

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

Capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez *Klebsiella oxytoca*

Présenté par :

- BEBOUR Hiba
- GASMI Hanadi
- GHOUILA Tahani

Devant le jury :

Dr. BARA M.

Dr. AMRI S.

Dr. BENHALIMA L.

Président

Examinatrice

Promotrice

Université de Guelma

Université de Guelma

Université de Guelma

Année universitaire 2020/2021

Remerciements

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

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

*Nos sincères remerciements vont à **Mr. BARA M.**, 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.*

*Nos sincères remerciements et nos respects vont à notre enseignante et promotrice **Dr. BENHALIMA L.**, pour nous avoir faits l'honneur d'accepter de diriger ce travail. Vous avez toujours réservé un bon accueil pour nous, malgré vos obligations professionnelles. Votre modestie, vos qualités scientifiques et pédagogiques, vos compétences et votre sens du devoir méritent toute admiration.*

Nos remerciements vont également à tous les professeurs et les enseignants qui nous ont toujours encouragé et soutenu durant notre cycle d'étude.

Enfin, nous exprimons nos vives et profondes reconnaissances à tous ceux qui de près ou de loin se sont associés pour l'élaboration de ce modeste travail.

Résumé en Français	
Résumé en Anglais	
Résumé en Arabe	
Liste des figures et des tableaux	
Introduction	01

Partie I: Synthèse bibliographique

I. Cuivre	03
I.1. Définition	03
I.2. Caractéristiques et utilisation généralisée des surfaces de cuivre	03
I.3. Mécanisme antibactérien des surfaces de cuivre	04
II. Biofilm bactérien	06
II.1. Définition d'un biofilm	06
II.2. Mécanisme de formation d'un biofilm bactérien	06
II.2.1. Conditionnement de la surface et adhésion des bactéries	07
II.2.2. Formation des micro-colonies	07
II.2.3. Maturation de biofilm	07
II.2.4. Dispersion de biofilm	08
II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm	08
II.4. <i>Klebsiella oxytoca</i> et formation de biofilm	08
II.4.1. Classification et caractère généraux de l'espèce <i>Klebsiella oxytoca</i>	08
II.4.2. Formation de biofilm par <i>Klebsiella oxytoca</i>	10
II.5. Stratégies anti-biofilm	10
III. Biorésistance bactérienne au cuivre	11

Partie II : Étude expérimentale

I. Matériel biologique	13
I.1. Choix et origine de la souche bactérienne	13

I.2. Vérification de la pureté de la souche bactérienne	13
I.2.1. Revivification de la souche bactérienne	14
I.2.2. Isolement et caractérisation phénotypique de la souche bactérienne	14
II. Étude de la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez <i>klebsiella oxytoca</i>	14
II.1. Préparation des coupons du cuivre	14
II.2. Effet du cuivre et capacité de formation de biofilm chez <i>klebsiella oxytoca</i>	15
II.3. Analyse statistique	17

Partie III : Résultats et Discussion

I. Vérification de la pureté de la souche bactérienne	18
II. Capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez <i>Klebsiella oxytoca</i> .	19
III. Effet du cuivre sur la souche <i>klebsiella oxytoca</i> .	22
Conclusion et perspectives	26
Références bibliographiques	27
Annexe	36

