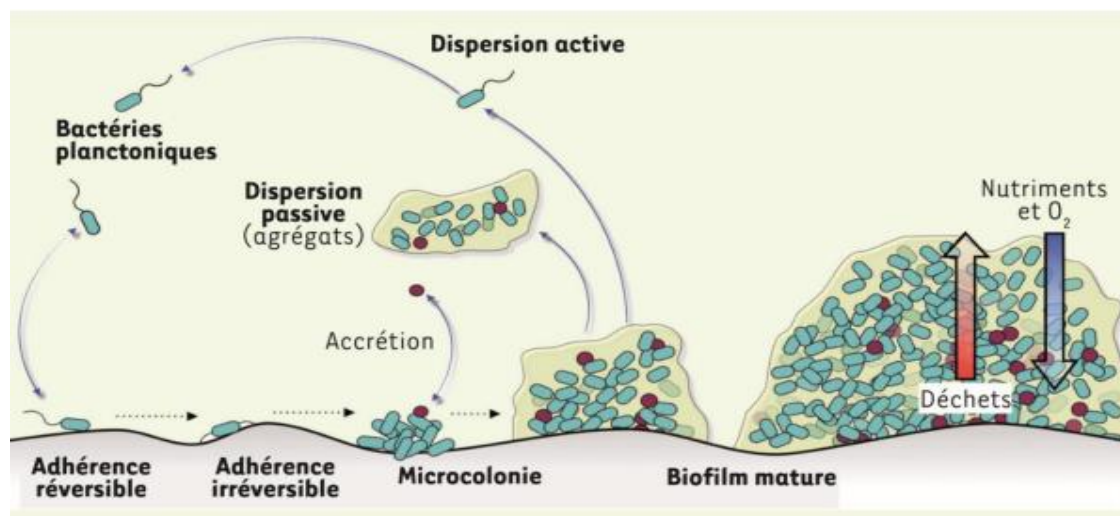
### I.1. Définition d'un biofilm

Le biofilm est un phénomène complexe se forme lorsque les micro-organismes flottants se fixent à une surface et se lient les uns aux autres, grâce à une pression environnementale telle qu'un manque d'oxygène et de nutriments (**Aumeran *et al.*, 2020**).

Au sein d'un biofilm, les bactéries vivent en communauté protégée par une matrice extracellulaire consiste en une agglomération de différents types de biopolymères (homo- et hétéro-polysaccharides, protéines, ADN), ce qui contribue à leur persistance dans un environnement difficile (**Cherifi, 2019**). Ce mode de vie facilite le transport des substances nutritives, de l'eau, des signaux de communication cellulaire et de l'oxygène et permet l'élimination des sous-produits nocive du métabolisme (**Donlan, 2002**).

### I.2. Mécanismes de formation d'un biofilm bactérien

Le cycle de vie du biofilm bactérien subdivise en cinq étapes majeures (Fig.1) :



**Figure 1** : Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

#### I.2.1. Adhérence réversible

L'adhésion réversible est une étape essentielle pour initier la formation d'un biofilm. Au début, les colonisateurs primaires (pionnières) collent sur la surface, cette adhésion est due à des interactions faibles entre la surface et les bactéries (interactions de type Van der Waals et électrostatiques). L'attachement bactérien implique le déplacement de la cellule

vers le lieu de son adhésion, soit d'une façon aléatoire grâce au mouvement brownien ou suite à la sédimentation, ou d'une façon orientée grâce à la mobilité des bactéries (flagelle, pili) et au chimiotactisme **(El Khoury, 2021 ; Parot, 2007)**.

Le processus d'attachement dépend de facteurs environnementaux (pH, température, temps), des propriétés des matériaux (rugosité, hydrophobie ou mouillabilité et la composition de la surface) et les propriétés bactériennes (hydrophobie de la surface bactérienne, charge bactérienne, structure et espèce bactérienne) **(Picard, 2011)**.

### **I.2.2. Adhérence irréversible**

C'est l'étape de consolidation de la cohésion initiale. La sécrétion d'exo-polymères (EPS) par les bactéries permet leur fixation au support avec des liaisons hydrophobes d'une façon irréversible. Ces bactéries se divisent et synthétisent les constituants de la matrice polysaccharidique à partir d'attachement variable selon les espèces bactériennes, ou à l'aide de la production d'élément qui affirment le lien entre la paroi bactérienne et la surface **(El Khoury, 2021 ; Houvion, 2014)**.

### **I.2.3. Formation des micro-colonies**

Lorsque les bactéries sont irréversiblement adhérentes à une surface, elles vont s'agglutiner et se multiplier lentement et continuer la production de la matrice protectrice d'EPS **(Yannick et al., 2014)**. L'association entre elles permet la formation des micro-colonies suivies par l'élaboration d'un biofilm plus ou moins complexe selon la composition en microorganismes, du milieu et des conditions hydrodynamiques et chimiques **(Michaut, 2019)**.

### **I.2.4. Maturation du biofilm**

Durant la phase de maturation, le biofilm s'adapte aux conditions environnementales externes en augmentant sa densité globale et sa complexité qui sont s'exprimées par un développement important de son épaisseur jusqu'à la construction d'un film hétérogène tridimensionnel où se forment des canaux permettant la circulation de nutriments, d'oxygène et l'évacuation des produits issus du métabolisme bactérien **(Chong, 2018)**. Cette croissance exponentielle est due à la réplication active des organismes liés à la surface et les interactions des composants cellulaires générés par les bactéries avec les éléments



organiques et des molécules inorganiques dans l'environnement immédiat, cela va conduire à la formation des macro-colonies (**Sunil, 2019**).

Plusieurs facteurs contrôlent la maturation, notamment, la disponibilité et la bonne diffusion des nutriments à travers la matrice extracellulaire, le pH interne, la disponibilité en oxygène, la disponibilité en source carbonée et l'osmolarité (**Rathinam et al., 2019**).

### I.2.5. Dispersion

La dernière étape de formation du biofilm consiste en une phase de dispersion avec détachement d'un certain nombre de bactéries isolées. Ce phénomène n'est pas restreint au dernier stade du développement du biofilm, mais peut avoir lieu lorsque les conditions du milieu deviennent défavorables, soit d'une manière passive due à l'action de forces extérieures, ou active due à des facteurs propres au biofilm qui s'agissent de la production de molécules du *quorum sensing* et de surfactants extracellulaires (**Parot, 2007**).

Il existe aussi des interactions entre espèces qui induisent le détachement à travers la sécrétion des enzymes, telles que l'alginate lyase, la N-acétyl-héparon lyase et la hyaluronidase, permettant la décomposition des polysaccharides qui maintiennent le biofilm ensemble. Cette rupture des polysaccharides libère les bactéries de surface, qui vont migrer pour coloniser des nouvelles régions favorables à leur développement pour recommencer un nouveau cycle de vie (**Sunil, 2019**).

### I.3. Facteur favorisant la formation d'un biofilm bactérien

Dans l'environnement, les bactéries existent principalement sous forme de biofilm influencé par de nombreux facteurs liés aux (**Simoès et al., 2020 ; Saulou, 2009**) :

- **Microorganismes** : La concentration microbienne a une relation proportionnelle avec le nombre de cellules adhérentes, de plus, la composition de la surface microbienne contribue à l'adhésion des microorganismes aux supports à travers la présence de protéines, de fimbriae, et de lipopolysaccharides ;
- **Propriétés de la surface** : sur laquelle les bactéries vont se fixer, qui impactent fortement la formation de biofilm, principalement l'hydrophobie du matériau, la tension superficielle, les contaminations organiques, la rugosité et la microtopographie qui concerne la largeur et la profondeur des micro-crevasses ;

- **Milieu environnant** : qui s'agissent du temps de contact entre la bactérie et le support, les caractéristiques du milieu tels que la température, la force ionique, la présence des nutriments et les conditions hydrodynamiques qui influencent l'épaisseur de la couche limite au niveau de l'interface matériau/liquide.

#### I.4. Stratégies anti-biofilm

La pathogénicité bactérienne et la résistance aux antibiotiques peuvent être favorisée par la formation de biofilm, différentes stratégies sont envisagées pour faire face à ce problème (**Algburi, 2016**), en empêchant l'étape d'adhésion, le passage de la forme planctonique à la forme biofilm en tuant les cellules potentiellement capables de former un biofilm ou en entravant leur attachement à une surface, la phase de maturation ou les échanges intercellulaires (**Goetz, 2018**). Parmi les stratégies utilisées :

- Utilisation des différents composés anti-adhésion telles que les composés naturels (N-heptylsulfanylacétyl-L-homosérinelactone extrait d'ail), (**Bodet et al., 2008**), les nouveaux produits chimiques (Tween 20 et Triton X-100) (**Chen et al., 2000**) et les métaux inorganiques comme le cuivre, le zinc et ces alliages (**Warnes et al., 2015**) ;
- Inhibition de la détection de quorum médiée par N-acyl homo-sérine lactones (AHL) à travers l'utilisation des composés de furanone halogénés qui ont la capacité de modifier la structure du biofilm (**Verma et al., 2021**) ;
- Dispersion de la substance polysaccharidique extracellulaire (EPS) qui protège les micro-organismes de divers agents antimicrobiens par les enzymes comme la désoxyribonucléase I (Dnase I) qui est capable de digérer l'ADN extracellulaire présent dans la structure du biofilm (**Roy, 2018**) ;
- Les bactériophages modulent la population bactérienne et produisent certaines enzymes qui perturbent la protection donnée par la matrice du biofilm, ainsi modifient sa structure et augmentent sa susceptibilité aux antibiotiques (**Miquel, 2016**).

## II. Espèce bactérienne *Escherichia coli*

### II.1. Taxonomie

*Escherichia coli* (*E. coli* ou colibacille) est un micro-organisme découvert par le pédiatre allemand Théodore Escherich d'où il a son nom. Elle est isolée à partir d'un échantillon de selles de nourrissons humaines en 1885 (**Blount, 2015**).

La classification actuelle d'*E. coli* basée sur la génétique moléculaire est la suivante (**Diassana, 2018**) :

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

En 2015, 184 sérogroupes ont été identifiés chez cette espèce (**Iguchi et al., 2015**). Principalement, les souches pathogènes d'*E.coli* sont regroupées en 6 principaux pathovars (ou pathotypes), en fonction des symptômes qu'elles provoquent et des facteurs de virulence qu'elles produisent (**Bihannic, 2015**).

### II.2. Habitat

*Escherichia coli* appartient à la microflore normale colonisatrice du tractus digestif des mammifères (de l'homme et des animaux à sang chaud). Elle est également présente sur les surfaces, dans l'environnement, le sol et les eaux suite aux rejets des matières fécales humaines et animales. Sa présence dans n'importe quel échantillon est un signe de contamination fécale (**Michaut, 2018**).

### II.3. Caractères morphologiques et culturels

*Escherichia coli* est un bacille à Gram négatif (2 à 4 µm de longueur et 0,4 à 0,6 µm de large), mobile avec une structure flagellaire péritriche, généralement non capsulé, non sporulé et aéro-anaérobie facultatif (**Lezzar et al., 2019**).

C'est une bactérie non exigeante, chimio-organotrophe et pousse sur les milieux ordinaires et lactosés tels que la gélose nutritive, Mac Conkey et Hektoen. Sa température optimale de croissance est de 37°C pendant 24h d'incubation, elle donne des colonies de 2 à 3 mm de diamètre, incolores ou colorés (selon le milieu de culture utilisé), rondes, lisses et à bords réguliers **(Nolan et al., 2013)**.

*E. coli* est une bactérie mésophile, sa température de croissance proche de celle du corps humain (37°C), et neutrophiles qui se développent à un pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. Ce germe est non halophile (il pousse en milieu de concentration en NaCl inférieure à 0,2 M) **(Oulymata, 2007)**.

#### II.4. Caractères biochimiques

Les caractères d'identification d'*E.coli* sont essentiellement biochimiques et utilisent des tests qui étudient principalement le métabolisme protéique ou la fermentation des sucres, la capacité d'utiliser le citrate et la présence des enzymes (Tableau 1) **(Percival et Williams, 2014)**.

