

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 cuivre**

Présenté par :

- ACHACHERA Amdjed
- DAFRI Boutheyna

Devant le jury :

Dr. DRIF F.

Dr. AMRI S.

Dr. BENHALIMA L.

Présidente

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 **Mme. DRIF F.**, 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 à remercier notre promotrice et directrice de mémoire **Dr. BENHALIMA L.** pour la qualité de son encadrement exceptionnel, sa patience, sa confiance, ses judicieux conseils et sa gentillesse. Nous avons eu l'honneur et la chance de bénéficier de ces connaissances et ces expériences qui nous guidaient pour finir notre travail.*

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

Merci beaucoup à nos chers parents, nos familles et nos amis, qui ont toujours été là, pour leurs amours, leurs encouragements et leurs conseils, ainsi que pour leurs soutiens moraux inconditionnels.

Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction	01
Chapitre I: Synthèse bibliographique	
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. Cuivre	12
III.1. Définition et utilisation de cuivre	12

III.2. Interactions bactérie-cuivre	13
III.3. Réponse de biofilm bactérien au cuivre	16
Chapitre II : Matériel et Méthodes	
I. Matériel biologique	18
I.1. Choix et origine des souches bactériennes	18
I.2. Vérification de la pureté des souches bactériennes	18
I.2.1. Revivification des souches bactériennes	19
I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique des souches bactériennes	19
II. Étude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress de cuivre	19
II.1. Préparation de différentes concentrations de cuivre	20
II.2. Préparation des cultures bactériennes	20
II.3. Inoculation de la microplaque	20
II.4. Détermination du pouvoir adhérent	21
III. Analyse statistique	21
Chapitre III : Résultats et Discussion	
I. Vérification de la pureté de la souche bactérienne	23
II. Étude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress de cuivre	23
II.1. Capacité de formation de biofilm en mono-espèce (<i>Escherichia coli</i>)	23
II.2. Capacité de formation de biofilm mixte (<i>Escherichia coli</i> – <i>Klebsiella oxytoca</i>)	25
III. Discussion	28
Conclusion et perspectives	32
Références bibliographiques	33
Annexe	45

Résumé

La présente étude a pour objectif la détermination de l'effet du cuivre 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 de cuivre sulfate 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 en particulier après 14 jours d'incubation. Des densités optiques proches de 1 ont été enregistrées vis-à-vis de concentrations importantes de cuivre (400 et 800 µg/ml). L'application du test ANOVA à un critère confirme que la concentration de cuivre n'a pas un effet sur la capacité d'*E. coli* à former un biofilm. La production de biofilm mixte a commencé dès le 4^{ème} jour d'incubation pour le couple *E. coli* 1- KO où elle a atteint sa valeur maximale après 14 jours avec une concentration de cuivre égale à 100 µg/ml. Le couple *E. coli* 2-KO montre une adaptation surtout à la concentration de 25 µg/ml de cuivre. Par ailleurs, le couple *E. coli* 3-KO semble adapter avec les différentes concentrations de cuivre au cours de toute la durée d'incubation. Une hyper-formation de biofilm a été remarquée chez le couple *E. coli* 4-KO au cours du 14^{ème} et 21^{ème} jour d'incubation en présence de 400 µg/ml et 100 µg/ml de cuivre, respectivement. La capacité de formation de biofilm par l'espèce *E. coli* en présence de cuivre, agent antibactérien, peut constituer un grand problème de santé publique.

Mots clés : *Escherichia coli*, biofilm mono-espèce, biofilm mixte, cuivre.

The aim of the present study was to determine the effect of copper 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 copper sulphate 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, especially after 14 days of incubation. Optical densities close to 1 were recorded against high copper concentrations (400 and 800 µg/ml). The application of the one-way ANOVA test confirms that the copper concentration has no effect on the ability of *E. coli* to form a biofilm. Mixed biofilm production started on the 4th day of incubation for the *E. coli* 1- KO pair and reached its maximum value after 14 days with a copper concentration of 100 µg/ml. The *E. coli* 2-KO pair shows adaptation especially at the 25 µg/ml copper concentration. On the other hand, the *E. coli* 3-KO pair seemed to adapt with the different copper concentrations during the whole incubation period. A hyper-formation of biofilm was noticed in the *E. coli* 4-KO pair during the 14th and 21st day of incubation in the presence of 400 µg/ml and 100 µg/ml copper, respectively. The ability of *E. coli* species to form biofilm in the presence of copper, an antibacterial agent, may be a major public health problem.

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

الهدف من هذه الدراسة هو تحديد تأثير النحاس على قدرة سلالة الإشريكية القولونية (*E. coli*) على تكوين غشاء حيوي. تم اكتشاف قدرة 04 سلالات متحصل عليها من بيئة مستشفى من خلال اختبار التصاق الصفائح الدقيقة باستخدام التلوين بالبنفسج البلوري. تم اختبار ست تراكيز من كبريت النحاس تتراوح من 25 الى 800 ميكروغرام / مل. حيث قمنا بتقييم تكوين الأغشية الحيوية أحادية النوع والمختلطة (*E. coli - Klebsiella oxytoca KO*). اظهرت النتائج أن تكوين الأغشية الحيوية أحادية النوع قوي لجميع السلالات الأربع، خاصة بعد 14 يومًا من الحضانة. فيما يتعلق بالتركيزات العالية من النحاس (400 و 800 ميكروغرام / مل) سجلت كثافات بصرية قريبة من 1. يؤكد تطبيق اختبار ANOVA أن تركيز النحاس ليس له تأثير على قدرة الإشريكية القولونية على تكوين غشاء حيوي. بدأ إنتاج الأغشية الحيوية المختلطة في اليوم الرابع من الحضانة لزوج الإشريكية القولونية KO-1 ووصل إلى قيمته القصوى بعد 14 أيام بتركيز نحاسي قدره 100 ميكروغرام/ مل. يُظهر زوج الإشريكية القولونية KO-2 تكيفا خاصة عند تركيز 25 ميكروغرام/مل من النحاس. من ناحية أخرى، فإن زوج الإشريكية القولونية KO-3 تكيف مع تركيزات النحاس المختلفة خلال فترة الحضانة بأكملها. كما لوحظ وجود تكوين مفرط للغشاء الحيوي في زوج الإشريكية القولونية KO-4 خلال اليومين 14 و 21 من الحضانة في وجود 400 ميكروغرام/مل و 100 ميكروغرام/مل من النحاس، على التوالي. اعتمادا على ما سبق ذكره فإن قدرة أنواع الإشريكية القولونية على تكوين أغشية حيوية في وجود النحاس، عامل مضاد للبكتيريا، يمكن أن تشكل مشكلة صحية كبرى.

الكلمات المفتاحية: الإشريكية القولونية، غشاء حيوي احادي النوع، غشاء حيوي مختلط النوع، النحاس.

Figure	Titre	Page
Figure 1	Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (Lebeaux et Ghigo, 2012).	03
Figure 2	Différentes interactions bactérie-métaux (Bauvais, 2015).	14
Figure 3	Pompe d'efflux chez <i>E. coli</i> vis-à-vis de cuivre (Gault, 2014).	15
Figure 4	Étude de la capacité de formation de biofilm chez <i>Escherichia coli</i> soumise au stress de cuivre.	22
Figure 5	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC1.	24
Figure 6	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC2.	24
Figure 7	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC3.	25
Figure 8	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC4.	25
Figure 9	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC1-KO.	26
Figure 10	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC2-KO.	26
Figure 11	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC3-KO.	27
Figure 12	Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC4-KO.	27

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Principaux caractères biochimiques d' <i>Escherichia coli</i> (Denis <i>et al.</i> , 2011).	08
Tableau 2	Caractéristiques cliniques et pathologiques des maladies causées par les principaux pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> chez l'homme (EL Achaoui, 2020 ; Mégane, 2019).	10
Tableau 3	Origine des souches d' <i>Escherichia coli</i> à étudier.	18
Tableau 4	Identification des souches d' <i>Escherichia coli</i> à étudier.	23
Tableau 5	Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E (Source: http://www.biomerieux.com).	46
Tableau 6	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (Source: http://www.biomerieux.com).	47

Introduction

Les communautés bactériennes sont fréquemment associées à diverses surfaces naturelles ou artificielles, formant des assemblages multicellulaires complexes appelés biofilms, enrobées dans une matrice polymérique extracellulaire protègent les bactéries contre le système immunitaire, les antibiotiques et les agents antimicrobiens (**Tremblay et al., 2014**). Le biofilm présente un problème majeur de santé publique rencontré dans plusieurs domaines, particulièrement l'environnement hospitalier (**Hage, 2021**). La capacité de former un biofilm est actuellement reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. *Escherichia coli* est l'une des nombreuses bactéries qui peuvent passer de la forme planctonique à la forme sessile, grâce aux différents appendices extracellulaires impliqués dans la colonisation de surface comprenant les flagelles, les fimbriaes et les exo-polysaccharides (**Lazar et al., 2017**) conduisant à la formation des biofilms matures et résistants, difficiles à éliminer et responsables à la dégradation d'une variété de matériaux et de diverses pathologies Infectieuses nosocomiales (**Vanzieleghem et Delmée, 2018**).

Plusieurs métaux ont attiré une attention considérable en tant qu'agents antibactériens et antibiofilms, utilisés particulièrement pour des applications cliniques et biotechnologiques en raison de leur capacité à détruire les microorganismes pathogènes, tels que l'argent (Ag), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) (**Obeizi et al., 2021**). Il a été démontré que le cuivre réduit la charge microbienne dans l'environnement hospitalier. Plus précisément, les dispositifs médicaux et les surfaces hospitalières à contact élevé qui sont souvent à l'origine de cas sporadiques et d'épidémies (**Montero et al., 2019**). Cet élément est également reconnu pour son efficacité contre le biofilm bactérien lorsqu'il est sous forme d'ions, en ralentissant la cinétique de formation et réduisant la production de produits extracellulaires de la matrice (**Hartemann, 2021 ; Lamache et al., 2020**).

En réponse à la présence de métaux, les cellules bactériennes ont développé au moins 22 systèmes de résistance pour répondre le plus précisément possible au stress induit par l'élément métallique afin de survivre (**Gillan, 2016**). Dans le cas du cuivre, certaines bactéries comme *Escherichia coli* pourraient induire une résistance comme moyen d'augmenter leur virulence potentielle et pour s'adapter à la toxicité due aux concentrations élevées de cuivre, à

travers un mécanisme d'efflux exprimée par des gènes chromosomiques qui confèrent une résistance accrue, couplé à des gènes plasmidiques (**Richard, 2019**). En effet, la présence de bactéries dans des biofilms peut renforcer leur résistance à ces agents antibactériens en diminuant la pénétration de substances et en renforçant le métabolisme des cellules bactériennes, cela conduit à une tolérance et persistance de biofilm (**Gozoua, 2019**).