Résumé

Le pouvoir de formation de biofilm sur des coupons en cuivre a été testé pour la souche bactérienne *klebsiella oxytoca* isolée à partir d'un milieu hospitalier de la région de Guelma. La biomasse libérée du cuivre a été déterminée au cours du temps par culture sur milieu gélosé. Deux températures (ambiante et 37°C) ont été testées comme stress physique. Les résultats obtenus montrent que *klebsiella oxytoca* a la capacité de former un biofilm sur des coupons en cuivre principalement après des durées de contact plus longues (24 à 72 H). L'application du test T de Student montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre les températures d'incubation ($p > 0,05$). L'effet du cuivre est bactériostatique à bactéricide vis-à-vis de la souche à étudier après des courtes durées de contact avec une réduction supérieure à 2 Log_{10} par rapport au temps 0 ($2,04 \pm 0,04 \text{ Log}_{10}$ et $3,02 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$ à la température ambiante et à 37°C, respectivement). En revanche, la bactérie répond par une adaptation qui augmente avec le temps ce qui permet de la classer dans la catégorie résistante. La formation de biomasses résistantes de *klebsiella oxytoca* sur les coupons de cuivre constitue un problème préoccupant et la limite de l'utilisation de ces surfaces antibactériennes doit être discutée.

Mots-clés : *Klebsiella oxytoca*, biofilm, surface de cuivre, effet antibactérien, résistance au cuivre.

The biofilm-forming capacity of copper coupons was tested for the bacterial strain *Klebsiella oxytoca* isolated from a hospital environment in the Guelma region. The biomass released from copper was determined over time by culture on agar medium. Two temperatures (ambient temperature and 37°C) were tested as physical stress. The results obtained show that *Klebsiella oxytoca* has the ability to form a biofilm on copper coupons mainly after longer contact times (24 to 72 H). The application of Student's T-test shows that there are not significant differences between incubation temperatures ($p > 0.05$). The effect of copper is bactericidal to bacteriostatic towards the study strain after short contact times with a reduction greater than 2 Log_{10} compared to time 0 ($2.04 \pm 0.04 \text{ Log}_{10}$ and $3.02 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$ at ambient temperature and 37°C, respectively). In contrast, the bacteria responds with an adaptation that increases with time allowing it to be classified as resistant. The formation of resistant biomasses of *Klebsiella oxytoca* on copper coupons is a problem of concern and the limit of the use of these antibacterial surfaces should be discussed.

Keywords: *Klebsiella oxytoca*, biofilm, copper surface, antibacterial effect, copper resistance.

تم اختبار قدرة السلالة البكتيرية *Klebsiella Oxytoca* المعزولة من بيئة مستشفى يقع في منطقة قالمة على تشكيل الأغشية الحيوية فوق أسطح قطع نحاسية. حددت الكتلة الحيوية المتكونة فوق قطع النحاس مع مرور الوقت عن طريق زرع البكتيريا في وسط عيش صلب. اختبرت كذلك درجتى حرارة مختلفتين (درجة حرارة المحيط و درجة حرارة 37 درجة مئوية) كمؤثر فيزيائي . بينت لنا النتائج المحصل عليها ان السلالة البكتيرية *Klebsiella oxytoca* قادرة علي تشكيل الأغشية الحيوية على قطع النحاس خاصة بعد مدة زمنية طويلة من التلامس (24 إلى 72 سا). بين التطبيق Test T de Student أنه لا يوجد فرق ملحوظ بين درجات حرارة الحضان (p>0.05). إن تأثير النحاس على السلالة المدروسة تثبيطي عكوس إلى غير عكوس بعد مدد زمنية قصيرة من التلامس مع انخفاض اكبر من 2 Log_{10} مقارنة بالزمن 0 ($0,04 \pm 2,04 \text{ Log}_{10}$ $3,02 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$ في درجة حرارة المحيط ودرجة حرارة 37 درجة مئوية علي التوالي). بالمقابل تستجيب البكتيريا بالتكيف مع مرور الوقت مما يسمح بتصنيفها كمقاومة. إن تشكل كتل من الأغشية الحيوية مقاومة للسلالة *Klebsiella Oxytoca* على قطع النحاس يعد مصدر قلق و ينبغي مناقشة الحد من استخدام هذه الأسطح المضادة للبكتيريا.

الكلمات المفتاحية: *Klebsiella Oxytoca*، أغشية حيوية ، سطح نحاسي، تأثير مضاد للبكتيريا، مقاومة النحاس.