**Tableau 1** : Principaux caractères biochimiques d'*Escherichia coli* **(Denis et al., 2011)**.

Caractères biochimiques	
Oxydase	-
Catalase	+
β-galactosidase	+
Lysine décarboxylase	V
Ornithine décarboxylase	V
Gélatinase	-
Production d'acétoïne	+
Utilisation de citrate	-
Production d'indole	+
Glucose	+
Lactose	+
Urée	-
Hydrogène sulfureux	-
Tétrathionate réductase	-
Mannitol	+

(+) : caractère positif ; (-) : caractère négatif ; (V) : variable

## II.5. Caractères antigéniques

*E. coli* possède différents antigènes (**Portes, 2020 ; Yao, 2019**) :

- Antigène O (Ag somatique) : est situé dans lipopolysaccharides (LPS) de la surface bactérienne, il est thermostable et résistant à l'alcool et peut jouer un rôle d'endotoxine bactérienne ;
- Antigène H (Ag flagellaire) : correspond aux protéines flagellaires permet la mobilité de la bactérie ;
- Antigène de surface K (Ag capsulaire ou Ag d'enveloppe) : de nature polysaccharidique ou protéique, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O mais il n'est pas toujours présent.

## II.6. Pouvoir pathogène

Selon le pouvoir pathogène, deux groupes d'*Escherichia coli* sont détectés (Tableau 2):

- Les *Escherichia coli* responsables de pathologies intestinales (diarrhéiques) ou entériques en provoquant des gastro-entérites infantiles et des diarrhées des voyageurs ;
- Les *Escherichia coli* qui sont impliquées dans les pathologies extra-intestinales (urinaire, néonatale méningite, péritonites...etc.) (**Avril et al., 2000**).

La transmission de ces souches pathogènes peut être soit par voie orale lors de l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés, soit par contact direct ou indirect avec des porteurs (humains et/ou animaux), ou à travers les surfaces colonisées par ces bactéries (industries alimentaires, milieu hospitalier...) (**Toe, 2018 ; Vaillant et Espié, 2003**).

Plusieurs facteurs de virulence sont impliqués dans les étapes de l'infection à *E. coli* dont les principaux sont :

- Toxines comme les shigatoxines, les entérohémolysines, les entérotoxines et les cytotoxines. Leur mode d'action consiste à faciliter l'invasion tissulaire, lyser les cellules de l'hôte ou moduler les activités cellulaires normales (**Bidet et al., 2012**) ;
- Capsules qui sont de nature polysaccharidiques et antigéniques (Ag K), elles rendent la phagocytose plus difficile (**Sidabe, 2020**) ;

- Adhésines qui permettent de connaître les récepteurs glycolipidiques présents à la surface des cellules hôtes (**Nauciel et Vildé, 2005**) ;
- Lipopolysaccharide (LPS) qui est un composant majeur de la membrane externe des bactéries à Gram négatif, constitué de trois entités : le lipide, le core oligosaccharidique et l'antigène O. Il joue un rôle d'endotoxine (**Passoret, 2018**) ;
- Plasmides qui peuvent porter des facteurs de virulences et des gènes de résistance aux antibiotiques chez certaines souches pathogènes d'*E. coli* (**Toe, 2018**).

**Tableau 2** : Caractéristiques cliniques et pathologiques des maladies causées par les principaux pathotypes d'*Escherichia coli* chez l'homme (**EL Achaoui, 2020 ; Mégane, 2019**).

	Souches	Type de perturbation	Signes cliniques
Infections Intra-intestinales	<i>E.coli</i> Entérotoxigènes (ETEC)	Production d'entérotoxines avec accumulation de fluide dans l'intestin.	Diarrhée chez les voyageurs «tourista», crampes abdominales et nausées.
	<i>E.coli</i> Entéro-invasifs (EIEC)	Envahissement des entérocytes; Inflammation de la muqueuse du côlon.	Fièvre et diarrhée sanglante et purulente, syndrome dysentérique.
	<i>E.coli</i> Entéro-pathogènes (EPEC)	Lésions de la muqueuse intestinale.	Diarrhée aqueuse, fièvre et vomissement.
	<i>E.coli</i> Entérohémorragiques (EHEC)	Production de lésions et de toxines Véro ; Lésions de la muqueuse intestinale et nécrose des cellules épithéliales.	Diarrhée sanglante et sécrétoire ; Hémolyse et insuffisance rénale.
	<i>E.coli</i> Entéroaggrégatifs (EAgEC)	Adhésion typique : briques empilées.	Diarrhée du nourrisson.
	<i>E.coli</i> à adhérence diffuse (ADEC)	Adhésion diffuse sur cellules grâce à des adhésines.	Diarrhée aqueuse aigue.
Infections Extra-intestinales	<i>E. coli</i> uropathogènes (UPEC)	Inflammation de la vessie et/ou des reins	Infections urinaires.
	<i>E. coli</i> méningites néonatales (MNEC)	Inflammation des méninges	Méningites : céphalées, nausées, photophobie...

## II.7. Résistance aux agents antibactériens

*Escherichia coli* est intrinsèquement sensible à plusieurs agents antibactériens mais ces dernières années elle a été considérée une des souches les plus inquiétantes pour la santé publique à cause de sa multi-résistance (**Poirel et al., 2018**). Elle est capable à acquérir des gènes de résistance disséminés grâce aux plasmides multi-résistants et aux éléments génétiques mobiles (ex : les transposons) et codants pour certains enzymes spécifiques qui lui confèrent une résistance aux antibiotiques comme les céphalosporines (acquisition des gènes des  $\beta$ -lactamases), les carbapénèmes (acquisition des gènes de carbapénémases), les aminosides (les ARNr méthylases 16S), et aux agents plus anciens tels que les tétracyclines, les phénicols, les sulfamides, le triméthoprim et la fosfomycine (**Guérin, 2021**).

Plusieurs agents antibactériens sont utilisés aussi pour lutter contre la contamination de l'environnement et des surfaces surtout en milieu hospitalier, malheureusement *E. coli* a développé des mécanismes de résistance à ces agents pour protéger ces composants cellulaires essentiels. Actuellement, *E. coli* résiste aux antiseptiques et aux désinfectants utilisés principalement dans les hôpitaux et aux établissements de soins de santé. La résistance de cette espèce est liée à la structure de la membrane externe et au LPS, qui font obstacle au passage des molécules biocides (**Carencio, 2017**). Ainsi, il apparaît qu'*E. coli* peuvent résister aussi aux métaux qui sont utilisés depuis longtemps comme des agents antibactériens. *E. coli* possède de nombreux gènes impliqués dans la résistance aux métaux tel que : *zntA* (gène de résistance au zinc) et *copA* (gène de résistance au cuivre) (**Qin et al., 2019**).

## II.8. Capacité de formation de biofilm

Plusieurs souches d'*Escherichia coli* possèdent la capacité à former des biofilms (**Bumunang et al., 2020**) ce qui en fait un organisme modèle pour l'étude de leur formation (**Salome, 2018**). Les biofilms à *E. coli* contribuent à la survenue de diverses infections et maladies humaines graves telles que les infections associées aux cathéters et rendent difficile leur éradication (**Sharma et al., 2016**).

Les différents facteurs environnementaux, l'équilibre des forces d'attraction et de répulsions électrostatiques sont notamment les principaux influenceurs sur le premier contact réversible des *Escherichia coli* à la surface à coloniser (**Vogeleer et al., 2014**).

En plus, chez cette espèce bactérienne, plusieurs constituants jouent un rôle dans la structure de biofilm comme les flagelles qui sont essentiels à l'attachement lors de l'étape initiale (**Doghri, 2015**). Elle utilise également plusieurs appendices de surface, tels que des fimbriaes de type 1 qui constituent le groupe d'adhésines le plus commun chez 80% des souches *Escherichia coli* (**Staerk et al., 2016**). Les curli, qui sont des fibres minces protéiques extracellulaires de type amyloïde, contribue aussi à la résistance et à la formation de biofilms (**Sheng et al., 2020**). *E. coli* contient des exopolysaccharides majeurs qui sont essentiels au maintien de la structure du biofilm et favorise l'adhésion cellule à cellule (**Agladze et al., 2005**).

### III. Zinc

#### III.1. Définition et utilisation du zinc

Le zinc (Zn) est un élément trace métallique qui existe naturellement dans l'environnement sous forme de métal minéral (inorganique) (**Benaboud, 2018 ; Desaunay, 2011**). Généralement, il se trouve sous forme de trace ionique ( $Zn^{2+}$ ) dans tous les compartiments de la nature (**Tatangelo, 2006**). Les nanocristaux de zinc sont capables de se combiner avec autres éléments non-métaux pour construire des complexes, en témoigne le sulfate de zinc ( $ZnSO_4$ ), le chlorure de zinc ( $ZnCl_2$ ) et l'oxyde de zinc (ZnO) (**Bechane, 2022 ; Elmanira, 2022**). En raison de ses minérales qui se caractérisent par diverses propriétés physiques, chimiques, optiques et électriques, de vastes applications sont disponibles (**Lehraki, 2021**).

Le zinc est énormément utilisé dans le domaine industriel telles que dans des alliages (laiton) des automobiles, des capteurs, des lasers UV, des cellules solaires et des détecteurs de gaz (**Madani, 2020 ; Zehani, 2014 ; Douayar, 2013**). Il est utilisé aussi comme revêtement protecteur pour d'autres métaux contre la corrosion (galvanoplastie, métallisation, traitement par immersion) (**Doillon, 2010**).

Le zinc est un oligo-élément indispensable à la vie des organismes vivants, par contre il peut devenir toxique lorsque son concentration dépasse un certain seuil (**Tatangelo, 2006 ; Jondreville et al., 2003**). Ces dernières années, cet élément occupe une place essentielle dans le champ médical et pharmaceutique puisqu'il entre dans la fabrication des crèmes, des applications dentaires et des pansements (**Rokbani, 2018**). En outre, il est utilisé également



dans la préparation des produit cosmétique sans oublier les domaines de l'agriculture, l'urbanisation et l'alimentaire (**Lehraki, 2021 ; Le Bras, 2019**).

### III.2. Interactions bactérie - zinc

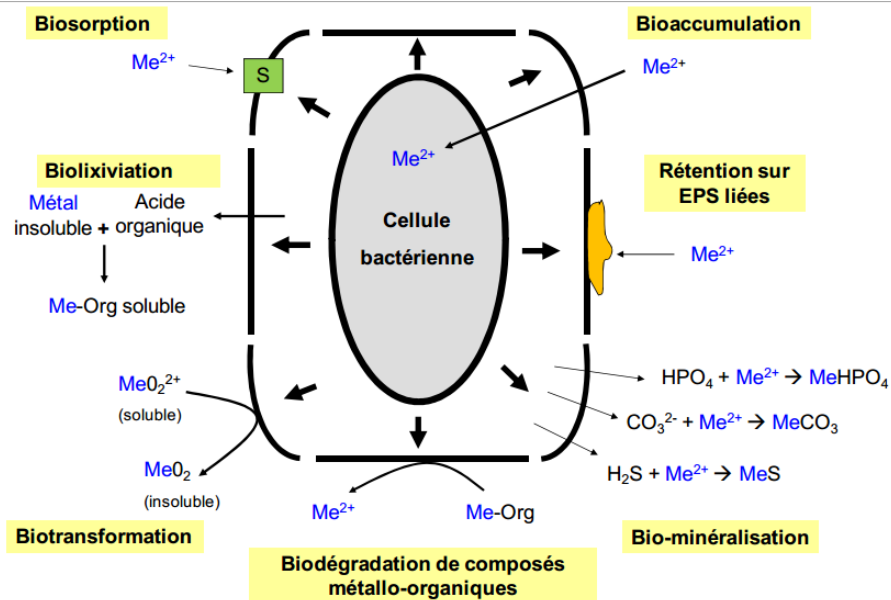
À faible dose, le zinc est un ion de métal de transition qui semble nécessaire à toute forme de vie particulièrement chez les microorganismes. Il joue un rôle de régulateur dans nombreux processus physiologiques pour la stabilisation de la membrane cellulaire, un cofacteur pour diverses protéines et un composant essentiel à la réparation de l'ADN et à la réponse au stress oxydatif (**Xia et al., 2021**).