Lors de cette étude, nous nous sommes interrogés sur la capacité d'*Escherichia coli* isolée d'un milieu hospitalier, soumise à une exposition de cuivre, 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 cuivre, à former un biofilm *in vitro* ;
- Détermination de l'effet antibactérien du cuivre vis-à-vis de l'espèce étudiée.

Ce manuscrit s'organise autour de trois parties :

- La première partie constitue un état de l'art 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 cuivre 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 (**Labadie, 2019**).

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

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

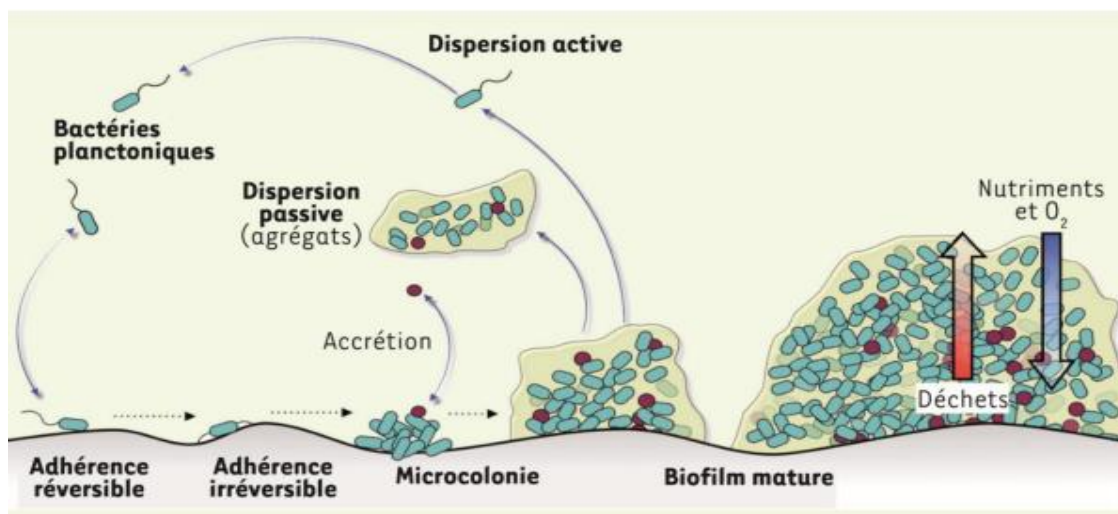


Figure 1: Différentes étapes de la formation d'un biofilm bactérien (**Lebeaux et Ghigo, 2012**).

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, où 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 (exo-polysaccharides) (**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, 2018**).

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 (**Brauge, 2015**).

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* (QS) 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-héparson 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 (**Manuel et al., 2020 ; Saulou, 2009**) :

- **Microorganismes**: La concentration microbienne a une relation proportionnelle avec le nombre de cellules adhérees, 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 matériaux, 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-adhésives tels 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 Stewart, 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 d'affecter 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. Il est isolé 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 (**Popa et Manko-Bük, 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. Elle est non halophile (elle 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)**.

Tableau1 : 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	-
Tetrathionate réductase	-
Mannitol	+

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

II.5. Caractères antigéniques

E. coli possède différents antigènes (**Marion, 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**).

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> Entérotoxinogènes (ETEC)	Production d'entérotoxines avec accumulation de fluide dans l'intestin.	Diarrhée chez les voyageurs «turista», 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> Entéropathogènes (EPEC)	Lésions de lamuqueuse 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 surcellules 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 (**Laurent et al., 2018**). Elle est capable à acquérir des gènes de résistance disséminés grâce aux plasmides multi-résistants et aux éléments génétiques mobiles (exemple : les transposons) et codants pour certaines enzymes spécifiques qui lui confèrent une résistance aux antibiotiques comme les céphalosporines (acquisition des gènes des β -lactamases), les carbapénèmes (acquisition des gènes de carbapénémases), les aminosides (les ARNr méthylases 16S), et aux agents plus anciens tels que les tétracyclines, les phénicolés, les sulfamides, le triméthoprime 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 (**Carenco, 2017**). Ainsi, il apparaît qu'*E. coli* peut résister aussi aux métaux qui sont utilisés depuis longtemps comme des agents antibactériens. Elle 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 (**Emmanuel 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., 2015)**. Les curli, qui sont des fibres minces protéiques extracellulaires de type amyloïde, contribue aussi à la résistance et à la formation de biofilms **(Haiqing et al., 2020)**. *E. coli* contient des exo-polysaccharides majeurs qui sont essentiels au maintien de la structure du biofilm et favorise l'adhésion cellule à cellule **(Agladze et al., 2005)**.

III. Cuivre

III.1. Définition et utilisation de cuivre

Le cuivre est un métal trace semi noble de formule chimique Cu, numéro atomique 29 et deux isotopes stables, il est présent principalement comme sulfide CuS et Cu₂S, énérite et oxyde Cu₂O **(Santini, 2012)**; c'est un métal ductile, malléable caractérisé par une conductivité électrique et thermique élevée et une bonne résistance à la corrosion **(Boulares, 2019)**.

Dans la nature, le cuivre s'est produit principalement au niveau de sol et de milieux aquatiques. C'est un micronutriment important pour différents processus biologiques et voies métaboliques chez les animaux, les plantes et les micro-organismes **(Baldari et al., 2020)**. Il est également utilisé comme un cofacteur dans diverses protéines et enzymes bactériens **(Virieux-Petit et al., 2022)**.

Le cuivre est un oligo-élément impliqué dans de nombreux domaines d'application technique et divers équipements industriels. En alliage, il existe plusieurs familles dépendant de l'application visée : les laitons, les bronzes, les cupro-aluminiums ou les cuivres faiblement alliés, dans le but d'améliorer leurs propriétés physiques **(Salvan, 2016)**.

Depuis des milliers d'années, le cuivre a été utilisé dans les civilisations humaines en raison de ces propriétés physiques et chimiques, il a été introduit dans la fabrication des

pièces de monnaie grâce à sa grande malléabilité et sa rareté (**Cakir, 2017**). Il est également impliqué dans la fabrication de câbles, connecteurs et couches de composants électroniques (**Luo, 2020**), dans les systèmes de plomberie, les surfaces de soins de santé et les dispositifs médicaux qui contenant 99% de cuivre comme les dispositifs intra-utérins (**Colin, 2019**).

III.2. Interactions bactérie-cuivre

À faible dose, le cuivre est un élément essentiel intervient dans plusieurs processus biologiques, tels que le transfert d'électrons, la gestion des métaux et le transport de l'oxygène, il joue aussi un rôle de facteur catalytique clé pour la formation de plusieurs enzymes (**Duparc, 2018**).

Les bactéries, peuvent interagir avec le cuivre via différents mécanismes pour l'immobiliser et limiter leur effet toxique (Fig. 2), influencés par les facteurs physico-chimiques tels que le pH, la température et le temps de contact, dont les principales stratégies sont :

- **La biosorption** : Processus passif de liaison métaboliquement indépendants, des ions métalliques à la paroi cellulaire des bactéries, elle peut être considérée comme la première étape de la bioaccumulation (**Fomina et Gadd, 2014**).
- **La bioaccumulation** : Processus actif métaboliquement dépendant, dans lequel les ions métalliques associés (adsorbés) à la surface traversent la membrane cellulaire et s'accumulent à l'intérieur de la cellule (**Casas, 2005**).
- **La biominéralisation** : Processus de synthèse de minéraux par les bactéries qui interagissent avec le cuivre de leur environnement et peuvent ainsi les immobiliser sous forme de minéraux solides (**Mirvaux, 2017**).
- **La biotransformation** : Consiste à convertir les ions métalliques de cuivre en une forme moins toxique ou en une autre forme plus facile et plus rapide à évacuer de la cellule bactérienne à travers une transformation enzymatique (**Hansda et al., 2016**).

À dose importante, le cuivre a été utilisé au niveau médical pour lutter contre les infections bactériennes, pour stériliser les blessures et traiter les inflammations (**Masson, 2015 ; Bougherra, 2018**). Au niveau de système immunitaire, les ions cuivre peuvent contribuer à augmenter la capacité des macrophages pour détruire les microorganismes infectants (**Hodgkinson et Petris, 2012**).

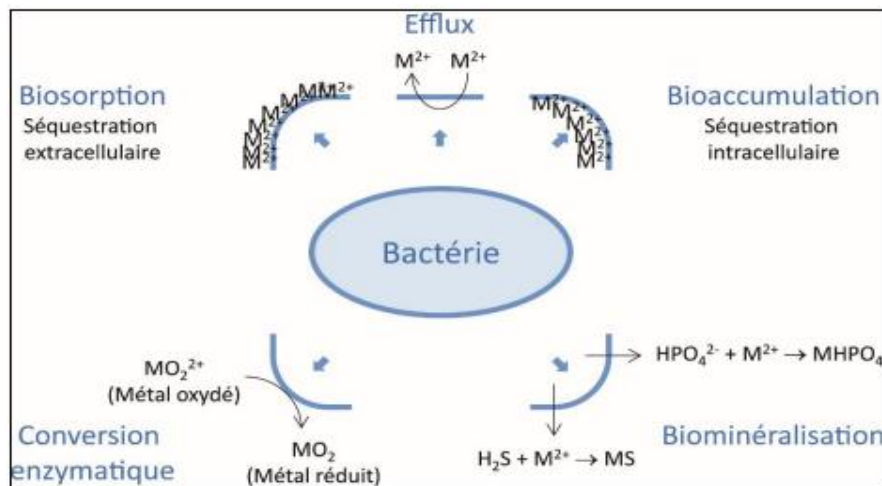


Figure 2: Différentes interactions bactérie-métaux (Bauvais, 2015).

Plusieurs études ont montré que l'accumulation de cuivre dans les cellules est très grande et très rapide, ce qui lui rend un agent antibactérien très puissant capable de lutter contre la prolifération de certaines bactéries responsables d'infections potentiellement mortelles (Bougherra, 2018 ; Esprito-Santo *et al.*, 2011).

Les effets délétères du cuivre se produisent par l'action directe de la libération d'ions Cu^{2+} , pouvant endommager principalement les protéines présentes dans l'enveloppe bactérienne, cela aboutit à leurs dysfonctionnements, ainsi que les dommages oxydatifs de l'ADN qui vont entraîner une désorganisation de la structure hélicoïdale et des altérations à la membrane cellulaire, le tout aboutissant à la mort cellulaire (Chatelot, 2020). En effet, l'activité antibactérienne de cuivre est généralement dépendante de sa concentration et de la charge bactérienne initiale (Ruparelia *et al.*, 2008).