Figure	Titre	Page
Figure 1	Mécanisme de cuivre sur une bactérie (Solioz, 2011).	5
Figure 2	Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm (Lebeaux et Ghigo, 2012).	6
Figure 3	Étude de la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez <i>klebsiella oxytoca</i> .	16
Figure 4	(a) Aspect macroscopique, (b) enzymes respiratoires et (c) profil biochimique de <i>Klebsiella oxytoca</i> .	18
Figure 5	Effet du cuivre sur la souche <i>Klebsiella oxytoca</i> à une température ambiante.	22
Figure 6	Effet du cuivre sur la souche <i>Klebsiella oxytoca</i> à la température 37°C.	23

Tableau	Titre	Page
Tableau 1	Certaines caractéristiques de la souche à étudier.	13
Tableau 2	Identification de la souche bactérienne à étudier.	18
Tableau 3	Capacité de <i>klebsiella oxytoca</i> à former un biofilm sur des surfaces en cuivre à une température ambiante (20°-25°C).	19
Tableau 4	Capacité de <i>Klebsiella oxytoca</i> à former un bofilm sur des surfaces en cuivre à la température 37°C.	20
Tableau 5	Préparation et inoculation de la galerie miniaturisée API 20 E (Source: http://www.biomerieux.com).	37
Tableau 6	Tableau de lecture de la galerie miniaturisée API 20 E (Source: http://www.biomerieux.com).	38

Introduction

La contamination microbienne des surfaces présente un problème majeur de santé publique rencontré dans plusieurs secteurs (industries alimentaires, milieux hospitaliers, etc.). Cette contamination représente, de fait, un risque pour les personnes entrant en contact avec les surfaces colonisées en particulier en milieu hospitalier où celles-ci jouent le rôle de réservoirs et de vecteurs de pathogènes (**Masson, 2015**). Le risque est accru lorsque les bactéries adhérentes (pathogènes ou opportunistes) peuvent former des biofilms.

Les biofilms, structures comprenant des micro-organismes associés à des surfaces et enfermés par une matrice polymérique extracellulaire, protègent les micro-organismes des conditions environnementales défavorables. Conséquemment, ils sont généralement associés à plusieurs impacts négatifs pour les industries et la santé et aucune stratégie efficace pour leur contrôle et/ou leur éradication complète n'a été identifiée jusqu'à présent (**Gomes et al., 2020**). La capacité de former un biofilm est actuellement reconnue comme une caractéristique propre à plusieurs microorganismes. *Klebsiella oxytoca* est l'un des agents qui produisent des biofilms via plusieurs types des structures adhésives. Cette espèce est responsable d'infection nosocomiale, résistante et peut survivre sur des surfaces pendant des mois (**Ghasemian et al., 2019**).

L'émergence de ces pathogènes résistants et la prévalence des infections liées aux biofilms ont généré une demande de lutte contre leur recolonisation rapide sur les surfaces (**Gugala et al., 2017**). Parmi les solutions envisagées est l'intégration de certains métaux au niveau des surfaces d'intérêt, qui permettent ainsi, grâce à leur activité antimicrobienne naturelle, de détruire les microorganismes entrant en contact direct avec la surface. Cette capacité à inactiver les pathogènes a été testée sur plusieurs métaux, tel que l'argent, mais celui qui démontre les résultats les plus prometteurs est le cuivre (**Colin, 2019**).

Selon les résultats d'études récentes menées conjointement par *International Copper Association* (USA), la surface des alliages de cuivre assure une protection contre des souches très virulentes de bactéries antibiorésistantes associées aux infections hospitalières et communautaires. En effet, avec de bonnes mesures d'hygiène, les surfaces de contact en cuivre devraient faire diminuer le taux d'infection, sauver des vies et réduire considérablement les coûts de différents secteurs (**Pineda et al., 2017**).