Les bactéries contrôlent la distribution du Zn avec des transporteurs spéciaux pour maintenir leur métabolisme. Parmi les systèmes de transport, le régulateur d'importation contrôlant les niveaux de zinc intracellulaire en raison de l'homéostasie du zinc dans la cellule (**Zhu et al., 2019**), il se compose d'un transporteur de faible affinité ZIP (*Zinc Iron Permease Family*) qui absorbe et transporte passivement le métal et deux transporteurs de forte affinité de type ABC ( il se divise en trois protéines ZnuA protéine périplasmique, ZnuB la perméase membranaire, ZnuC le composant ATPase) qui sont responsables de fournir de l'énergie) chez les Gram négatifs, par contre chez les Gram positifs seuls des transporteurs de la famille ABC (**Moulin, 2017**). Par ailleurs, un régulateur de l'export du zinc, contient des protéines ZntR (*Zinc responsive transcriptional Regulator*) autorisent l'expression de pompes d'efflux du zinc de type RND (*Résistance Nodulation Division*), protège les bactéries de l'empoisonnement au zinc. L'expression protéique de l'ATPase de type P facilite la diffusion de cations du transport membranaire et également fixe ou libère le Zn dans le cytoplasme (**Desaunay, 2011**).

Les bactéries peuvent interagir avec les métaux précisément le zinc via différents mécanismes (**Sabri, 2008**). La transformation du zinc est exercée par des réactions d'oxydo-réductrices ou d'alkylation qui subies généralement des changements dans la toxicité et la mobilité du métal. De plus, les bactéries ont la capacité d'accumuler le Zn à partir des phénomènes d'adsorption passive ou de transport actif à l'intérieur de la cellule (**Munees, 2011**). Du fait que les bactéries jouent un rôle biogéochimique, elles peuvent modifier le comportement du zinc ou tout autre métal par des mécanismes de chélation ou

complexation (**Desaunay, 2011**). La rétention de zinc présente aussi une sous forme de liaison à la surface des cellules (**Crosnier et Delolme, 2006**).

La figure 02 résume les différentes interactions bactérie-métaux.



**Figure 02** : Différentes interactions entre métaux et bactéries (**Ledin, 2000**).

### III.3. Effet antibactérien du zinc sur les bactéries

Actuellement, le métal du zinc est le plus utilisé émergément comme une nouvelle arme de combattre les différentes infections bactériennes dues à leurs propriétés antimicrobiennes (**Mendes *et al.*, 2022** ; **Banerjeea *et al.*, 2020**). Plusieurs études ont montré que le zinc réduit la multiplication bactérienne à divers mécanismes (**Ye *et al.*, 2020** ; **Xu *et al.*, 2015**).

Généralement, les particules du Zn se fixent sur la surface de la cellule bactérienne et pénètrent à l'intérieur selon la composition de la paroi (**Xi *et al.*, 2021**). Cette entrée autorise la libération des ions  $Zn^{2+}$  interagissant avec le groupe thiol des enzymes respiratoires bactériennes, et la production de niveaux élevés d'espèces Radicalaires d'Oxygène Réactives (ROS). Ils provoquent un stress oxydatif dans la cellule bactérienne qui comprennent la perturbation de la membrane cellulaire, le dysfonctionnement des protéines, des dégâts dans les lipides, les glucides et l'ADN et conduisant à la mort bactérienne (**Benali, 2021** ; **Bruna *et al.*, 2019**).

Pour faire face à la toxicité du zinc, les bactéries ont développé différentes stratégies de défense. L'efflux actif est l'un des mécanismes les plus importants, il effectue l'homéostasie à l'intérieur de la membrane à travers la présence de différents transporteurs (**Farinati et al., 2011**). Ainsi, il existe des mutations génétiques en effet d'une réponse adaptative et un transfert horizontal de gènes produisant par la conjugaison via le contact direct entre les cellules (**Bednorz et al., 2013**). Des protéines de liaison intracellulaires et des transformations enzymatiques (oxydation, réduction, méthylation et déméthylation) jouent également un rôle dans l'augmentation de la résistance en tant que mécanismes de défense et de détoxification (**Anu, 2010 ; Park et Ely, 2007**). Récemment, des preuves ont montré que le système de résistance le plus abondant et répandu est la production de biofilm (synthèse d'exopolysaccharides EPS) qui enveloppe une communauté de cellules bactériennes et les protège contre les agents étrangers (**Bruna et al., 2019**).

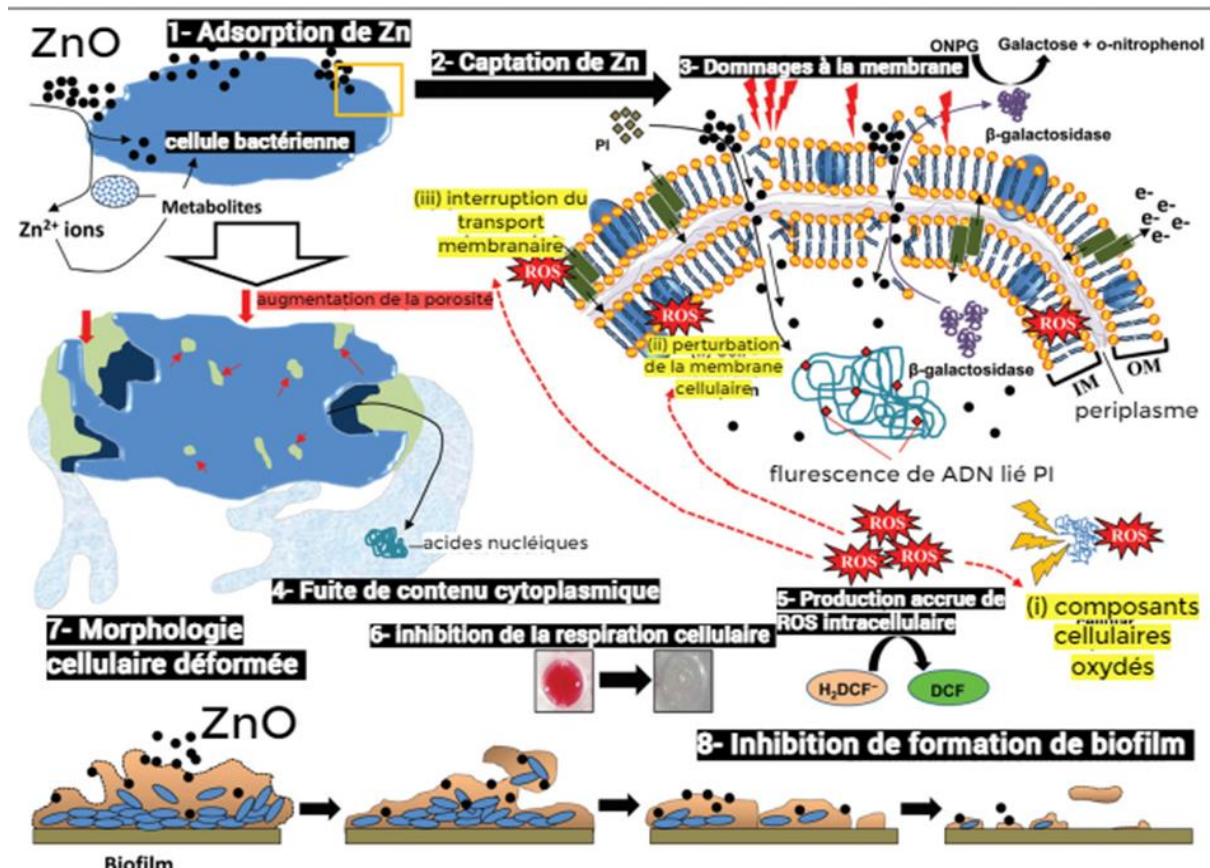
#### IV.4. Effets et réponse du biofilm bactérien au zinc

Les biofilms bactériens agissent comme une barrière mécanique pour une plus grande résistance aux surfaces toxiques et aux agents antimicrobiens (**Pourhajibagher et Bahador, 2021**). Généralement, le zinc intervient à certaines fonctions biologiques qui améliorent la formation de biofilm mais il présente également un caractère toxique lorsqu'il trouve à des taux élevés (**Medeiros et al., 2013**).

Certaines recherches scientifiques montrent que le zinc possède une excellente activité anti-biofilm (**Namasivayam et al., 2021**). Ce métal subit des changements morphologiques et physiologiques qui réduisent l'adhésion bactérienne, affecte la perméabilité membranaire par l'induction des fuites au contenu cellulaire et un déséquilibre électrolytique entraînant des dommages dans la cellule bactérienne (**Wang et al., 2012**).

Par ailleurs, le Zn a des effets inhibiteurs sur le système de communication cellulaire *quorum sensing* (QS) ainsi que sur le développement de biofilms, il empêche la signalisation QS régulée par la N-acylhomosérine lactone (AHL) (**Al-Shabib et al., 2016**). Aussi, la réduction de la sécrétion d'exo-polysaccharides (EPS) a exposé les cellules bactériennes résidant dans les biofilms à la diminution de l'attachement surface-cellule affectant la liaison de l'EPS à la surface cellulaire (**Husain et al., 2022**).

La figure 3 illustre l'action du zinc (sous sa forme oxyde de zinc) sur la cellule bactérienne et la formation de biofilm.



**Figure 3** : Différentes étapes de l'action du zinc sur la cellule bactérienne et le biofilm (Zaidi *et al.*, 2018).

La propriété anti-biofilm du zinc peut améliorer la sensibilité des biofilms aux agents antimicrobiens. Ces effets inhibiteurs sur la formation des biofilms ne sont pas limités à certaines bactéries, mais peut s'étendre à d'autres pathogènes bactériens humains et animaux importants (Mahamuni-Badiger *et al.*, 2020). En revanche, l'exposition des bactéries de biofilm aux différentes concentrations de zinc va induire une tolérance, qui se traduit par l'accumulation de ce dernier à travers un mécanisme rapide et non spécifique de prise qui se trouve normalement dans des concentrations élevées. Deux mécanismes généraux responsables de la réponse des biofilms bactériens au zinc sont impliqués dans l'efflux, un efflux de type ATPase qui transporte les ions de zinc à travers la membrane cytoplasmique et un système de RND transporteur qui transporte le zinc à travers la paroi des cellules (Neethu *et al.*, 2015 ; Spain et Alm, 2003).

# **Chapitre 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 3).

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 (**Yannick et al., 2014 ; Cloup, 2013**).

**Tableau 3** : Origine des souches d'*Escherichia coli* à étudier.

Souche 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 culture bactérienne conservée sur la gélose nutritive, des colonies ont été introduites dans un tube 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 avonsensemencé 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 est également possible (**Chabot et al., 1993**).

Les souches bactériennes ont subi une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologie 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 la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* soumise au stress de zinc

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'une exposition au zinc. Le zinc testé est sous forme d'oxyde de zinc (ZnO) (PM = 81,38 g/mol) et de Chlorure de zinc (ZnCl<sub>2</sub>) (PM = 136,286 g/mol).

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

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 (**Pantabella et al., 2013**).

### II.1. Préparation de différentes concentrations du zinc

Des solutions mères de ZnO et de ZnCl<sub>2</sub> contenant 5 g/l ont été préparées dans le TSB, puis stérilisées par filtration sur membrane (0,2 µm).

Six solutions filles sont obtenues par dilution successive au demi de chaque solution mère. Les concentrations du zinc se répartissent dans les solutions filles entre 25 et 800 µg/ml.

### II.2. 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 dans des tubes en verre contenant le TSB avec différentes concentrations de zinc (**Tré- Hardy et al., 2008**) ;
- Incuber les tubes pendant 1, 8, 12, 17 et 21 jours à 25°C sans agitation (**Florence, 2014**).