Actuellement, les bactéries ont développé différentes stratégies de défense pour se protéger de forte dose toxique de Cu, qui dépendent à la fois des propriétés du cuivre et des capacités métaboliques des organismes. Elles sont codées par des gènes situés sur les chromosomes, les plasmides de taille différente, ou les transposons (Abskharon *et al.*, 2008) :

- **Systèmes d'efflux :** La plupart des microorganismes utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux lourds toxiques depuis leur cytoplasme

jusqu'au milieu extracellulaire. L'ion Cu^{2+} est exporté par un mécanisme impliquant quatre protéines séquestrant le cuivre dans le périplasma (**Ferret, 2012**).

Chez *E. coli*, le cuivre est enlevé de la cellule à travers un mécanisme d'efflux (Fig. 3). Les protéines d'efflux sont exprimées par les gènes chromosomiques *CueO* (l'oxydase à cuivre périplasmique), *CopA* (ATPase de type P exportant du cuivre), *CusSR* (un système senseur régulateur de cuivre) et *CusABCF* (Protéine du système d'efflux de cations) accompagnés par des autres gènes plasmidiques *Pco* (Protéine de liaison au cuivre) (**Esprito-Santo et al., 2007**).

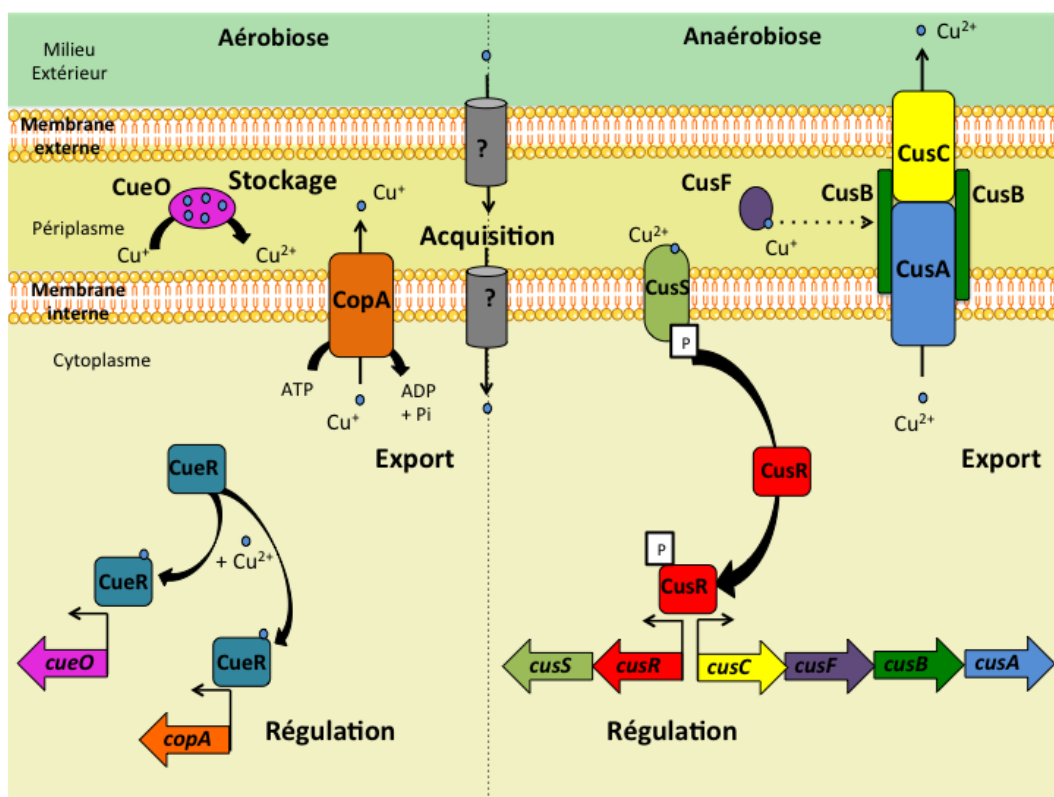


Figure 3: Pompe d'efflux chez *E. coli* vis-à-vis de cuivre (**Gault, 2014**).

En aérobiose, un excès d'ions cuivre dans le cytoplasme engendre la production d'une ATPase *CopA* permettant l'efflux des ions Cu^+ vers le périplasma. Une fois dans l'espace périplasmique, l'oxydase à multi-cuivre *CueO* oxyde les ions Cu^+ en Cu^{2+} afin de détoxifier le périplasma. Les gènes *CopA* et *CueO* sont activés par le métallorégulateur *CueR* (Régulateur d'efflux en cuivre) suite à la fixation d'ions Cu^{2+} . En anaérobiose, le système *CusCFBA* (Protéine du système d'efflux de cations), codant pour un système de transport de type RND (Division cellulaire de nodulation

de résistance). Les protéines CusCBA permettent l'efflux des ions Cu^{2+} et la protéine périplasmique CusF apporte les ions Cu^+ en excès dans le périplasme vers le système Cus (Senseur de cuivre) pour l'export vers l'extérieur de la cellule.

Ce système est régulé par CusRS qui est un système senseur régulateur à deux composants, CusS (Senseur histidine kinase) étant le senseur et CusR (Protéine de régulation transcriptionnelle) le régulateur.

- **Séquestration des ions métalliques** : Les bactéries sont capables de produire des protéines chélatrices spécifiques des métaux afin de réaliser une séquestration intra ou extracellulaire. Chez certaines bactéries, le cuivre est parmi les métaux les plus piégés par la synthèse de trois protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéines (Royet, 2018).
- **Réduction de la perméabilité membranaire** : Les bactéries ont la capacité d'altérer leur paroi ou leur membrane cellulaire, en formant un revêtement de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux (Perrin, 2009).
- **Détoxification enzymatique** : Ce mécanisme de résistance est assez commun, il consiste à la transformation chimique des ions métalliques à hautes concentrations, elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques (Monchy, 2007).
- **Réparation de protéine cible** : elle correspond à une réparation des composants cellulaires ciblés par le cuivre, cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule (Lemir, 2013).

III.3. Réponse de biofilm bactérien au cuivre

In vivo et *in vitro*, les résultats des recherche scientifiques sur des différentes bactéries ont montré un réel pouvoir antibactérien du cuivre et ces alliages et une remarquable efficacité particulièrement dans l'environnement hospitalier où les biofilms peuvent avoir un impact très important en santé (Casey *et al.*, 2010 ; Zykwincka *et al.*, 2016 ; Amara *et al.*, 2018).

Le cuivre induit directement ou indirectement des changements structuraux dans les biofilms bactériens qui se traduisent par des modifications de diversité au sein de la communauté bactérienne. Le changement en différents états d'oxydation entre Cu^+ et Cu^{2+} lui permet d'agir en catalyseur dans la production d'espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux libres qui ont la capacité de causer des dommages oxydatifs à des constituants vitaux des cellules comme les protéines, les acides nucléiques et les lipides (**O'Gorman et Humphreys, 2012**). Ce métal interagit avec les lipides de la membrane, il présente une affinité importante pour certains phospholipides initiaux dans sa composition et altérer donc la fluidité des membranes plasmiques et perturber le potentiel rédox et les transferts d'électrons (**Gehman et al., 2008 ; García et al., 2005**). Il peut également rentrer en concurrence avec les ions des autres métaux sur d'importants sites de liaison aux protéines, ceci induisant à la perte des fonctions des protéines et l'inactivation de certains enzymes cytoplasmiques (**O'Gorman et Humphreys, 2012**). Certaines études ont montré que les ions cuivre peuvent aussi s'insérer dans et entre les brins d'ADN, conduisant à fragiliser la structure hélicoïdale et à dénaturer l'ADN (**Borkow et Gabbay, 2009**) à travers le changement de l'arrangement de l'ADN en s'y attachant et en changeant sa conformation (**Noyce et al., 2007**).

Parallèlement à l'impact structural, le Cu engendre un impact fonctionnel sur le biofilm. Les activités enzymatiques sont influencées en se combinant avec le groupe de protéines actives des enzymes et l'activité β -glucosidase est diminuée significativement au sein des biofilms (**Lambert et al., 2012**).

En effet, il est très important de signaler que les bactéries utilisent le cuivre pour la formation de biofilms (**Whitchurch et al., 2002**) et que chez certaines bactéries la formation du biofilm entraîne une augmentation de la résistance au Cu de près de 600 fois (**Teitzel et Parsek, 2003**). Il est probable que le biofilm réduit fortement l'accès du cuivre aux bactéries, donc une communauté bactérienne préalablement exposée au Cu soit plus tolérante qu'une autre qui n'a jamais été préalablement exposée à ce métal. Plusieurs études ont montré une acquisition de la tolérance des communautés bactérienne au Cu, suite à la réalisation de tests de toxicité aiguë, basés sur la mesure de l'activité enzymatique β -glucosidase et de la respiration (**Fechner et al., 2011**).

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 (**Bezoui, 2016**).

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 quand 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 (**Touiri, 2020**).

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 20E (Annexe).

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

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 cuivre. Le cuivre testé est sous forme de cuivre sulfate pentahydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), PM = 159,6 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 (**Pantanella et al., 2013**).

II.1. Préparation de différentes concentrations de cuivre

Une solution mère de CuSO_4 , H_2O contenant 5 g/l a été préparée dans le TSB, puis stérilisée par filtration sur membrane (0,2 μm).

Six solutions filles sont obtenues par dilution successive au demi de la solution mère. Les concentrations du cuivre se répartissent dans les solutions filles entre 25 et 800 $\mu\text{g/ml}$.

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 cuivre (**Tré- Hardy et al., 2008**);
- Incuber les tubes pendant 1, 4, 8, 14 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 μ L d'éthanol à 95 % dans chaque puits, ce qui permet d'améliorer la sensibilité de lecture avec le spectrophotomètre ;
- Après 10 min d'attente, lire l'absorbance à 595 nm. Chaque duplicat de mesures a été répété deux fois sur des cultures bactériennes indépendantes.

II.4. Détermination du pouvoir adhérent

Les souches compte 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 concentrations du métal sur la capacité de formation de biofilm, les résultats sont soumis au test ANOVA à un critère, 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.