Ces dernières années, certaines bactéries ont su répondre au cours du temps à la toxicité de cuivre en devenant tolérantes ou résistantes à ce métal. Elles ont élaboré plusieurs mécanismes qui leur permettent de persister et /ou de croître ; ces mécanismes étant dans plusieurs cas véhiculent des gènes codant pour la résistance à d'autres agents antibactériens (**Chen et al., 2019**).

Dans ce contexte, nous nous sommes interrogés sur la capacité de *Klebsiella oxytoca*, isolée d'un milieu hospitalier, à se multiplier sur des coupons en cuivre, ainsi que son aptitude à former un biofilm dans le temps.

Deux objectifs majeurs sont fixés :

- Evaluation de la capacité de l'espèce étudiée à former des biofilms sur des surfaces en cuivre ;
- Détermination de l'effet antibactérien du cuivre vis-à-vis de l'espèce à étudier.

En effet nous rapportons dans cette étude trois parties :

- La première est attribuée à une synthèse bibliographique comportant une généralité sur le cuivre, le mécanisme antibactérien des surfaces en cuivre, le biofilm bactérien et la biorésistance au cuivre ;
- La deuxième relate le travail expérimental, en présentant les méthodes utilisées ;
- La troisième représente les résultats obtenus et leur discussion et nous terminerons cette étude par une conclusion et les perspectives proposées.

Partie I :
Synthèse
bibliographique

I. Cuivre

I.1. Définition

Le cuivre est un élément trace métallique de symbole Cu et de numéro atomique 29. Il est présent naturellement dans la croûte terrestre ; c'est un métal rougeâtre qui donne sur les surfaces fraîches une teinte rosée à pêche. C'est un excellent conducteur de la chaleur et de l'électricité après l'argent (**Debab, 2018**).

Il est présent dans la nature sous forme de minerais de cuivre natif, de minerais oxydés ou sulfurés. En métallurgie, il entre dans de nombreux alliages comme le laiton (cuivre et zinc), le bronze (cuivre et étain), le maillechort (cuivre, nickel et zinc) ; c'est un métal indispensable dans un grand nombre d'applications domestiques et industrielles (**Rodier et al., 1996 ; Romeo, 1991**).

In vivo, le cuivre est substantiel à la vie, et il a un rôle important dans la fonction physiologique comme la synthèse de l'hémoglobine, le développement des tissus, ainsi que nombreuses fonctions biochimiques (**Marcato, 2007**).

I.2. Caractéristiques et utilisation généralisée des surfaces de cuivre

Le cuivre est un métal qui constitue historiquement l'un des matériaux les plus utilisés dans différents secteurs. Il est utilisé principalement dans la fabrication des canalisations (défini par la norme NF EN 1057) comme il entre dans la composition de plusieurs alliages.

C'est un métal très résistant, il n'est pas attaqué par les autres matériaux classiques (matériaux d'encastrement) même en présence d'humidité (**Cavellier, 2012**).

Le cuivre représente naturellement une grande résistance à la corrosion, au feu et il ne se dégrade pas avec le temps, il garde son aspect et ses propriétés. Cette grande longévité du cuivre combinée à son abondance et à sa grande recyclabilité en font un matériau très intéressant sur le plan économique (**Verginie, 2008**).

Les surfaces de cuivre sont utilisées non seulement en métallurgie mais aussi dans le domaine médical. Tout a commencé en 2008 lorsque le métal et ses alliages ont été homologués comme agents antibactériens par l'Agence américaine de protection de l'environnement (**Depner et al., 2016**).

En effet, la toxicité du cuivre pour les microorganismes a été démontrée par **Joachim et al. (2009)**, qui a constaté qu'une concentration de 25 µg/L a conduit à une diminution en abondance de plusieurs taxons.

Actuellement, les surfaces de cuivre offrent une nouvelle approche dans la réduction des contaminations bactériennes. Avec leurs propriétés auto-désinfectantes, elles pourraient être considérées comme une contribution importante à la lutte contre les infections. Ainsi, l'utilisation de surface en cuivre métallique antimicrobien est susceptible de fournir une protection contre les microorganismes infectieux en réduisant la contamination de surface, comme cela a été démontré dans des essais cliniques réussis (**Gregor et al., 2010**).