### II.3. Inoculation de la microplaque

D'après la technique de **Rivas et al. (2007)** :

- 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 trois fois avec une solution de NaCl (9 g/L) 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 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 NaCl pour enlever le colorant en excès puis séchés 10 min à température ambiante ;
- Remettre en solution le cristal violet qui a pénétré dans les bactéries par l'ajout de 200  $\mu$ 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. Chaque triplicat de mesures a été répété deux fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

#### II.4. Détermination du pouvoir adhérent

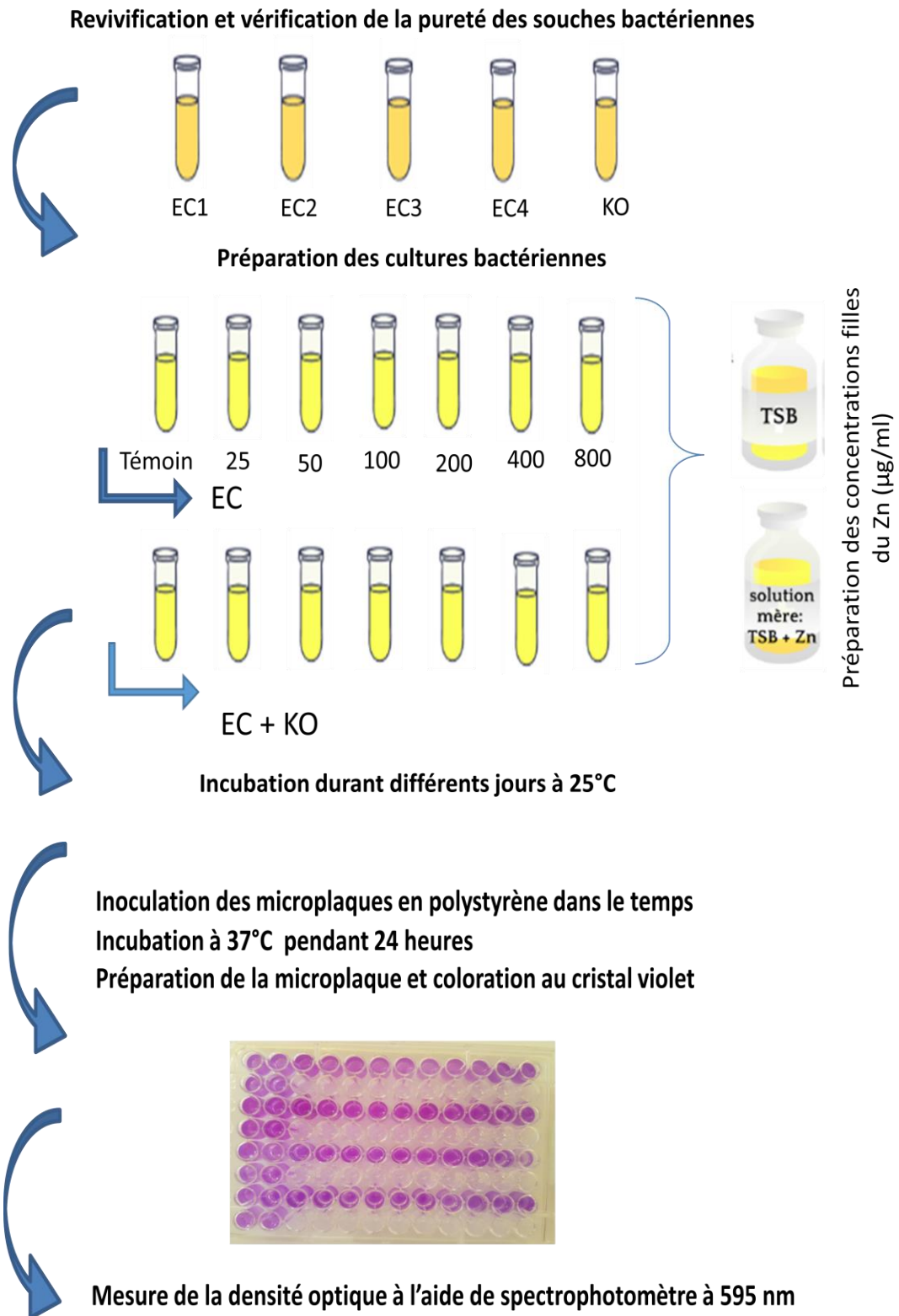
Les souches comptent tenu de leur pouvoir adhérent, ont été classées en trois catégories : non adhérentes, faiblement adhérentes et hautement adhérente (**Stepanovic, 2000**) :

- $DO < 0,12$  : Non formatrice du biofilm ;
- $0,12 \leq DO \leq 0,24$  : Formatrice modérée de biofilm ;
- $DO > 0,24$  : Fortement formatrice de biofilm.

La figure 4 illustre le protocole suivi afin d'étudier la capacité de formation de biofilm chez *E.coli*.

### III. Analyse statistique

Afin de visualiser et de comparer l'effet de différentes formes du métal sur la capacité de formation de biofilm, les résultats sont soumis au test T de Student, 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 4** : Etude de la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* soumise au stress dz zinc

# **Chapitre III :**

# **Résultats et**

# **discussion**

## I. Vérification de la pureté du matériel biologique

La caractérisation phénotypique réalisée pour les quatre souches d'*Escherichia coli* a confirmé leur pureté (Tableau 4).

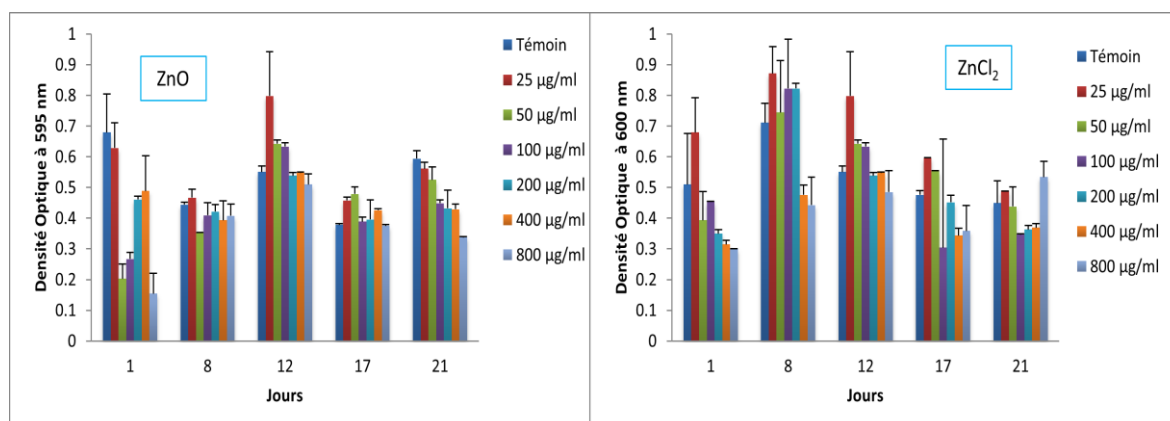
**Tableau 4** : Identification des souches d'*Escherichia coli* à étudier.

Souche bactérienne	Aspect macroscopique sur Hektoen	Aspect microscopique	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
EC1	Colonies moyennes, saumons, crémeuses à contour régulier	Bacilles à Gram négatif	API 20E	5444553	100
EC2				5444152	99,6
EC3				5144510	100
EC4				7044102	99,8

## II. Étude de la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* soumise au stress de zinc

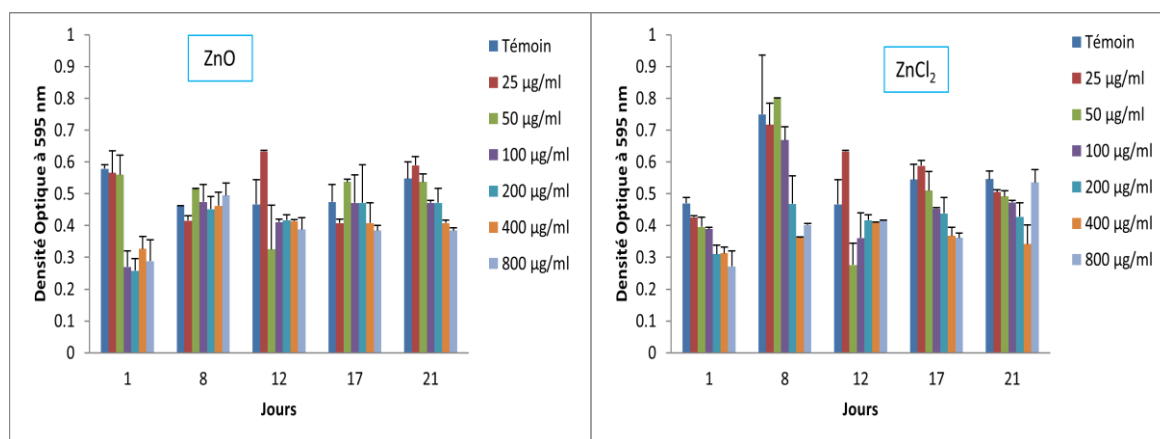
### II.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce (*Escherichia coli*)

Les résultats obtenus indiquent que la souche EC1 a été fortement formatrice de biofilm durant toutes les périodes d'incubation avec les deux formes du zinc testées. Les valeurs les plus élevées ( $DO \geq 0,8$ ) ont été enregistrées avec la concentration 25  $\mu\text{g/ml}$ , tandis que les valeurs minimales ont été enregistrées globalement avec la concentration 800  $\mu\text{g/ml}$ , ce qui confirme l'effet antibactérien du zinc vis-à-vis de la bactérie à étudier. Généralement, nous constatons qu'il n'y a pas de différences significatives entre l'effet de ZnO et de ZnCl<sub>2</sub> (Test T de Student,  $p = 0,147$ ) (Fig. 5).



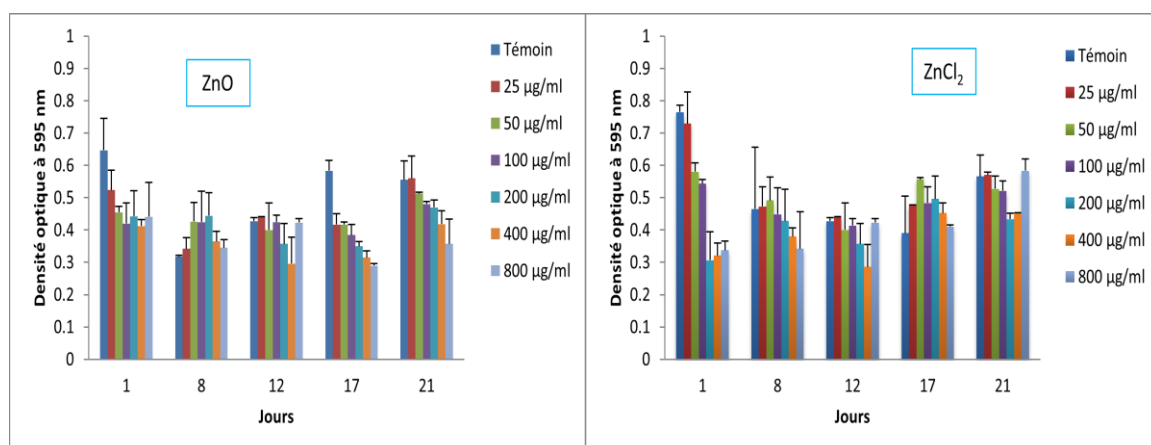
**Figure 5** : Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC1.

La figure 6 montre que la souche EC2 est fortement productrice de biofilm en absence et en présence des deux formes du zinc. Cette production a connu une diminution vis-à-vis du ZnO après une durée de 8 jours par rapport au ZnCl<sub>2</sub>, avec le quel des valeurs de DO comprises entre 0,68 et 0,8 ont été enregistrées, ce qui reflète son faible toxicité.