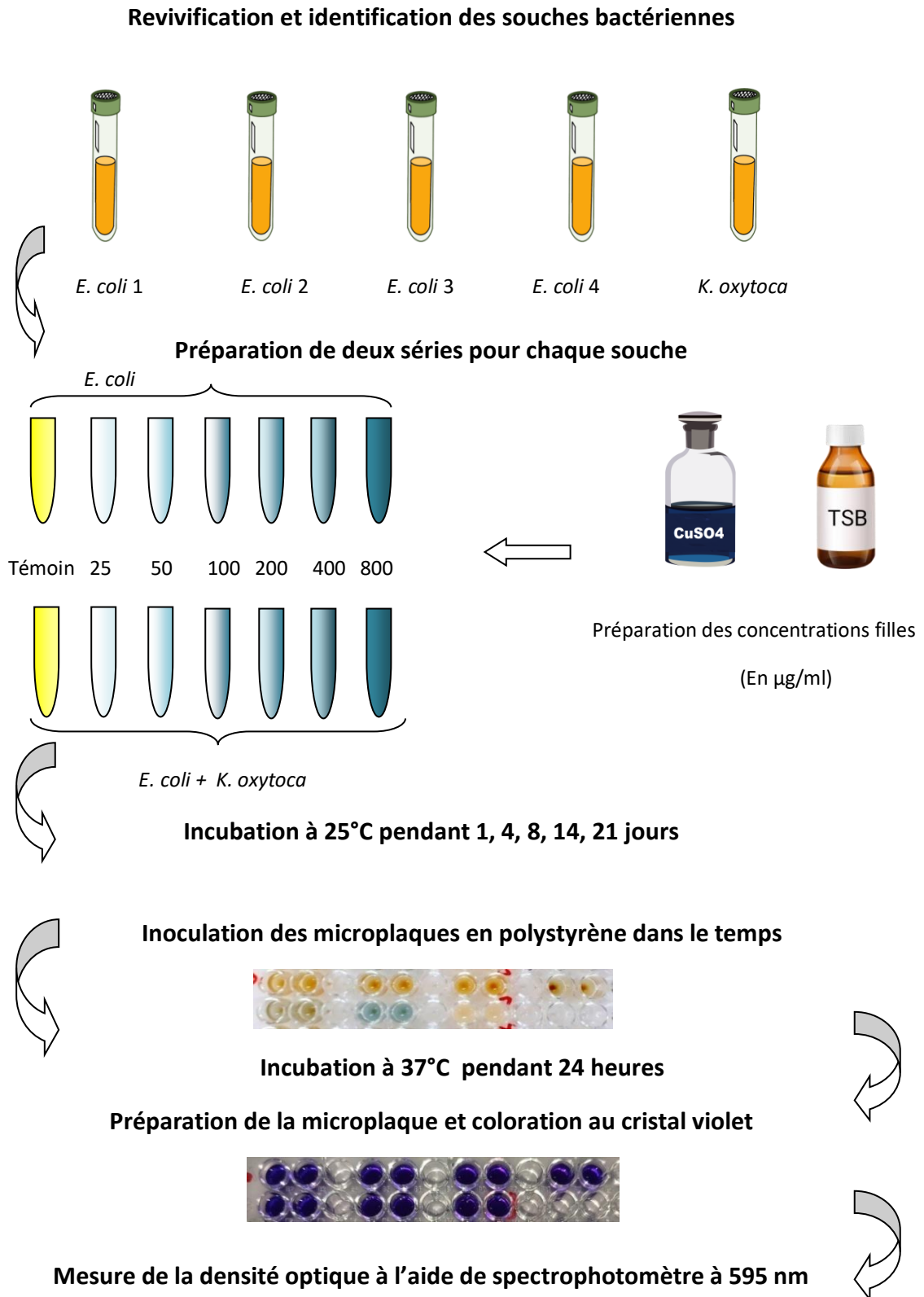


Figure 4: Étude de la capacité de formation de biofilm chez *Escherichia coli* soumise au stress de cuivre.

Chapitre III :

Résultats et

discussion

I. Vérification de la pureté du matériel biologique

La caractérisation phénotypique réalisée pour les quatre souches d'*E. 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 cuivre

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

L'exposition de l'espèce EC1 aux différentes concentrations de cuivre a montré une augmentation remarquable de la densité optique jusqu'au 14^{ème} jour d'incubation, où la formation de biofilm était la plus forte (Fig. 5). Après 21 jours, la souche reste fortement formatrice de biofilm (DO > 0,24) mais avec une densité plus faible, ce qui indique un effet antibactérien modéré de cuivre.

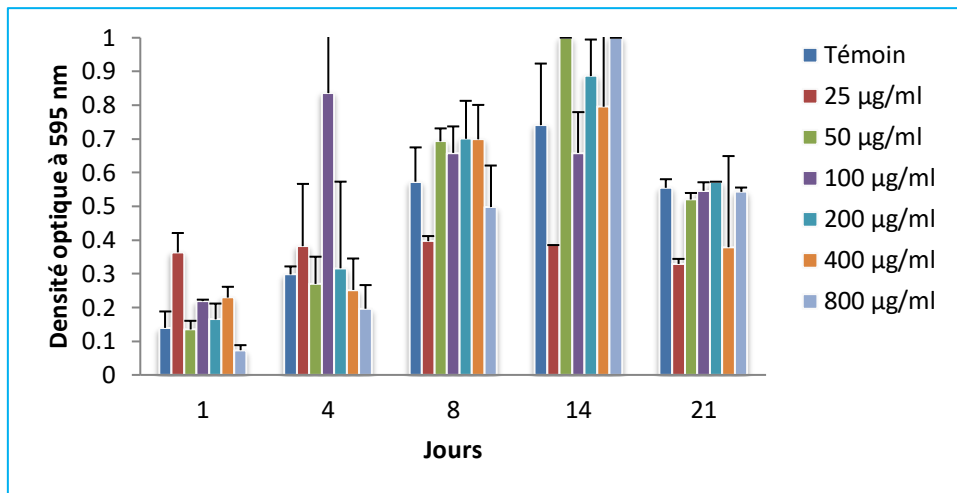


Figure 5: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC1.

Pour la souche EC2, la formation de biofilm était absente à modérée après un jour, dont les DO sont inférieures à 0,24. En revanche, l’augmentation de la durée d’incubation montre des DO comprises entre 0,4 et 1, ce qui exprime une production forte de biofilm commence à partir du 4^{ème} jour. Une croissance très accentuée a été remarquée avec des concentrations importantes de cuivre (exemple : 400 µg/ml après 14 jours) (Fig. 6).

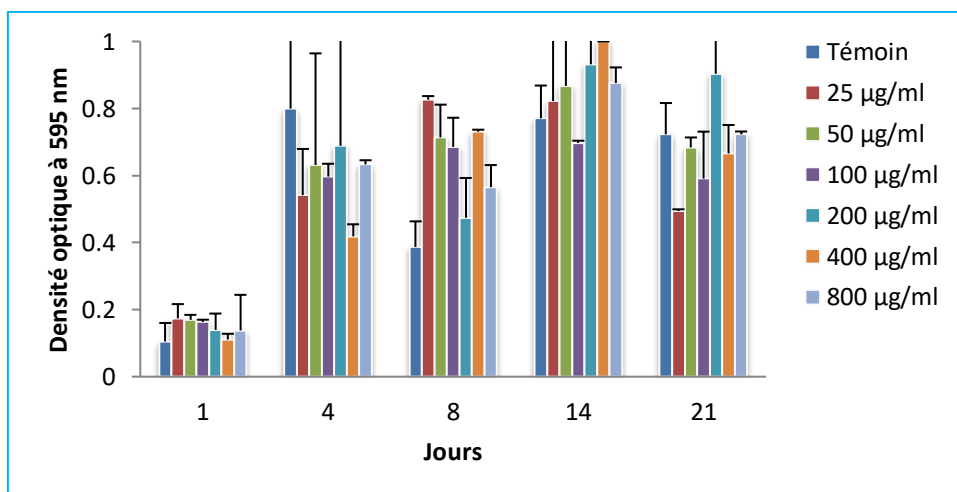


Figure 6: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC2.

D’après le graphe ci-dessous, la formation de biofilm chez la souche EC3 commence après 4 jours d’incubation où une forte production a été observée pour une concentration de cuivre égale à 200 µg/ml par rapport au témoin. En effet, la densité optique la plus élevée a été enregistrée après 14 jours même avec une concentration de 800 µg/ml (Fig. 7).

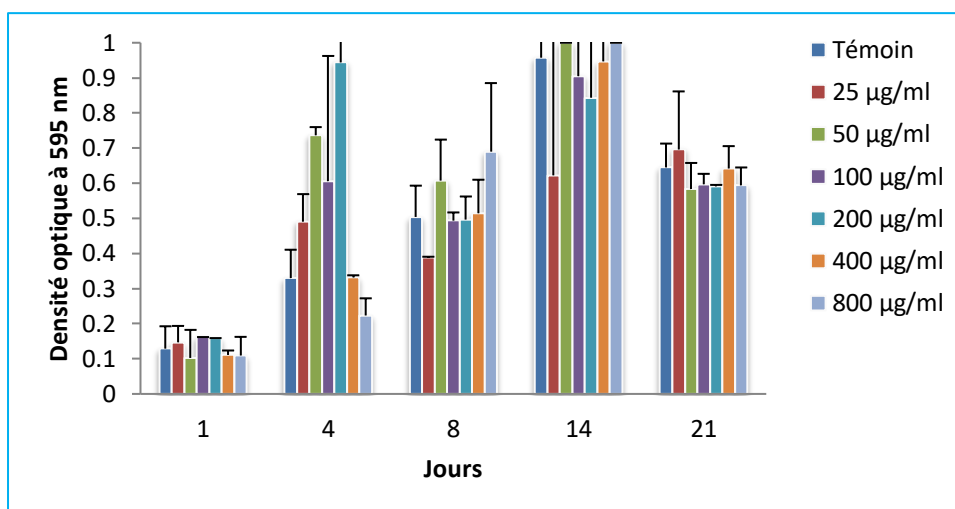


Figure 7: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC3.

Les résultats représentés par la figure 8 montrent que la souche EC4 a une capacité de formation de biofilm en présence de cuivre qui se diffère en fonction de la concentration du métal et de la durée d'incubation. L'hyper-production de biofilm ($DO \sim 1$) a été enregistrée après 14 jours avec la majorité des concentrations du cuivre testées.