I.3. Mécanisme antibactérien des surfaces de cuivre

L'homme a exploité les propriétés naturellement antibactériennes du cuivre depuis les tous premiers âges. Il a été clairement démontré par de nombreuses études scientifiques menées depuis des décennies que le cuivre est capable d'éradiquer les bactéries les plus résistantes, les moisissures et les virus (**O'Gorman et Humphreys, 2012**).

Actuellement, le retour au cuivre est très remarquable, plusieurs études montrent que les surfaces métalliques en cuivre possèdent un mécanisme antibactérien très efficace (**Colin, 2019 ; Gomes et al., 2020**).

Dans des études cliniques, le cuivre conçu pour une utilisation sur des surfaces tactiles, telles que des poignées de porte, des accessoires de salle de bain ou des barrières de lit, lors de tentatives pour réduire les infections hospitalières. Il a été démontré que le nombre de bactéries a été réduit considérablement, indiquant que les surfaces en cuivre peuvent être un outil supplémentaire prometteur à côté de d'autres mesures d'hygiène pour réduire le nombre et la gravité des infections nosocomiales (**Gregor et al., 2010**).

La destruction des bactéries sur les surfaces en cuivre ne résulte pas d'un simple mécanisme mais d'une multitude de facteurs (Fig. 1):

➤ Stress oxydatif

Le cuivre a comme capacité de donner ou de recevoir des électrons. Grâce à cela, il peut se changer en différents états d'oxydation entre Cu^+ et Cu^{2+} . Ceci permet au cuivre d'agir en catalyseur dans la production d'espèces réactives de l'oxygène comme les radicaux libres (**Weaver, 2010**).

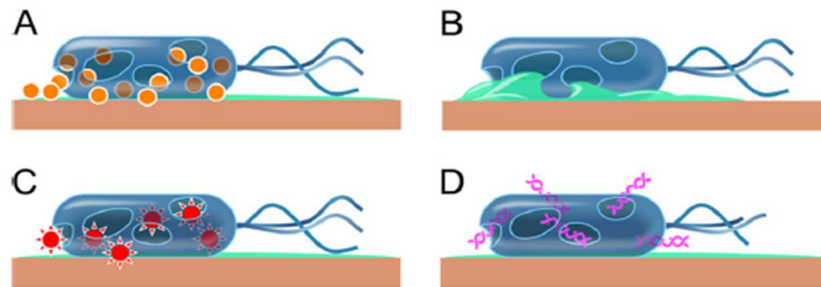


Figure 1: Mécanisme du cuivre sur une bactérie (Solioz, 2011).

(A) : Des ions cuivre se dissolvent de la surface de cuivre et causent des dommages cellulaires. (B) : La membrane cellulaire éclate sous l'effet des ions cuivre et du phénomène de stress oxydatif, ce qui mène à la perte du potentiel de membrane et du contenu cytoplasmique. (C) : Les ions cuivre provoquent la production d'espèces réactives de l'oxygène, celles-ci causent encore d'avantage de dommages cellulaires. (D) : L'ADN génomique et plasmidique commencent à se dégrader.

➤ Dépolarisation des membranes cytoplasmiques

Les ions cuivre peuvent rentrer en concurrence avec les ions zinc ou autres ions sur d'importants sites de liaison aux protéines, ceci menant à des changements conformationnels et à la perte des fonctions des protéines, il peut ainsi inactiver les enzymes cytoplasmiques servant à la fabrication de chaînes ramifiées d'acides-aminés surtout du glutamate et de potassium, ce qui suggère des lésions sélectives sur la membrane plasmique (**Esperito santo et al., 2011**).