**Figure 6 :** Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC2.

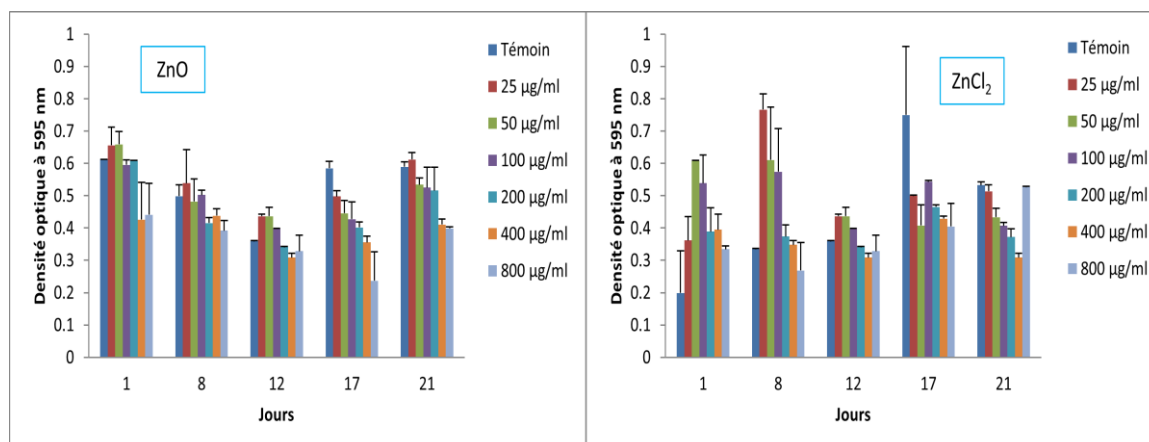
D'après le graphique ci-dessous (Fig. 7), l'effet anti-biofilm de différentes concentrations du zinc sur la bactérie EC3 est nul, toutes les valeurs de DO enregistrées sont supérieures à 0,24. L'application du test T de Student montre qu'il n'y a pas une variation d'effet inhibiteur entre les deux formes du zinc testées.



**Figure 7 :** Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC3.

Pour la souche EC4, la densité optique diminue principalement avec l'augmentation de la durée jusqu'au 12<sup>ème</sup> jour vis-à-vis de ZnO. Des pics de formation de biofilm ont été enregistrés en présence de ZnCl<sub>2</sub> au cours du 1<sup>er</sup> et du 8<sup>ème</sup> jour. L'exception remarquable est en absence du ZnCl<sub>2</sub> durant le début d'incubation où la souche a formé un biofilm modéré

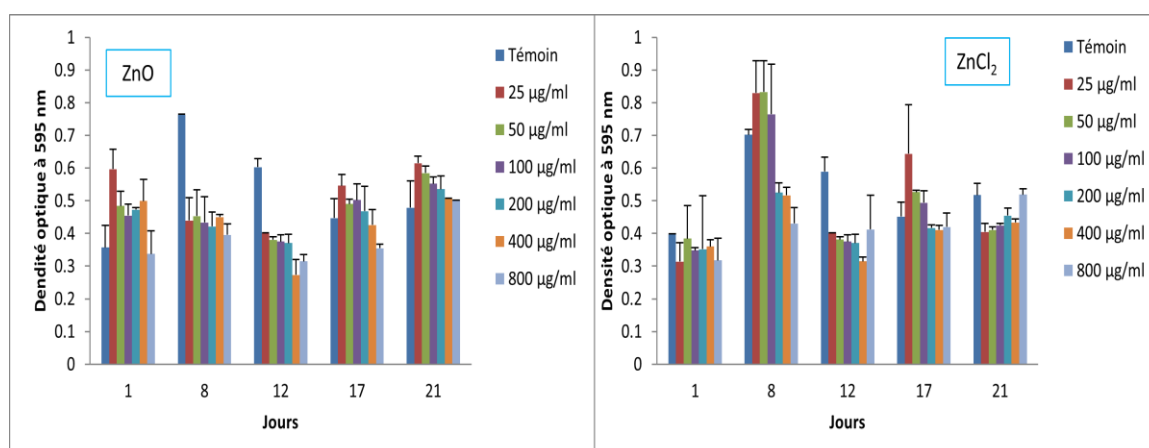
( $0,12 \leq DO \leq 0,24$ ), cette formation est devenue plus importante en présence du métal, en particulier à une concentration égale à  $50 \mu\text{g/ml}$  (Fig. 8).



**Figure 8 :** Effet du zinc sur la formation de biofilm chez la souche EC4.

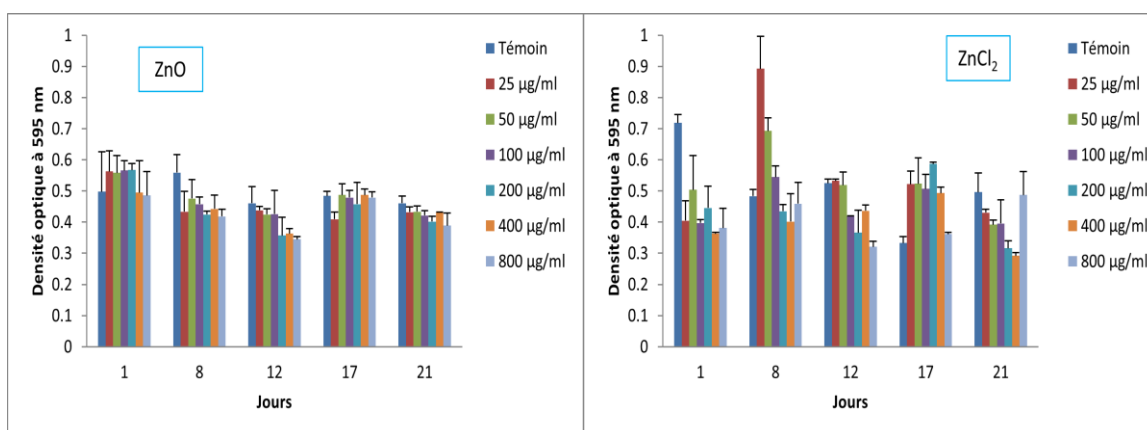
## II.2. Capacité de formation de biofilm mixte (*Escherichia coli* – *Klebsiella oxytoca*)

Le couple EC1-KO produit un biofilm d'une façon plus élevée dans un milieu sans ZnO durant le 8<sup>ème</sup> et le 12<sup>ème</sup> jour ainsi qu'en présence de 25 à  $50 \mu\text{g/ml}$  de ZnCl<sub>2</sub> au cours de 8<sup>ème</sup> jour. Par ailleurs, la formation de biofilm a été moins élevée en présence de ZnCl<sub>2</sub> par rapport au ZnO après une durée de 21 jours (Fig. 9).



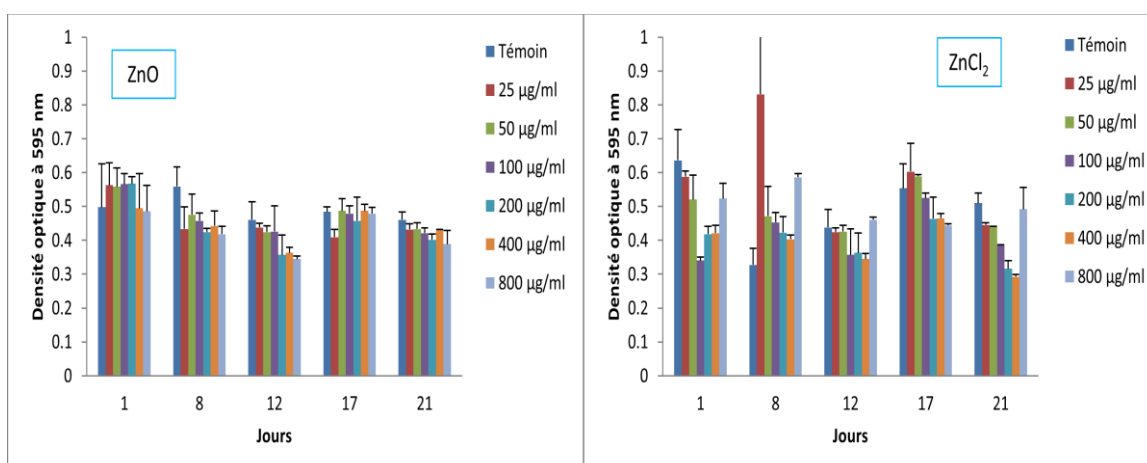
**Figure 9 :** Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC1-KO.

Les résultats illustrés par la figure 10 indiquent que le couple EC2-KO est fortement producteur de biofilm à partir du 1<sup>er</sup> jour. Une stabilité remarquable a été enregistrée vis-à-vis des différentes concentrations de ZnO. En revanche, une valeur maximale de densité optique a été notée avec la concentration  $25 \mu\text{g/ml}$  de ZnCl<sub>2</sub> pendant le 8<sup>ème</sup> jour.



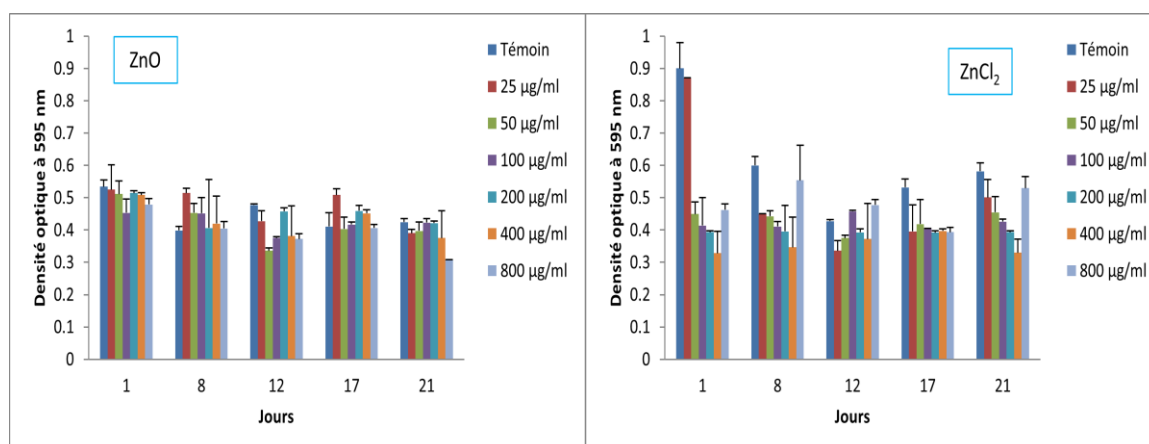
**Figure 10** : Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC2-KO.

Le couple EC3-KO montre une forte capacité de production de biofilm approximativement stable durant toute la durée d'incubation en présence de différentes concentrations de ZnO ( $p = 0,237$ ). D'autre part, à une concentration faible de ZnCl<sub>2</sub> (25 µg/ml), une hyper augmentation de la densité optique a été notée au cours du 8<sup>ème</sup> jour (Fig. 11).



**Figure 11** : Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC3-KO.

Au premier jour d'incubation, le couple EC4-KO a été dans les meilleures conditions de multiplication en absence et en présence de 25 µg/ml de ZnCl<sub>2</sub>. En ce qui concerne le ZnO, ce dernier n'a pas inhibé la formation de biofilm durant toute la période d'incubation et les densités optiques enregistrées sont globalement très proches et supérieures à 0,24 (Fig. 12).



**Figure 12** : Effet du zinc sur la formation de biofilm chez le couple EC4-KO.

### III. Discussion

La croissance rapide des bactéries et leur adhésion sont devenues une préoccupation sérieuse pour la santé publique. Ces microorganismes sont à l'origine de contaminations croisées persistantes, étant donné qu'ils sont associés aux biofilms qui sont souvent chroniques et difficiles à éradiquer (**Tremblay et al., 2014**). *Escherichia coli*, la bactérie la mieux connue et la plus étudiée, a la capacité de former un biofilm et entraîne une résistance accrue aux antibiotiques et aux désinfectants (**Wang et al., 2014**). Par conséquent, l'exploration d'une nouvelle stratégie antibactérienne est importante et imminente pour protéger l'homme contre les infections bactériennes (**Majhi et al., 2020**). Les preuves accumulées ont démontré que les ions de zinc sont toxiques pour les cellules bactériennes et elles ont été bien explorées contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (**Yamamoto et Ishihama, 2005**).