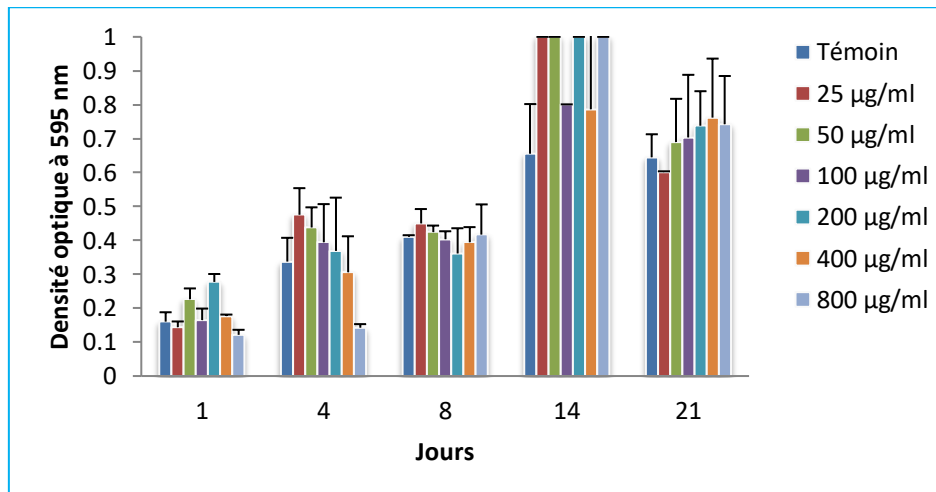


Figure 8: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez la souche EC4.

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

L'analyse des résultats obtenus a montré une absence à faible formation de biofilm chez le couple EC1-KO après une incubation de 24h. La production de biofilm mixte a

commencé dès le 4^{ème} jour d'incubation où elle a atteint sa valeur maximale après 14 jours avec une concentration de cuivre égale à 100 µg/ml (Fig. 9).

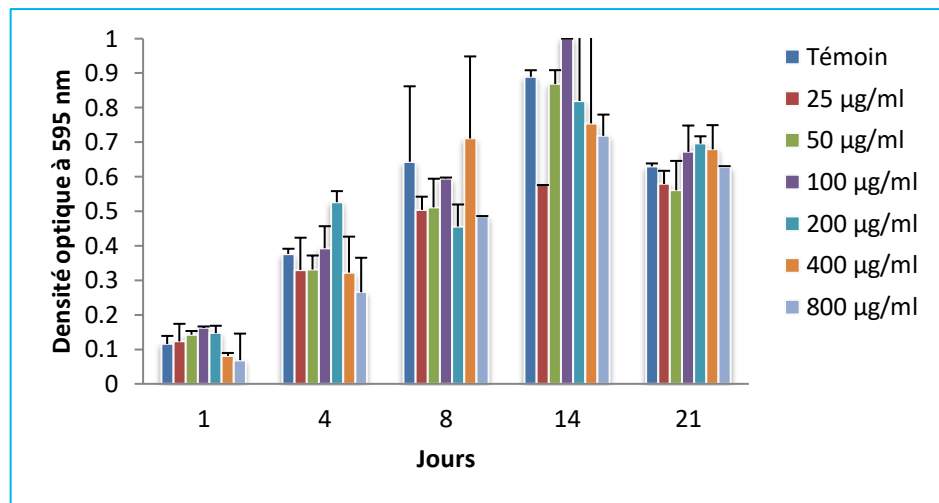


Figure 9: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC1-KO.

Au premier jour d'incubation, l'ensemble des deux souches EC2 et KO était fortement formatrice de biofilm en absence de cuivre. Par ailleurs, cette forte capacité a gardé une certaine stabilité avec l'augmentation de la durée d'incubation et en présence du métal. Le couple EC2-KO montre une adaptation surtout à la concentration de 25 µg/ml de cuivre après 14 jours qui se traduit par une densité optique proche du 1 (Fig. 10).

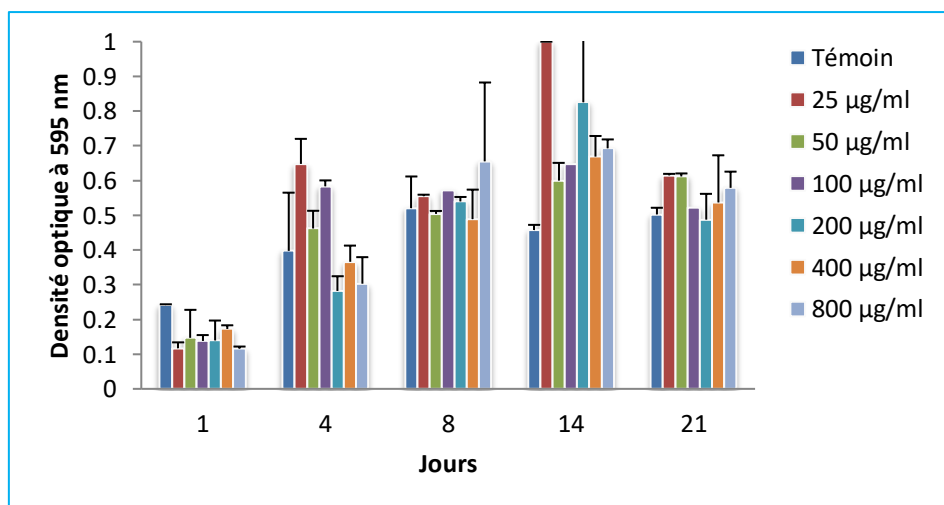


Figure 10: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC2-KO.

La figure 11 nous informe que le couple EC3-KO est fortement producteur de biofilm à partir du 4^{ème} jour. Une augmentation proportionnellement avec le temps a été remarquée. Ce couple semble adapter avec les différentes concentrations de cuivre au cours de toute la durée à étudier.

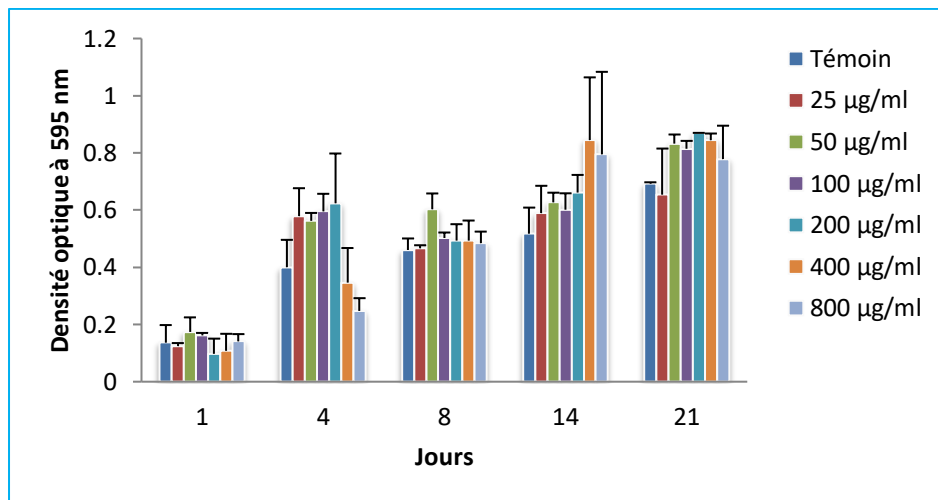


Figure 11: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC3-KO.

L’observation du graphe obtenu (Fig. 12) nous indique une hyper-formation de biofilm par le couple EC4-KO au cours du 14^{ème} et 21^{ème} jour d’incubation en présence des concentrations de cuivre qui sont égales à 400 µg/ml et 100 µg/ml, respectivement.

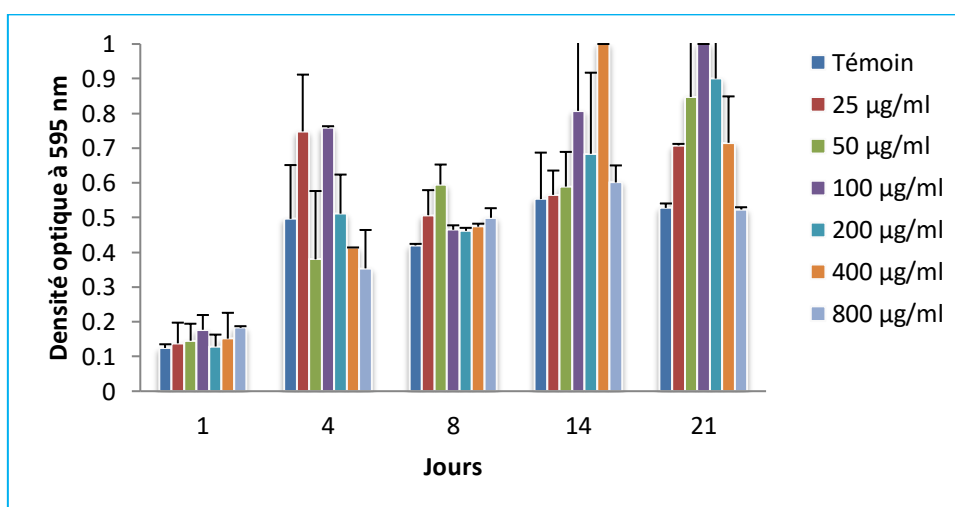


Figure 12: Effet du cuivre sur la formation de biofilm chez le couple EC4-KO.

III. Discussion

Les biofilms bactériens constituent un risque majeur sur la santé, ils préoccupent les acteurs de l'industrie agroalimentaire ou du milieu médical dans la mesure où ils sont à l'origine de contaminations croisées persistantes. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux agents antimicrobiens que les cellules bactériennes planctoniques (**Hage, 2021**).

Dans la présente étude, nous avons évalué la capacité de quatre souches différentes d'*Escherichia coli* soumises à l'exposition persistante du cuivre, à former des biofilms sur une surface modèle constituée par le fond d'une microplaque à 96-puits.

Les résultats obtenus après des périodes d'incubations comprises entre 1 et 21 jours ont montré généralement une capacité modérée à forte de cette bactérie à produire un biofilm mono-espèce, ce qui est en accord avec les résultats de **Le Hénaff et al. (2016)**. Cette aptitude de production est due principalement aux certains facteurs que possède *Escherichia coli*. Selon **Wang et al. (2021)**, la présence des lipides membranaires, des polysaccharides, des flagelles et des fimbriae type I qui augmentent largement l'attachement, l'adhésion bactérienne aux surfaces biotiques et abiotiques et le rapport de transformation au cours de la première phase de biofilm. Les exo-polysaccharides sont liés de manière covalente aux lipopolysaccharides de la surface bactérienne et représentent 90% du poids sec de biofilm, ils permettent les étapes initiales et la fixation à long terme de biofilms entiers, la reconnaissance, et le contact cellule-cellule (**Fulaz et al., 2019; Majed, 2017**). Par ailleurs, **Tursi et Tukel (2018)** ont défini la majorité des biofilms entériques qui incluent celles formés par *E. coli*, comme des bactéries productrices de curli. Ces derniers sont des fibres de protéines extracellulaires sous forme de fibres amyloïdes ordonnées, riches en feuillettes. Ils sont responsables du développement de l'architecture globale du biofilm et celles qui négocient l'attachement de surface initial.

D'après nos observations, les quatre souches étudiées ont présenté une production similaire approximativement au cours du 21^{ème} jour. Par ailleurs, les souches 3 et 4 sont considérablement les plus formatrices de biofilm au 14^{ème} jour d'incubation. Il est donc très important de dire que le cuivre n'avait qu'un faible effet inhibiteur sur la population

bactérienne. De plus, l'application du test ANOVA montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre l'effet des différentes concentrations de cuivre ($p > 0,05$) et donc ces dernières n'ont pas un effet direct sur la capacité de formation de biofilm chez *E. coli*. Les résultats de **Raffi et al. (2010)** ont rapporté que l'inhibition de la croissance d'*Escherichia coli* dépend principalement de l'utilisation d'une concentration appropriée de cuivre, afin d'avoir un effet délétère. Dans le même contexte, **Reyes-Jara et al. (2016)** ont trouvé que l'addition d'une forte concentration de Cu peut induire une inactivation d'*E. coli* et prévenir sa multiplication.

La diminution 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 cuivre qui a permis une légère diminution de la charge bactérienne. **Massieux et al. (2004)** ont démontré que le cuivre affecte la physiologie du biofilm et la structure des communautés qui le compose rappelant que le cuivre peut altérer la membrane d'*E. coli* et induire des dommages oxydatifs aux phospholipides membranaires, ainsi que l'inhibition des exopolysaccharides (**Hong et al., 2012 ; Warnes et al., 2012 ; Espírito Santo et al., 2011**).

Il est très important aussi d'expliquer le faible effet inhibiteur de cuivre et la présence d'un niveau élevé de croissance d'*E. coli* à la résistance et/ou la tolérance bactérienne vis-à-vis de ce métal. Cette espèce bactérienne possède plusieurs systèmes afin de limiter l'effet toxique de cuivre. Selon **Azzouzi (2013)**, les gènes accessoires qui interviennent à cette résistance sont portés sur le plasmide bactérien, ils s'agissent de 7 gènes *PcoABCDRSE* (Protéine de liaison au cuivre) organisés en trois opérons : *PcoABCD*, *PcoRD* et *PcoE*. D'après les études de **Djoko et al. (2017)**, l'élimination des ions de cuivre Cu^+ présentes dans le cytoplasme est basée principalement sur l'introduction des gènes chromosomiques qui codent pour deux systèmes différents. Le système Cue (Cu efflux) impliqué en condition d'aérobie et d'excès de cuivre, qui est constitué d'un transporteur transmembranaire des ions Cu^+ , nommé l'ATPase CopA (ATPase de type P exportant du cuivre) et de l'oxydase à cuivre périplasmique CueO en forme moins toxique Cu^{2+} ; ce système est modulé par un régulateur sensible au cuivre annoté CueR (Régulateur d'efflux en cuivre). En revanche, **Bador, (2013)** a montré l'existence d'un autre système chromosomique Cus (senseur) responsable de la résistance de l'espèce étudiée au Cu en condition d'anaérobiose, il peut

transporter le cuivre du cytoplasme ou périplasme vers le milieu extérieur à travers la protéine périplasmique CusF qui apporte les ions Cu^+ en excès vers les protéines CusABC (Protéine du système d'efflux de cations), pour l'exporter vers l'extérieur de la cellule.

En se basant sur les densités optiques mesurées, Il est très intéressant de signaler que la formation de biofilm a été augmentée dans la plupart des tubes contenant la solution de métal, en fonction du temps. Plusieurs études ont confirmé que la résistance bactérienne et la formation de biofilm sont accentuée avec une augmentation de la durée de contact (**Shatila et al., 2021**). De plus, **Giachino et Waldron (2020)** et **Whitchurch et al. (2002)** ont confirmé que le cuivre peut être utilisé par la bactérie comme un micronutriment et un cofacteur dans divers protéines et enzymes bactériens et dans la formation de biofilm.

Un potentiel considérable de production de biofilm double-espèce a été également mis en évidence chez le couple *Escherichia coli* et *Klebsiella oxytoca* soumises à l'exposition du cuivre sous les mêmes conditions d'incubation et de concentrations. Selon les études de **Seghir et al. (2017)**, dans un biofilm mixte, les distances intercellulaires sont souvent extrêmement petites. Par conséquent, de multiples interactions synergiques entre les co-colonisateurs sont répandues, elles permettent le maintien d'un biofilm multi-espèces dynamique et l'apparition des complémentarités métaboliques bénéfiques, comme la co-agrégation et la co-adhésion, qui peuvent être la source d'une modulation de la résistance aux agents antimicrobiens, alors qu'en même temps, il existe des concurrences pour les sites d'adhérence et les nutriments entre les espèces concernées.

Yan et al. (2021), ont rapporté que la souche *Klebsiella oxytoca* est capable de produire des biofilms riches et denses dans la présence de cuivre, ce qui confirme leur résistance à ce métal. En revanche, **Juarez et Galvan (2018)** ont montré qu'au sein d'un biofilm hétérogène, le genre *Klebsiella* a induit un effet néfaste sur *Escherichia coli*, qui se traduit par une compétition des nutriments. Dans ce contexte, l'analyse des résultats obtenus a montré une légère diminution de la production de biofilm chez le couple *E. coli* et *K. oxytoca* par rapport au biofilm mono-espèce étudié. Des résultats similaires ont été mis en évidence par **Galvan et al. (2016)**, qui ont expliqué la réduction du nombre de cellules d'*E. coli* cultivables dans les biofilms à deux espèces par l'hypothèse du détachement cellulaire favorisé par l'association avec *Klebsiella* et l'existence d'un probable effet du

Klebsiella sur la souche étudiée. Cela peut être justifié par la production des métabolites et de polymères spécifiques conduisant à des activités antagonistes entre les deux espèces.

Ce travail de recherche a pu suffisamment montrer un potentiel considérable chez les souches d'*Escherichia coli* isolées d'un milieu hospitalier à produire un biofilm mono-espèce et mixte, résistant au cuivre. Donc un contrôle de l'utilisation de cuivre peut être discuté afin d'éviter les risques de diminution de son activité antibactérienne en raison de résistances. De nombreux travaux restent néanmoins nécessaires pour chercher des solutions concernant ce problème.

Conclusion et Perspectives

Les résultats du suivi de la capacité d'*Escherichia coli* à former un biofilm soumise à une exposition de cuivre, permettent la mise en évidence de 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 de cuivre ;
- Des densités optiques de la charge bactérienne très importantes ont été enregistrées vis-à-vis de différentes concentrations de cuivre ;
- Le cuivre 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 cuivre.

En perspectives, il s'avère donc intéressant de réaliser d'autres études plus approfondies pour :

- Déterminer les mécanismes d'adhésion et mieux comprendre les cinétiques de constitution de biofilms, afin d'améliorer les stratégies anti-biofilms ;
- Etudier les contacts collectifs entre les bactéries d'un biofilm et faire plus de recherches sur le *Quorum Sensing* ;
- Chercher des solutions efficaces pour augmenter l'accès de cuivre aux couches profondes de biofilms matures difficiles à éradiquer ;
- Etudier les biofilms hétérogènes et les différentes interactions entre les espèces concernées afin de créer des nouvelles méthodes pour limiter ces risques dans les milieux hospitaliers ;
- Elaborer des nouvelles techniques comme l'inhibition de la formation des exopolysaccharides et Des systèmes de résistance bactérienne afin d'augmenter l'efficacité de cuivre vis-à-vis des biofilms.


Références Bibliographiques



- Abskharon 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. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology*. 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).
- Algburi A., Comito N., Kashtanov D., Dicks L.M., Chikindas M.L. (2016).** Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *ASM journal*. 83(3): 7.
- Amara I., Miled W., Slama R.B., Ladhari N. (2018).** Antifouling processes and toxicity effects of antifouling paints on marine environment. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 57: 115-130.
- Aumeran C., Balestrino D., Forestier C. (2020).** Biofilms bactériens et santé. *Encyclopédie de l'environnement*. 2p.
- Avril J.L., Dabernat H., Denis F. (2000).** Bactériologie Clinique. *Ellipses*. (3): 511.
- Azzouzi A. (2013).** *L'homéostasie du cuivre chez la protéobactérie Rubrivivaxgelatinosus*. Thèse de doctorat en Biologie, Université Paris Sud, France.



- Bador J. (2013).** *Résistance aux antibiotiques par mécanisme d'efflux chez Achromobacter xylosoxidans*. Thèse de doctorat en Science de la Vie, Université de Bourgogne, France.
- Baldari S., Di Rocco G., Toietta G. (2020).** Current Biomedical Use of Copper Chelation Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (3): 1.
- Bauvais C. (2015).** *Diversité chimique et bactéries associées à Spongiaofficinalis, une éponge marine accumulatrice de métaux*. Thèse de doctorat en Ecologie chimique et Microbienne, Université de Pierre et Marie Curie – Paris, France. 39p.
- Bezoui M. (2016).** *Biofilm bactérien et leur implication en pathologie humaine*. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université Mohammed V-Rabat, Maroc. 39p.
- Bidet P., Bonarcorsi S., Bingen E. (2012).** Facteurs de pathogénicité et physiopathologie des *Escherichia coli* extra- intestinaux. *Société Française de Pédiatrie*. 19(3) : 85.
- 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. 9p.
- Blount D.Z. (2015).** The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*. 4(5826): 1.
- 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: 672–680.