Dans la présente étude, l'effet anti-biofilm induit par le zinc, précisément ZnO et ZnCl<sub>2</sub>, a été étudié par un test spectrophotométrique vis-à-vis de quatre souches d'*Escherichia coli*. Majoritairement, les résultats obtenus ont montré que toutes les concentrations du zinc testées (25 à 800 µg/ml) n'ont pas un effet anti-biofilm efficace vis-à-vis des différentes souches d'*Escherichia coli* à une température de 25°C, principalement après des durées d'incubation importantes. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les souches testées possèdent des propriétés qui l'aident à former des biofilms même sur des milieux contenant des agents antibactériens comme le zinc. Ceci est témoigné par les contrôles (souches



bactériennes sans métal) où ils présentent une capacité forte de formatrice de biofilm, par ailleurs, en présence du Zn, cette capacité a été diminuée légèrement.

L'étude de **Medeiros et al. (2013)** est en accord avec nos résultats. Ils sont montrés que les ions de zinc n'ont pas un effet significatif sur les souches d'*E.coli*. Par contre, **Wu et al. (2013)** ont montré que la croissance bactérienne d'*E.coli* au sein d'un biofilm a été réduite à au moins 80 % du témoin à des concentrations de zinc de 100, 250 et 500  $\mu$  mol/ l. De même, **Danilova et al. (2020)** ont déclaré que le zinc peut réduire la croissance bactérienne et inhibe la formation de biofilm d'*E.coli* avec 4,6 à 6,8 fois par rapport au témoin.

La capacité de formation de biofilm par l'espèce *E.coli* est expliquée par le fait qu'elle possède différentes structures qui assurent son adhésion. D'après **Prigent-Combaret et al. (2001)**, les organites adhésifs comme les fimbriaes et les curli facilitent la communication cellule-cellule et l'attachement initial aux surfaces. Ces organites sont codés par le *fimB* (Protéine régulatrice – FimB) et le *csgD* (Protéine régulatrice de la transcription de l'opéron CsgBAC) (**Wood, 2009 ; Beloin et al., 2008**). Aussi, la mobilité est un facteur essentiel à l'adhésion ce qui est confirmée d'après les expériences de **Pratt et al. (1998)**. Bien qu'il a été démontré qu'il y a d'autre gènes améliorent la formation de biofilm, la mobilité et la virulence d'*Escherichia coli* par son codage aux gènes *uvrY* (*Response regulator gene*), *csrA* (*Carbon storage regulator*), *Hha* (*Hemolysin expression-modulating protein*) et *YbaJ* (*Hha toxicity modulator*) restent des facteurs essentiels dans l'adhésion et la persistance au sein d'un biofilm (**Barrios et al., 2005**).

Il est très important d'expliquer aussi les résultats obtenus dans la présente étude par la résistance des souches d'*E.coli* aux concentrations importantes de différentes formes du zinc. Selon **Sharma et al. (2016)**, *Escherichia coli* résiste généralement au stress de zinc grâce à des pompes d'efflux codées par divers gènes de résistance tel que les transporteurs *zntA* (*Zn translocating P-type ATPase*), *zraP* (*Zinc resistance-associated protein*) et *hydG* (*Transcriptional regulatory protein*) et les systèmes d'absorption membranaire *ZupT* (transporteur d'absorption du zinc). Ces gènes sont impliqués dans la régulation de zinc et sont connus pour être importants pour conférer une résistance à sa concentration élevée (**Yamamoto et Ishihama, 2005**).

Lors de cette étude, l'augmentation de la durée de contact avec l'agent antibactérien n'a pas d'effet important sur la formation de biofilm. Généralement, il a été démontré que la formation de biofilm augmente principalement avec le temps (**Shatila et al., 2021**). En revanche, la diminution, dans cette étude, de la densité optique des souches bactériennes par rapport aux témoins pourrait s'expliquer d'une part, par la diminution de la quantité des nutriments dans le milieu de culture dans le temps et d'autre part, par un effet antibactérien du zinc qui a permis une légère diminution de la charge bactérienne. D'après Kumar **et al. (2017)** et Pasquet **et al. (2014)**, le zinc peut endommager les membranes bactériennes, l'ADN et les protéines cellulaires, par conséquent, il peut entraîner l'inhibition de la croissance bactérienne et éventuellement la mort bactérienne, mais cette activité antibactérienne est influencée par certains facteurs tel que : le pH du milieu, le temps d'exposition, la concentration et la présence de bactéries résistantes.

En ce qui concerne le biofilm mixte, cette étude montre qu'*E.coli* et *Klebsiella oxytoca* représente un couple idéal pour la formation de cette structure. Cette dernière est basée sur des interactions synergiques entre les co-colonisateurs (la co-agrégation et la co-adhésion). Ce mode de vie offre de nombreux avantages pour la survie, l'alimentation croisée entre eux, se prémunir contre divers dangers environnementaux et la limitation de l'accès de potentiels agressions à l'ensemble de la population (**Roisin, 2021 ; Filloux et Vallet, 2003**). De plus, *K. oxytoca*, est connue par sa capacité à former des biofilms via les pili de type 1 et 3 qui sont respectivement codées par les gènes *fimA* (*Major fimbrium subunit FimA type-1*), *mrkA* (*Probable serine/threonine-protein k*) et *mrkD* (*Fimbria adhesin protein*) (**Juarez et Galván, 2018**). Dans la même idée, le modèle généré par **Ghasemian et al. (2019)** indique que les *Klebsiella* produisent des biofilms via plusieurs types d'adhésifs retrouvés à la fois chez *K. pneumoniae* et *K. oxytoca*, principalement sous forme de capsule et de fimbriae type 1 et de type 3 (encodées par les gènes *mrkA* et *mrkD* qui représentent les principales sous-unités de rattachement). En outre, **Sharma et al. (2016)** et **Goller (2006)** ont montré que d'autres facteurs de virulence décrits chez les klebsielles sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation de biofilms. Parmi ces facteurs : la présence des polysaccharides capsulaires, l'intervention du système *Quorum Sensing* (communication entre les cellules) à travers une synthèse d'autoinducteurs (AL-2) ainsi que l'antigène 43, le

PGA (Poly- $\beta$ -1,6 Nacétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm.

Selon la littérature, *E. coli* et *K. oxytoca* interagissent généralement entre eux par différents mécanismes pour former un biofilm tels que le *Quorum Sensing*, l'adhésion des cellules les unes aux autres (interactions physiques), la régulation au niveau moléculaire de certaines voies de biosynthèse ou la sécrétion de métabolites secondaires (interactions chimiques). Toutes ces interactions sont dépendantes à l'émergence de formation de biofilm régulant par des facteurs environnementaux comme le taux d'oxygène, la température, le pH, ou les nutriments disponibles (**Roisin, 2021**).

# Conclusion et perspectives

Les résultats du suivi de la capacité d'*Escherichia coli* à former un biofilm soumise à une exposition du zinc, permettent de tirer la conclusion suivante :

- À une température de 25°C, les souches d'*Escherichia coli*, isolées à partir d'un milieu hospitalier, sont capables à former un biofilm en absence et en présence des deux formes du zinc ZnO<sub>2</sub> et ZnCl<sub>2</sub> ;
- Des densités optiques de la charge bactérienne très importantes ont été enregistrées vis-à-vis de différentes concentrations du zinc ;
- Le zinc possède un effet antibactérien faible vis-à-vis des souches étudiées ;
- Le pouvoir adhérent se diffère légèrement en fonction de la concentration du métal et de la durée d'incubation ;
- Une hyper-production de biofilm en mono-espèce et mixte (double espèce) a été enregistrée surtout après 14 jours ;
- *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca* semble être un couple idéale pour la formation de biofilm même en présence de l'agent antibactérien le zinc.

En perspective, et pour compléter et développer cette étude, il serait intéressant de :

- Étudier l'effet de différents facteurs comme le pH, l'humidité et la température sur la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* ;
- Analyser les mécanismes d'adhésion et de formation de biofilm chez *Escherichia coli* et mieux comprendre les cinétiques de leur constitution, afin d'améliorer les stratégies anti-biofilms ;
- Étudier les biofilms hétérogènes afin de mieux comprendre les mécanismes de co-régulation entre les différentes espèces bactériennes ;
- Déterminer l'impact de d'autres agents antibactériens et anti-biofilms et évoquer leurs mécanismes inhibiteurs.

# Références bibliographiques



- Absharon R.N.N., Hassan S.H.A., Gad El-Rab S.M.F., Shoreit A.A.M. (2008).** Heavy Metal Resistant of *E. coli* Isolated from Wastewater Sites in Assiut City Egypt. *Bull Environ Contam Toxicol.* 81 : 309-315.
- Agladze K., Wang X., Romeo T. (2005).** Spatial Periodicity of *Escherichia coli* K-12 Biofilm Microstructure Initiates during a Reversible, Polar Attachment Phase of Development and Requires the Polysaccharide Adhesin PGA. *Journal of Bacteriology.* 187(24) : 8237-8246.
- Algburi A., Comito N., Kashtanov D., Dicks LM., Chikindas ML. (2016).** Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *ASM journal.* 83(3): 7.
- Al-Shabib N. A., Husain F. M., Ahmed F., Khan R. A., Ahmad I., Alsharaeh E., Aliev G. (2016).** Biogenic synthesis of Zinc oxide nanostructures from *Nigella sativa* seed: Prospective role as food packaging material inhibiting broad-spectrum quorum sensing and biofilm. *Scientific Reports.* 6(1).
- Anu H. (2010).** *Zinc, cadmium and lead resistance mechanisms in bacteria and their contribution to biosensing.* Thèse de doctorat en Microbiologie, University of Helsinki. 6 p.
- Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. (2020).** Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement.* 1-7.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. (2000).** Bactériologie Clinique. *Ellipses.* 2(3). 511 p.



- Banerjee S., Vishakha K., Dasa S., Dutt M., Mukherjee D., Mondala J., Mondala S., Ganguli A. (2020).** Antibacterial, anti-biofilm activity and mechanism of action of pancreatin doped zinc oxide nanoparticles against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Colloids and Surfaces Biointerfaces.* 190: 0927-7765.
- Barrios A. F. G., Zuo R., Ren, D., Wood T. K. (2005).** Hha, YbaJ, and OmpA regulate *Escherichia coli* K12 biofilm formation and conjugation plasmids abolish motility. *Biotechnology and Bioengineering.* 93(1): 188-200.
- Bechane L. (2022).** *Etude de l'amélioration des propriétés de matériaux semi-conducteurs pour des applications comme cellules photovoltaïques.* Thèse de doctorat en Science, Université Ferhat Abbas - Sétif 1, Algérie. 39 p.
- Bednorz C., Oelgeschläger K., Kinnemann B., Hartmann S., Neumann K., Pieper R., Guenther S. (2013).** The broader context of antibiotic resistance: Zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *International Journal of Medical Microbiology.* 303(6-7): 396–403.
- Benali M. (2021).** *Déficit en zinc : manifestations dermatologiques chez l'enfant.* Thèse de doctorat en Médecine, Université Mohammed V de Rabat, Maroc. 04 p.
- Beloin C., Roux A., Ghigo JM. (2005).** combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: Application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *Journal of Bacteriology.* 187: 1001-1013.
- Benaboud A. (2018).** *Etude des propriétés optiques, morphologiques, et photocatalytiques des couches minces de l'oxyde zinc « ZnO » dopé au Fer.* Thèse de doctorat en Physique, Université larbi ben mhidi-oum el bouaghi, Algérie. 6 p.
- Bezoui M. (2016).** *Biofilms bactériens et leur implication en pathologie humaine.* Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Mohammed V- Rabat, Maroc. 111 p.
- Bidet P., Bonarcorsi S., Bingen E. (2012).** Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra- intestinaux. *Archives de Pédiatrie.* 19(3) : 80-92.
- Bispo P., Haas W., Gilmore M. (2015).** Biofilms in Infections of the Eye. *Pathogens.* 4(1): 111–136.

**Blencowe D.K., Morby A.P. (2003).** Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 27 (3) : 291-311.

**Blount D.Z. (2015).** The unexhausted potential of *E. coli*. *E Life Feature article*. 4: 5826.

**Bodet C., Grenier D., Chandad F., Ofek I., Steinberg D., Weiss E.I. (2008).** Potential oral health benefits of cranberry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (7) : 672–680.

**Bruna L. d. S., Marina P. A., Eloisa B. M., João A. O. J., Bruna G., Chiari A., Rosemeire C. P., Aparecida L. C. (2019).** Relationship Between Structure and Antimicrobial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles: An Overview. *International Journal of Nanomedicine*. 14: 9395–9410.

**Bumunang E. W., Ateba C. N., Stanford K., McAllister T. A., Niu Y. D (2020).** Biofilm formation by South African non-O157 Shiga toxigenic *Escherichia coli* on stainless steel coupons. *Canadian Journal of Microbiology*. 66 (4): 328-336.



**Camps M. (2011).** *Bio-essais anti-adhésion sur des bactéries marines pour le criblage de molécules et de revêtements antifouling*. Thèse de Doctorat en biologie marine, Université de Toulon, Toulon. 42 p.

**Carenco P. (2017).** Antibiorésistance et biocides. Informations du réseau national de prévention des infections associées aux soins. Bulletin CCLin-Arlin n°7. 9 p.

**Chabot R., Antoun H., Cescas M. P. (1993).** Stimulation de la croissance du maïs et de la laitue romaine par des microorganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Canadian journal of Microbiology*. 39(10) : 941-947.

**Chen X., Stewart P.S. (2000).** Biofilm Removal Caused by Chemical Treatments. *Water Research*. 34(17): 4229-4233.

**Cherifi T. (2019).** *Étude de la diversité, de la persistance et de la formation du biofilm chez les souches de Listeria monocytogenes dans des abattoirs de porc au Québec*. Thèse de doctorat en Microbiologie, université de Montréal, Canada. 61 p.

**Chong P. (2018).** *Ingénierie électrochimique pour déchiffrer les mécanismes de formation des biofilms électroactifs*. Thèse de doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement, Université de Toulouse, France. 23 p.

**Cloup E. (2013).** *Etude de l'effet mutagène lors d'une colonisation néonatale par une souche d'Escherichia coli produisant la colibactine*. Thèse de docteur en Médecine vétérinaire, Université de Toulouse, France. 54 p.

**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.

**Crosnier J., DELOLME C. (2006).** Contribution des micro-organismes au transfert du zinc dans un sol calcaire d'un bassin d'infiltration de l'Est lyonnais : Approche expérimentale en batchs et en colonnes. *Bulletin des laboratoires des ponts et chaussées*. 261 : 67-80.



**Danilova T. A., Danilina G. A., Adzhieva A. A., Vostrova E. I., Zhukhovitskii V. G., Cheknev S. B. (2020).** Inhibitory effect of copper and zinc ions on the growth of *Streptococcus pyogenes* and *Escherichia coli* biofilms. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 169(5) : 648-652.

**Delarras C. (2007).** Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Éditions Médicales Internationales, Lavoisier*. 289 :476-479.



**Denis F., Ploy M. C., Martin C., Bingen E., Quentin R. (2011).** Bactériologie médicale : Techniques usuelles. Elsevier Health Sciences. (2).

**Desaunay A. (2011).** *Etude et modélisation de la biosorption des métaux par les bactéries. Application au transfert du cadmium et du zinc, seuls ou en mélange par Escherichia coli et Cupriavidus metallidurans en colonnes de sable d'Hostun.* Thèse de doctorat en Terre-Univers-Environnement, Université de Grenoble, France. p : 45-46.

**Diassana A. (2018).** *Identification des souches d'Escherichia coli dans les selles en rapport avec la malnutrition a dioro.* Thèse de doctorat en Pharmacie, Université Bamako. 3 p.

**Doghri I. (2015).** *Interactions moléculaires entre microorganismes au sein de biofilms en milieu marin : mise en évidence de biomolécules antibiofilm.* Thèse de doctorat en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, Université de La Rochelle, France. 30 p.

**Doillon D. (2010).** *Déterminants moléculaires de la tolérance au zinc des microorganismes eucaryotes.* Thèse de doctorat Biologie Forestière, Université Henri Poincaré Nancy, France. 15 p.

**Donlan RM. (2002).** Biofilms: microbial life on surface. *Emerging infectious diseases.* 8(9): 881–890.

**Douayar A. (2013).** *Contribution à l'étude des propriétés structurales, optiques et électriques des couches minces de l'oxyde de zinc (ZnO) dopé (fluor, indium, aluminium et néodyme).* Thèse de doctorat en Physique, Université Mohammed V – RABAT, Maroc. 09 p.



**El Achaoui H. (2020).** *Relation entre Escherichia et le cancer colorectal.* Thèse de doctorate en Pharmacie, Université Mohammed V de Rabat, Maroc. 19 p.

**EL Khoury N. (2021).** *Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720chez Bacillus thuringiensis.* Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Paris-Saclay, France. 27 p.

**Elmanira I. (2022).** *Intoxications aux éléments traces métalliques et concept du profil métallique.* Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Mohammed V Rabat, Maroc. 21 p.



**Farinati S., DalCorso G., Panigati M., Furini A. (2011).** Interaction between selected bacterial strains and Arabidopsis halleri modulates shoot proteome and cadmium and zinc accumulation. *Journal of Experimental Botany.* 62(10) : 3433–3447.

**Filloux A., Vallet I. (2003).** Biofilm : mise en place et organisation d'une communauté bactérienne. *Médecine Sciences.* 19(1) : 77-83.

**Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biochimie, Université de Toulon, Toulon. 76 p.



**Gaffet E. (2011).** Nanomatériaux : Une revue des définitions, des applications et des effets sur la santé. *Comment implémenter un développement sûr Comptes Rendus Physique.* 12 (7) : 648-658.

**Ghasemian A., Alshadeedi S. M., Mahmood S. S., Al-Bustan S. A., Alkhudhairy M. K. (2019).** Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. *Microbial pathogenesis.* 134 : 103558.

**Goetz C. (2018).** *Caractérisation de molécules antibiofilm produites par des souches de staphylocoques isolées dans des cas de mammite bovine.* Thèse de doctorat en Microbiologie, Université de Montréal, Canada. 44 p.

**Goller C. C., Anderson G. G., Justice S., Hultgren S. J., Seed, P. C. (2010).** Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infection and immunity*. 78(3) : 963-975.

**Gomes I.B., Simoes M., Simoes L.C. (2020).** Copper surfaces in biofilm control. *Nanomaterials*. 10(12) : 2491.

**Guérin V. (2021).** *β-lactam resistance of bovine Escherichia coli: phenotypic evolution and genetic bases*. Thèse de doctorat en Sciences Vétérinaires, Université de Liège, Belgique. 38 p.

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



**Houvion E. (2014).** Le biofilm dentaire : composition, formation et propriétés. Thèse de doctorat en Chirurgie Dentaire, Université de Lorraine, France. 42 p.

**Husain F. M., Qais F. A., Ahmad I., Hakeem M. J., Baig M. H., Khan J. M., Al-Shabib N. A. (2022).** Biosynthesized Zinc Oxide Nanoparticles Disrupt Established Biofilms of Pathogenic Bacteria. *Applied Sciences*. 12(2): 710.



**Iguchi A., Iyoda S., Kikuchi T., Ogura Y., Katsura K., Ohnishi M., Hayashi T., Thomson N.R. (2015).** A complete view of the genetic diversity of the Escherichia coli O-antigen biosynthesis gene cluster. *DNA Research*. 22 (1) : 101-107.



**Jondreville C., Revy P.S., Dourmad J., Nys Y. (2003).** Le zinc dans l'alimentation du porc : oligo-élément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. *INRAE Productions Animales*. 16(1) : 3–18.

**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.



**Kumar R., Umar A., Kumar G., Nalwa H.S. (2017).** Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials. *A Review Ceramics*. 43 (5) : 3940-3961.



**Le Bras M. (2019).** *Devenir du zinc des produits résiduels organiques après méthanisation et recyclage agricole : rôle des nanoparticules de sulfure de zinc*. Thèse de doctorat en Géosciences, Université d'Aix-Marseille, France. 28 p.

**Lebeaux D., Ghigo J. M. (2012).** Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. *Médecine Sciences*. 28(8-9) : 727-739.

**Ledin M. (2000).** Accumulation of metals by microorganisms — processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews*. 51: 1-31.

**Lehraki N. (2021).** *Dépôt et Caractérisation des couches minces de ZnO par spray ultrasonique*. Thèse de doctorat en Sciences des matériaux, Université Mohamed Khider- Biskra, Algérie. 10 p.

**Lezzar N., Satta D., Bensari C. (2007).** *Etudes comparatives des souches d'Escherichia coli aviaires et humaines*. Thèses de doctorat en Pathologie Aviaire, Université de Constantine, Algérie. 15 p.



**Bihannic M. (2015).** *Caractérisation de nouveaux variants des fimbriae F17 et association à la virulence chez des souches pathogènes d'Escherichia coli isolées chez le veau.* Thèse de doctorat en Microbiologie et Parasitologie, Université Claude Bernard – Lyon, France. 9 p.

**Madani S. (2020).** *Synthèse, caractérisation, étude des propriétés adsorbantes et activité antibactérienne du polystyrène-4-(5-mercapto- 1, 3, 4-thiadiazol-2-ylimino) pentan-2-one, chélateur des ions métalliques.* Thèse de doctorat en Génie des Polymères, Université ferhat abbas - Setif1, Algérie. 14 p.

**Mahamuni-Badiger P. P., Patil P. M., Badiger M. V., Patel P. R., Thorat-Gadgil B. S., Pandit A., Bohara R. A. (2020).** Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Materials science and engineering: C*. 108: 110319.

**Majhi K. C., Karfa P., Madhour R. (2020).** Nanomaterials: Therapeutic Agent for Antimicrobial Therapy. In *Nanostructures for Antimicrobial and Antibiofilm Applications*. p : 1-31.

**Medeiros P., Bolick D. T., Roche J. K., Noronha F., Pinheiro C., Kolling G. L., Guerrant R. L. (2013).** The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence*. 4(7): 624–633.

**Mégane V. (2019).** *Rôle de l'antigène O dans la reconnaissance d'Escherichia coli par les cellules épithéliales mammaires bovines et modulation par le CD14 soluble.* Thèse de doctorat en Microbiologie et Parasitologie, Université de Tours. 16 p.

**Mendes C. R., Dilarri G., Forsan C. F., Sapata V.M.R., Lopes P.R.M., Moraes P.B., Montagnolli R. N., Ferreira H., Bidoia E. D. (2022).** Antibacterial action and target mechanisms of zinc oxide nanoparticles against bacterial pathogens. *Scientific reports*. 12(1): 1-10.

**Michaut M. (2018).** *Déterminisme environnemental de la contamination par Escherichia coli des eaux et des biofilms d'un hydrosystème karstique.* Thèse de doctorat en Physiologie et biologie des organismes, Université de Rouen Normandie. 29 p.

**Miquel S., Lagrafeuille R., Souweine B., Forestier C. (2016).** Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Frontiers in Microbiology*. 7 : 592.

**Moulin P. (2017).** *Caractérisation du transporteur de zinc Adc/Lmb de Streptococcus agalactiae.* Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université François – Rabelais de Tours. p :49-87.

**Munees A. (2011).** Bioaccumulation of heavy metals by zinc resistant bacteria isolated from agricultural soils irrigated with wastewater. *Bacteriology journal*. 2(1) : 12-21.



**Namasivayam S. K. R., Shyamsundar D., Prabanch M.M., Arvind Bharani R.S., Avinash G.P. (2021).** Inhibitory Potential of Molecular Mechanism of Pathogenesis with Special Reference to Biofilm Inhibition by Chemogenic Zinc Oxide Nanoparticles. *Letters in Applied NanoBioScience*. 10: 1862 – 1870.

**Nauciel C, Vildé JL. (2005).** *Escherichia coli* In Bactériologie médicale. *Elsiver Masson*, Paris. 2 ème édition. p : 122-125.