- Borkow G., Gabbay J. (2009).** Copper, an ancient remedy returning to fight microbial, fungal and viral infections. *Current Chemical Biology*. 3(3): 272-278.
- Bougherra H. (2018).** *Synthèse et caractérisation de complexes du cuivre(II) avec la diméthylglyoxime, une série d'acides aminés, les bases puriques et l'ortho-phénylènediamine. Application biologique.* Thèse de doctorat en Chimie, Université Mouloud Mammeri, Algérie. 9p.
- Boulares A. (2019).** *Élaboration électrochimique des films composites à base d'oxyhydroxyde de titane et d'oxyde de manganèse TiO(OH)2/MnO2 sur le cuivre. Caractérisation, propriétés et application anticorrosion en milieu chloruré.* Thèse de doctorat en Chimie, Université bourgogne franche-comte, France. 6p.
- Brauge T. (2015).** Etude des exopolysaccharides de la matrice extracellulaire des biofilms de *Listeria monocytogenes*. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Université Lille 1- Sciences et technologies, France. 385p.
- 
- Cakir D. (2017).** *Enhanced raman signatures on copper based-materials.* Thèse de doctorat en Physique, Université de Montpellier, France. 5p.
- 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, France. 42p.
- Carenco P. (2017).** Antibiorésistance et biocides. Informations du réseau national de prévention des infections associées aux soins. *Bulletin CCLin-Arlin*. (7): 9.
- Casas S. (2005).** *Modélisation de la bioaccumulation de métaux traces (Hg, Cd, Pb, Cu et Zn) chez la moule, Mytilusgalloprovincialis, en milieu méditerranéen. Interactions entre organismes.* Thèse de doctorat en Océanologie biologique et Environnement marin, Université du Sud Toulon Var, France.
- Casey A.L., Adams D., Karpanen T.J., Lambert P.A., Cookson B.D., Nightingale P., Miruszenko L., Shillam R., Christian P., Elliott T.S.J. (2010).** Role of copper in reducing hospital environment contamination. *The journal of Hospital infection*. 74(1): 72-77.
- Chatelot L. (2020).** *Les nanoparticules en orthopédie dento-faciale.* Thèse de doctorat en Chirurgie Dentaire, Université de Lorraine, France. 17p.
- 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 Sciences vétérinaires, Université de Montréal, Canada. 61p.
- 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. 23p.
- Colin M. (2019).** *Evaluation de l'activité antibactérienne d'éléments en alliages de cuivre dans des établissements de santé.* Thèse de doctorat en Microbiologie, Université de Reims Champagne-Ardenne, France. 36p.

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): 252-5.

D

Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. *Technique et Documentation*. p: 289- 476.

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

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 des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako, Mali. 3p.

Djoko K Y., Phana M.D., Kate M. Peters K.M, Walkera M.J, Mark A., Schembri M.A., Alastair G.M. (2017). Interplay between tolerance mechanisms to copper and acid stress in *Escherichia coli*. *PNAS Direct Submission*. 26(114): 6818–6823.

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

Duparc V.H. (2018). *Complexes de cuivre(II) portant des ligands sulfonés ou carboxylates et leur application en catalyse*. Thèse de doctorat en Chimie, Université de Montréal, Canada.

E

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

EL Khoury N. (2021). *Intégration des bactéries planctoniques dans le biofilm et étude fonctionnelle du gène plasmidique Bthur62720 chez Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat en Bactériologie, Université Paris-Saclay, France. 27p.

Emmanuel W.B., Collins N.A., Kim S., Tim A.M., Yan D.N. (2020). Biofilm formation by South African non-O157 Shiga toxicogenic *Escherichia coli* on stainless steel coupons. *Canadian Journal of Microbiology*. 66 (4): 328.

Esprito-Santo C, Lam W.E, Elowsky C.G, Quaranta D, Domaille D.W, Chang C.J., Grass G. (2011). Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Applied Environmental Microbiology*. 77(3): 794.

Esprito-Santo C., Taudte N., Nies D.H., Grass G. (2007). Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surface. *Applied and environmental microbiology*. 74(4): 977.



- Fechner L.C., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M.H. (2011).** Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. *Ecotoxicology*. 20(4): 793-802.
- Ferret C. (2012).** *Rôle des Pseudomonas fluorescents dans la biodisponibilité des métaux contaminant les minéraux du sol : application à la phytoremediation.* Thèse de Doctorat en Sciences du vivant, Université de Strasbourg, France. p: 60-62.
- Florence B.J. (2014).** Identification et caractérisation des exopolymères de biofilms de bactéries marines. Thèse de doctorat en Microbiologie et Biochimie, Université de Toulon, France. 76p.
- Fomina M., Gadd G.M. (2014).** Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresourcetechnology*. 160 : 3-14.
- Fulaz S., Vitale S., Quinn L., Casey E. (2019).** Nanoparticle–Biofilm Interactions: The Role of the EPS Matrix. *Trends in Microbiology*. 27(11): 915-926.



- Galván E.M., Mateyca C., Lelpi L. (2016).** Role of interspecies interactions in dual-species biofilms developed *in vitro* by uropathogens isolated from polymicrobial urinary catheter-associated bacteriuria. *Biofouling*. 32(9): 1067-1077.
- García J.J., Martínez-Ballarín E., Millán- PlanoS., Allué J.L., AlbendeaC., Fuentes L., Escanero, J.F. (2005).** Effects of trace elements on membrane fluidity. *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*. 19(1): 19-22.
- Gault M. (2014).** *L'homéostasie des métaux chez la bactérie Escherichia coli : de l'analyse générale d'un stress sur l'expression des gènes, à la compréhension des mécanismes moléculaires.* Thèse de doctorat en Microbiologie Moléculaire, Institut nationale des Sciences Appliquées de Lyon, France. 26p.
- Gehman J.D., O'Brie C.C., Shabanpoor F., Wad J.D., Separovic F. (2008).** Metal effects on the membrane interactions of amyloid-beta peptides. *European biophysics journal*. 37(3): 333-344.
- Giachino A., Waldron K.J. (2020).** Copper tolerance in bacteria requires the activation of multiple accessory pathways. 00:1-14.
- Gillan D.C. (2016).** Metal resistance systems in cultivated bacteria: are they found in complex communities. *Current Opinion Biotechnology*. 38: 123-130.
- Goetz C. (2018).** *Caractérisation de molécules antibiofilm produites par des souches de staphylocoques isolées dans des cas de mammite bovine.* Thèse de doctorat en Sciences vétérinaires, Université de Montréal, Canada. 44p.
- Gozoua E. (2019).** *Etude du quorum sensing des bactéries organisées en biofilm en vue de la mise en place de biocides non toxiques.* Thèse de doctorat en Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie, Université de Toulon, France. 60p.

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

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



Hage M. (2021). *Understanding the mechanisms of interactions at interfaces between bacteria and materials: development of anti-adhesion and anti-biofilm surfaces.* Thèse de doctorat en Chimie des matériaux, Université de Lille, France. 8p.

Haiqing S., Yansong X., Wei Z., Carolyn J.H., Scott A.M. (2020). *Escherichia coli O157:H7 Curli Fimbriae Promotes Biofilm Formation, Epithelial Cell Invasion, and Persistence in Cattle.* *Microorganism.* 8 (4): 1-2.

Hansda A., Kumar V., Anshumali. (2016). A comparative review towards potential of microbial cells for heavy metal removal with emphasis on biosorption and bioaccumulation. *World journal of microbiology and biotechnology.* 32(10):170.

Hartemann P. (2021). Les métaux et la santé. *Hegel.* 3: 244-250.

Hodgkinson V., Petris M.J. (2012). Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *Journal of Biological Chemistry.* 287(17).

Hong R., Kang T.Y., Michel C.A., Gadura N. (2012). Membrane lipid peroxidation in copper alloy-mediated contact killing of *Escherichia coli*. *Applied Environmental Microbiology.* 78: 1776-1784.

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



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: 101-7.



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.



Labadie M. (2019). *Implication des composantes matricielle et cellulaire de biofilms bactériens modèles en réponse à des traitements physiques : standardisation d'outils d'analyse et application aux technologies jet*

- de plasma froid et LED UV-C*. Thèse de doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries, Université Toulouse 3 - Paul Sabatier, France. 33p.
- Lamache A., Doghri I., Jacques M., Boudjenah-Haroun S. (2020)**. Étude des biofilms bactériens isolés à partir du système de distribution d'eau potable dans la région sud-est de l'Algérie. *Journal of water science*. 32(4): 316-474.
- Lambert A.S., Morin S., Artigas J., Volat B., Coquery M., Neyra M., Pesce S. (2012)**. Structural and functional recovery of microbial biofilms after a decrease in copper exposure: Influence of the presence of pristine communities. *Aquatic toxicology*. 109: 118-126.
- Laurent P., Jean-Yves M., Agnese L., Anne-Kathrin S., Nicolas K., Patrice N., Stefan S. (2018)**. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*, *ASM Journals Microbiology Spectrum*, 6(4).
- Lazar M., Branko V., Tatjana B., Aleksandra N., Radmila M., Vesna D. (2017)**. Characterization of biofilms produced by *Escherichia coli* O157 isolated from cattle hides. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 85: 1.
- Lebeaux D., Ghigo J.M. (2012)**. Infections associées aux biofilms : Quelles perspectives thérapeutiques issues de la recherche fondamentale. *Med Sci (Paris)*. 9(28): 729.
- Lemir J.A., Harrison J.J., Turner R.J. (2013)**. Antimicrobial activity of metals: mechanisms molecular targets and applications. *National review of microbiology*. 11(6): 371-384.
- Luo J. (2020)**. *Corrosion of copper in antibacterial efficiency test*. Thèse de doctorat en Sciences des Matériaux, Université des Saarlandes, Allemagne. p: 13-14.



- Majed R. (2017)**. *Etude des Eps1 et Eps2, deux exopolysaccharides du biofilm chez Bacillus thuringiensis*. Thèse de doctorat en Sciences de la Vie et de la Santé, Université Paris-Saclay, France. 46 p.
- Manuel S., Anabela B., Lucia C.S. (2020)**. Recent Trends in Biofilm Science and Technology.
- Marion P. (2020)**. *L'impact du sevrage chez les ruminants sur le portage des Escherichia coli entérohémorragiques*. Thèse de doctorat en Médecine vétérinaire, Université Paul-Sabatier de Toulouse, France. 11p.
- Massieux B., Boivin M.E., Van Den Ende F.P., Langenskiöld J., Marvan P., Barranguet C., Admiraal W., Laanbroek H.J., Zwart G. (2004)**. Analysis of structural and physiological profiles to assess the effects of Cu on biofilm microbial communities. *Applied and environmental microbiology*. 70(8): 4512-4521.
- Masson J.L. (2015)**. *Le cuivre sur les surfaces en milieux de santé pour lutter contre les infections nosocomiales*. Thèse de doctorat en Pharmacie, Université de Lorraine, France. 10p.
- 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 Sciences de vivant, Université de Tours, France. 16p.