**Neethu C. S., Mujeeb Rahiman K. M., Saramma A. V., Mohamed Hatha A. A. (2015).** Heavy-metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from Kongsfjord, Arctic. *Canadian journal of microbiology*. 61(6): 429-435.

**Nolan L K., Barnes H J., Vaillancourt J P., Abdul-Aziz T., Logue C M. (2013).** Colibacillosis In Diseases Of Poultry. 13th edition, wiley-blackwell. p : 751-805.

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



**Oulymata G. (2007).** Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université Cheikh AntaDiop de Dakar. 6 p.



**Pantarella 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. *Annali di Igiene*. 25: 31-42.

**Park S., Ely R. L. (2007).** Genome-wide transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to zinc. *Archives of Microbiology*. 189(6): 541–548.

**Parot S. (2007).** *Biofilms électroactifs : formation, caractérisation et mécanismes*. Thèse de doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement, L'institut national polytechnique de Toulouse, France. p : 11-12.

**Pasquet J., Chevalier Y., Pelletier J., Couval E., Bouvier D., Bolzinger M. A. (2014).** The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. *Colloids and Surfaces. A Physicochemical and Engineering Aspects*. 457 : 263–274.

**Passoret V. (2018).** *Pathogénicité potentielle et résistance antimicrobienne des Escherichia coli isolés des poulets au Sénégal, au Canada(Québec) et au Vietnam*. Thèse de doctorat en Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Canada. 37 p.

**Percival S L., Williams D.W. (2014).** *Escherichia coli*. In *Microbiology of waterborne diseases*. 2eme edition. Elsevier Academic Press. p : 21-209.

**Picard C. (2011).** *Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane*. Thèse de doctorat en génie des procédés d'environnement, Université de Toulouse III, France. 22 p.

**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.

**Portes M. (2020).** *L'impact du sevrage chez les ruminants sur le portage des Escherichia coli entérohemorragiques*. Thèse de doctorat en Vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, France. 11 p.

**Pourhajibagher M., Bahador A. (2021).** Synergistic biocidal effects of metal oxide nanoparticles-assisted ultrasound irradiation: Antimicrobial sonodynamic therapy against *Streptococcus mutans* biofilms. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 35:102432.

**Pratt L. A., Kolter R. (1998).** Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30(2) : 285-293.

**Prigent-Combaret C., Brombacher E., Vidal O., Ambert A., Lejeune P., Landini P., Dorel C. (2001).** Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *Journal of bacteriology*. 183(24): 7213-7223.



**Qin W., Zhao J., Yu X., Liu X., Chu X., Tian J., Wu N. (2019).** Improving Cadmium Resistance in *Escherichia coli* through Continuous Genome Evolution. *Frontiers in Microbiology*. 10: 278.



- Raghunath A., Perumal E. (2017).** Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49(2): 137–152.
- Rathinam N. K., Salem D. R., Sani R. K. (2019).** Biofilm engineering for improving the performance of microbial electrochemical technologies. In *Microbial Electrochemical Technology*. p: 315-338.
- Rivas L., Luque-Ortega J. R. (2007).** Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 51(4) : 1327-1332.
- Roisin L. (2021).** *Interactions entre Aspergillus fumigatus et Stenotrophomonas maltophilia au sein d'un biofilm mixte et modulation de leurs réponses aux antimicrobiens*. Thèse de doctorat en Sciences agricoles, Université Paris-Est. France. 21 p.
- Rokbani H. (2018).** *Élaboration de nouveaux matériaux nanocomposites antibactériens à base de nanoparticules d'oxyde de zinc*. Thèse de doctorat en Génie Chimique, Université de Montréal, Canada. 05 p.
- Roy R., Monalisa T., Gianfranco D., Vishvanath T. (2018).** Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1): 522-554.



- Sabri M. (2008).** *Etude sur l'importance relative des transporteurs des cations divalents du zinc, fer et manganèse dans la virulence des souches extra-intestinale pathogène des Escherichia coli (ExPEC)*. Thèse de doctorat en biologie, Institut Armand-Frappier, Canada. 20 p.
- Salome G.R. (2018).** *Acoustic confinement of Escherichia coli: the impact on biofilm formation*. Thèse de doctorat en Physique, Université de Sorbonne, France. 41 p.
- Saulou C. (2009).** *Evaluation des propriétés anti-adhésives et biocides de films nanocomposites avec inclusions d'argent, déposés sur acier inoxydable par procédé plasma*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université de Toulouse, France. p : 27-37
- 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.
- Sheng H., Xue Y., Zhao W., Hovde C. J., Minnich S. A. (2020).** *Escherichia coli* O157:H7 Curli Fimbriae Promotes Biofilm Formation, Epithelial Cell Invasion, and Persistence in Cattle. *Microorganisms*. 8 (4) : 580.
- Sidabe M. (2020).** *Caractérisation phénotypique de la résistance aux antibiotiques des souches d'Escherichia coli et de Klebsiella sppisolees chez les humains, les animaux et dans l'environnement au laboratoire rodolphemerieux de bamako*. Thèse de doctorat en Microbiologie, Université de Bamako. 10 p.
- Simoës M., Borges A., Lucia C. S. (2020).** Biofilm formation and resistance. *Recent Trends in Biofilm Science and Technology*. 1st.
- Spain A., Alm E. (2003).** Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research*. 2: 1-6.
- Staerk K., Khandige S., Kolmos H. J., Møller-Jensen J., Andersen T. E. (2016).** Uropathogenic *Escherichia coli* Express Type 1 Fimbriae Only in Surface Adherent Populations Under Physiological Growth Conditions. *The Journal of Infectious Diseases*. 213 (3): 386-394.

**Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A. (2000).** Modified microtiter-plate for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods*. 40(2) : 175-9.

**Sunil K., Niharika C., Leena S., Muhammad Z., Ajit V. (2019).** Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control. *Springer*. 150 p.

T

**Tatangelo A. (2006).** *Optimisation de la précipitation des métaux lourds en mélange et valorisation des boues d'hydroxydes : application aux effluents de traitement de surfaces. Ingénierie de l'environnement.* Thèse de doctorat en Sciences et Génie de L'environnement, Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, France. p : 25-26.

**Toe E. (2018).** *Évaluation des facteurs de risque de biocontamination par Salmonella et Escherichia coli virulents de la chaîne alimentaire des légumes à Abidjan (Côte d'Ivoire).* Thèse de doctorat en Microbiologie et Biotechnologie des Aliments, Université Nangui Abrogoua, Côte d'Ivoire. p : 14-37.

**Tré-Hardy M., Vanderbist F., Traore H., Devleeschouwer M.J. (2008).** In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 31 : 329–336.

**Tremblay Y. D. N., Hathroubi S., Jacques M. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en Santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2): 110-116.

T

**Vaillant V., Espié E. (2003).** *Facteurs de risque de survenue des syndromes hémolytiques et urémiques liés à une infection à Escherichia coli producteurs de shigatoxines chez les enfants âgés de moins de 15 ans: étude cas-témoins 2000- 2001.* Thèse de doctorat en Alimentaire, Institut de Veille Sanitaire, France. 61 p.

**Verma R., Das A., Sarmah D., Narzary PR., Sharma S., Kaman PK., Boro RC., Goswami S., Linggi B., Baruah JP. (2021).** a review article: Anti-quorum sensing agents as a potential replacement for antibiotics in Phytobacteriology. *The Pharma Innovation Journal*. 10(11): 121-125.

**Vogeeler P., Yannick D. N. T., Akier A. M., Mario J., Josée H. (2014).** Life on the outside: role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 5 : 317.

W

**Wang C., Liu L., Zhang A., Xie P., Lu J., Zou X. (2012).** Antibacterial effects of zinc oxide nanoparticles on *Escherichia coli* K88. *African Journal of Biotechnology*. 11(44): 10248-10254.

**Wang X., Preston J. F., Romeo T. (2014).** The pgaABCD Locus of *Escherichia coli* Promotes the Synthesis of a Polysaccharide Adhesin Required for Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*. 186(9): 2724-2734.

**Warnes S.L., Summersgill E.N., Keevil C.W. (2015).** Inactivation of Murine Norovirus on a Range of Copper Alloy Surfaces Is Accompanied by Loss of Capsid Integrity. *Applied and Environmental Microbiology*. 8(3) : 1085-1091.

**Wojnicz D., Sycz Z., Walkowski S., Gabrielska J., Aleksandra W., Alicja, K., Hendrich A. B. (2012).** Study on the influence of cranberry extract Žuravit 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.

**Wood T.K. (2009).** Insights on *Escherichia coli* biofilm formation and inhibition from whole-transcriptome profiling. *Environmental microbiology*. 11(1): 1-15.

**Wu C., Labrie J., Tremblay Y. D. N., Haine D., Mourez M., Jacques M. (2013).** Zinc as an agent for the prevention of biofilm formation by pathogenic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 115(1) : 3040.



**Xi C., Zhuangzhuang X., Zhaomeng R., Xiao H., Hui L., Pengfei S., Jie B. (2021).** Effect of Zinc Oxide Nanoparticles on Denitrification and Denitrifying Bacteria Communities in Typical Estuarine Sediments. *Oceanic and Coastal Sea Research*. 20 (3): 599-607

**Xia P., Lian S., Wu Y. (2021).** Zinc is an important inter-kingdom signal between the host and microbe. *Veterinary Research*. 52(1): 1-14.

**Xu C., Cai Y., Ren C., Gao J., Hao J. (2015).** Zinc-Triggered Hydrogelation of Self-Assembled Small Molecules to Inhibit Bacterial Growth. *Scientific reports*. 5(1) : 1-7.



**Yamamoto K., Ishihama A. (2005).** Transcriptional Response of *Escherichia coli* to External Zinc. *Journal of Bacteriology*. 187(18): 6333-6340.

**Yannick D., Skander H., Mario J. (2014).** Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 78(2) : 111.

**Yao K. R. (2019).** *Caractérisation phénotypique et moléculaire de salmonella sp et Escherichia coli isolées chez les bovins dans le district d'Abidjan (côte d'ivoire) : impact biologique de l'utilisation des antibiotiques.* Thèse de doctorat en Biologie Fonctionnelle et Moléculaire, Université de Félix Houphouët Boigny. 14 p.

**Ye Q., Chen W., Huang H., Tang Y., Wang W., Meng F., Wang H., Zheng Y. (2020).** Iron and zinc ions, potent weapons against multidrug-resistant bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 104(12): 5213-5227.



**Zaidi A., Ahmed B., Solanki B., Khan M. S., Musarrat J. (2018).** Bacterial toxicity of biomimetic green zinc oxide nanoantibiotic: Insights on ZnONPs uptake and nanocolloid-bacteria interface. *Toxicology Research*. 8(2) : 246-261.

**Zehani M. (2014).** *Optimisation du procédé polyol pour la synthèse de nanoparticules d'oxyde de zinc : mise à l'échelle du procédé et applications photovoltaïques.* Thèse de doctorat en Génie des Procédés, Université Paris-Nord, France. p : 05-10.

**Zhu W., Spiga L., Winter S. (2019).** Transition metals and host-microbe interactions in the inflamed intestine. *BioMetals*. 32(3) : 369-384.

# Annexe



1. Composition du milieu de culture et du colorant (Source : [www.aatbio.com](http://www.aatbio.com) ; [www.dufortlavigne.com](http://www.dufortlavigne.com) ).

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

Peptone	20
Chlorure de sodium	5,0
Hydrogénophosphate de potassium	2,5
Glucose	2,5

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

- Solution de cristal violet (g/ litre d'eau distillée)

Nacl	09
Cristal violet	0,1%
Ethanol	95%

## 2. Galerie biochimique miniaturisé API 20 E.

**Tableau 5 :** 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"> <li>- Comporte 20 tests</li> <li>- Destinée aux entérobactéries et à autre bacilles à Gram négatif.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 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 ;</li> <li>- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ;</li> <li>- Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ;</li> <li>- Remplir uniquement les tubes des autres tests ;</li> <li>- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ;</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lecture directe ou après addition de réactifs : se référer au tableau de lecture spécifique à l'API;</li> <li>- Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2 ou 4) est indiquée pour chacun.</li> <li>- 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.</li> </ul>	<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 6 : Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E

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

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