- Michaut M. (2018).** *Déterminisme environnemental de la contamination par Escherichia coli des eaux et des biofilms d'un hydrosystème karstique.* Thèse de doctorat en Bactériologie, Université de Rouen Normandie, France. 29p.
- Miquel S., Lagrafeuille R., Souweine B., Forestier C. (2016).** Anti-biofilm Activity as a Health Issue. *Frontiers in Microbiology.* 7(592): 4.
- Mirvaux B. (2017).** *Des oxides aux matériaux polyanioniques, valeurs ajoutées de la biominéralisation bactérienne de matériaux de batterie.* Thèse de doctorat en Chimie et Electrochimie des matériaux, Université de Picardie Jules Verne, France. 3p.
- Monchy S. (2007).** *Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez Cupriavidusmetallidurans CH34.* Thèse de Doctorat en Sciences, Université libre de Bruxelles, Belgique. p:15-23.
- Montero D.A., Arellano C., Pardo M., Vera R., Gálvez R., Cifuentes M., Berasain M.A., Gómez M., Ramírez C., Vidal R.M. (2019).** Antimicrobial properties of a novel copper-based composite coating with potential for use in healthcare facilities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* 8(3): 2.



- Nauciel C., Vildé J.L. (2005).** *Escherichia coli.* In Bactériologie médicale. 2ème édition. p: 122-125.
- 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 meticillin resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. *Journal of Hospital Infection.* 63: 289-297.
- Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. (2007).** Inactivation of Influenza A Virus on Copper versus Stainless Steel Surfaces. *Applied and Environmanal Microbiology.* 73(8): 2748-2750.



- Obeizi Z., Benbouzid H., Djahoudi A. (2021).** Évaluation de l'activité antibactérienne et anti-biofilm des nanoparticules de dioxyde d'étain (SnO₂). *Journal of Advanced Research in Science and Technology.* 7(2): 22-34.
- O'Gorman J., Humphreys H. (2012).** Application of copper to prevent and control infection. *Journal of hospital infection.* 81(4): 2017-2023.
- Oulymata G. (2007).** *Utilisation des méthodes biométriques dans l'identification de quelques bacilles à gram négatif.* Thèse de doctorat en Pharmacie, Université Cheikh AntaDiop de Dakar, Mali. 6p.



- Pantanella F., Valenti P., Natalizi T., Passeri D., Berlutti F. (2013).** Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene*. 25: 31-42.
- 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.
- 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 Sciences vétérinaires option Microbiologie, Université de Montréal, Canada. 37p.
- Percival S.L., Williams D.W. (2014).** *Escherichia coli*. In *Microbiology of waterborne diseases*. 2ème édition. Academic Press. p: 89-117.
- Perrin C. (2009).** *Implication et régulation de la production des curli dans la résistance au nickel au sein de biofilms d'Escherichia coli K-12*. Thèse de doctorat en Sciences agricoles, Université Claude Bernard - Lyon I, France. 24p.
- Picard C. (2011).** *Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane*. Thèse de doctorat en Génie des procédés, Université de Toulouse III, France. 22p.
- Popa M.D., Manko-Bük A.B. (2019).** Travaux pratiques - partie spéciale médecine générale, section française. Université de Médecine et de pharmacie "victorbabeş" timișoara, Roumanie. 36p.



- 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.



- Raffi M., Mehrwan S., Bhatti T.H., Akhter J.I., Hameed A., Yawar W., Ul Hasan M. (2010).** Investigations into the antibacterial behavior of copper nanoparticles against *Escherichia coli*. *Annals of Microbiology*. 60:75-80.
- Reyes-Jara A, Cordero N., Aguirre J., Troncoso M., Figueroa G. (2016).** Antibacterial Effect of Copper on Microorganisms Isolated from Bovine Mastitis. *Frontiers in Microbiology*. 7(626): 7.
- Richard D. (2019).** *Microévolution et adaptation à une pression de sélection anthropique chez Xanthomonas citripv. citri, une bactérie pathogène des agrumes : dynamique du compartiment plasmidique*. Thèse de doctorat en Sciences agricoles, Université de la Réunion, France. 50p.

- Rivas L., Dykes G.A., Fegan N. (2007).** A comparative study of biofilm formation by Shiga toxigenic *Escherichia coli* using epifluorescence microscopy on stainless steel and a microtitre plate method. *Microbiological Methods*. 69: 44-51.
- 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. *Journal of the American Society for Virology*. 9(1): 522-554.
- Royet K. (2018).** *La réponse au stress chez les bactéries : réponse au stress métallique chez Pseudomonas putida et au stress rencontré en cours d'infection de plante chez le phytopathogène Dickeyadadantii*. Thèse de doctorat en Microbiologie moléculaire, Université Claude Bernard Lyon 1, France. 52p.
- Ruparelia J.P., Chatterjee A.K., Duttagupta S.P., Mukherji S. (2008).** Strain specificity in antimicrobial activity of silver and copper nanoparticles. *Acta Biomatereriala*. 4(3): 707-716.



- Salome G.R. (2018).** *Acoustic confinement of Escherichia coli: the impact on biofilm formation*. Thèse de doctorat en Physique, Université de Sorbonne, France.
- Salvan C. (2016).** *Alliage de Cuivre à durcissement structural mis en œuvre par Fusion Laser sur Lit de Poudre : Lien entre microstructure et propriétés mécaniques, thermiques et électriques*. Thèse de doctorat en Matériaux, Mécanique, Génie civil, Electrochimie, Université Grenoble Alpes, France. 8p.
- Santini O. (2012).** *Effects of copper on calcium metabolism and detoxification mechanisms in freshwater bivalve species of Anodonta*. Thèse de doctorat en Ecotoxicologie, Université de Lorraine, France. p: 35- 20.
- 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 Ingénieries Microbienne et Enzymatique, Université de Toulouse, France. p: 27-37.
- Seghir A., Boucherit-Otmani Z., Sari-Belkharroubi L., Boucherit K. (2017).** Risque infectieux lié à la formation des biofilms multi-espèces (Candida – bactéries) sur cathéters vasculaires périphériques. *Journal de Mycologie Médicale*. 27(1): 20–27.
- 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.
- 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 Pharmacie, Université de Bamako, Mali. 10p.
- Staerk K., Khandige S., Kolmos H.J., Moller-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.

- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M.A. (2000).** Modified microtiter-plate for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of Microbiol Methods*. 40(2): 175-9.
- Sunil K., Niharika C., Leena S., Muhammad Z., Ajit V. (2019).** Biofilms in Human Diseases: Treatment and Control. *Springer*. 150p.



- Teitzel G.M., Parsek M.R. (2003).** Heavy Metal Resistance of Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69(4): 2313-2320.
- Toe E. (2018).** *Évaluation des facteurs de risques 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.
- Touiri H. (2020).** *Les infections alimentaires à shigelles*. Thèse de doctorat en Médecine, Université de Mohammed V-Rabat, Maroc. 102p.
- 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 comparative medicine*. 78(2): 110-116.
- Tursi S.A., Tükel Ç. (2018).** Curli-Containing Enteric Biofilms Inside and Out: Matrix Composition, Immune Recognition, and Disease Implications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 82(4).



- Vanzielegem T., Delmée M. (2018).** Les biofilms en milieu hospitalier : quels sont les enjeux pour l'hygiène hospitalière. *Journal of Infection Control (nosoinfo)*. 25(8).
- Verma R., Das A., Sarmah D., Narzary P.R., Sharma S., Kaman P.K., Boro R.C., Goswami S., Linggi B., Baruah J.P. (2021).** Anti-quorum sensing agents as a potential replacement for antibiotics in Phytobacteriology. *The Pharma Innovation Journal*. 10(11): 121-125.
- Virieux-Petit M., Hammer-Dedet F., Aujoulat F., Jumas-Bilak E., Romano-Bertrand S. (2022).** From Copper Tolerance to Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* towards Patho-Adaptation and Hospital Success. *Genes*. 13(2).
- 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*. *Front Microbiol*. 317 (5).

W

- Wang J., Wenjian M., Wang X. (2021).** Insights into the structure of *Escherichia coli* outer membrane as the target for engineering microbial cell factories. *Microbial Cell Factories*. 20(73): 1-17.
- Warnes S.L., Summersgill E.N., William K.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.
- Warnes S.L., Caves V., Keevil C.W. (2012).** Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria. *Environmental Microbiology*. 14: 1730-1743.
- Whitchurch C.B., Tolker-Nielsen T., Ragas P.C., Mattick J.S., (2002).** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science (New York, N.Y.)*. 295(5559): 1487.

Y

- Yan X., Yang J., Wang Q., Lin, S. (2021).** Transcriptomic analysis reveals resistance mechanisms of *Klebsiella michiganensis* to copper toxicity under acidic conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 211.
- 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, Côte d'Ivoire. 14p.

Z

- Zykwinska A., Marquis M., Sinquin C., Cuenot S., Collic-Jouault S. (2016).** Assembly of HE800 exopolysaccharide produced by a deep-sea hydrothermal bacterium into microgels for protein delivery applications. *Carbohydrate polymer*. 142: 213-221.

Annexe

1. Composition du milieu de culture et colorant (Source: www.aatbio.com; 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 15min 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"> -Comporte 20 tests -Destinée aux entérobactéries et à autre bacilles à Gram négatif. 	<ul style="list-style-type: none"> -Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide; - Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation ; - Faire une suspension bactérienne : cultures jeune dans un tube contenant 5 ml d'eau distillée stérile 	<ul style="list-style-type: none"> -Remplir les tubes et les cupules des tests : CIT, VP, GEL avec la suspension bactérienne ; - Remplir uniquement les tubes des autres tests ; - Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H₂S en remplissant leur cupule d'huile de paraffine ; 	<ul style="list-style-type: none"> - Lecture directe ou après addition de réactifs : se référer au tableau de lecture spécifique à l'API; - Les tests sont regroupés en groupe de 3, et une valeur (1, 2ou4) est indiquée pour chacun. - Additionner à l'intérieur de chaque groupe les nombres correspondants aux tests positifs. Un nombre à 7chiffres est obtenu, il sert de code d' identification. 	<p>L'identification est obtenue à l'aide d'un logiciel d'identification <i>apiweb</i>TM.</p> <p>Enter</p> <p>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	
ONPG	Ortho-nitro-phényle-B-D-Galactopyranoside	Beta-galactosidase	Negative incolore	Positive jaune
ADH	L-Arginine	Arginine dihydrolase	Jaune	Rouge-Orangé
LDC	L-Lysine	Lysine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
ODC	L-Orthine	Ornithine décarboxylase	Jaune	Rouge-Orangé
 CITI 	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA	
			Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Kovacs	
			Incolore	Rose
 VPI 	Pyruvate d esodium	Production d'acétoine	VP1+VP2	
			Incolore	Rose/rouge
 GEL 	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas dediffusionde pigmentnoir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D-Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GL Utube)	Potassium nitrate	Production de NO2	NIT1+NIT2,2-3min	
			Jaune	Rouge
		Réduction au N2	Zn / 5min	
OF-O	Glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
OF-F	Glucose	Fermentation du Glucose sous l'huile	vert	jaune