➤ Désintégration de l'ADN

Ce mécanisme de destruction cellulaire après exposition au cuivre n'était pas connu qu'après les travaux de **Noyce et al., (2007)** qui ont démontré que les ions cuivre ont la capacité de changer l'arrangement de l'ADN en s'y attachant et en changeant sa conformation. Une autre expérience a permis de mettre en évidence une coupure ou une

désintégration de l'ADN après un temps de contact de 0 à 30 secondes avec le cuivre (Warnes et keevil, 2011).

II. Biofilm bactérien

II.1. Définition d'un biofilm

Le biofilm est généralement défini comme des communautés de cellules microbiennes associées à une surface enfermées dans une matrice extracellulaire, cette dernière est formée de biopolymères, généralement polysaccharidique et protéiques, permettant de piéger les nutriments nécessaires à la survie des micro-organismes surtout en milieu oligotrophe (Virginie, 2008).

Les biofilms bactériens sont ubiquitaires du fait qu'ils concernent le monde animal, végétal, humain et environnemental. Ils présentent souvent une architecture complexe, très variable d'un biofilm à l'autre selon les bactéries qui le composent et les conditions environnementales (Teneur en oxygène, nutriments, pH...) (Roux et Ghigo, 2006).

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

Les mécanismes employés par les différentes espèces bactériennes pour la formation des biofilms se déroulent en quatre principales étapes (Fig. 2) (Boudarale, 2018).

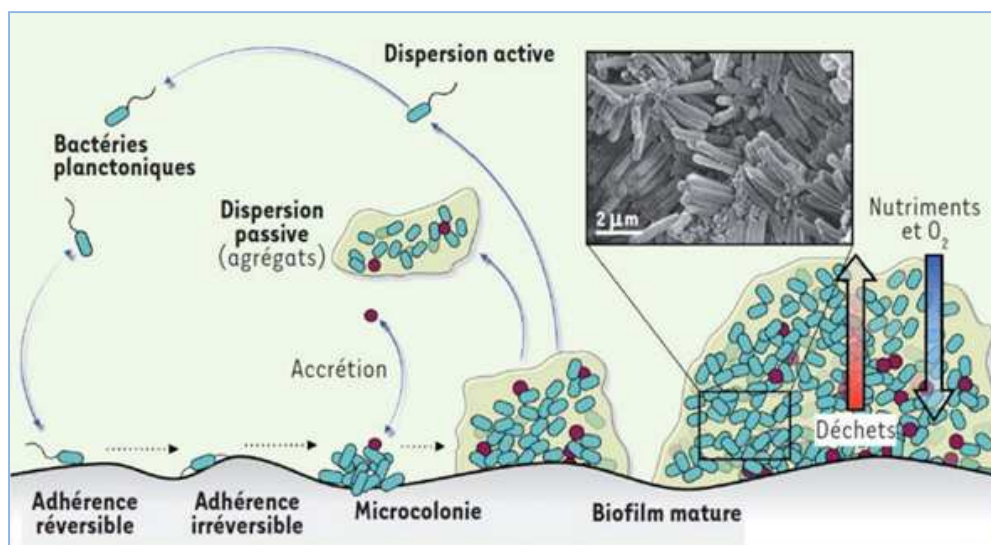


Figure 2 : Représentation des différentes étapes de la formation d'un biofilm (Lebeaux et Ghigo, 2012).

II.2.1. Conditionnement de la surface et adhésion des bactéries

Les surfaces constituent généralement le siège d'une adsorption spontanée de composés du milieu (molécules organiques et ions) ce qui conduit au conditionnement d'un micro-environnement favorable à l'adhésion stable des bactéries qui y trouvent disponibles des nutriments avec lesquels elles peuvent engager des interactions spécifiques **(Aye, 2015)**.

Deux phases d'adhésion correspondent à une fixation spécifique et active des bactéries sur une surface **(Muller et Guaguere, 2014)** :

- Une adhésion réversible qui est le résultat de l'interaction entre un substrat solide et les bactéries pendant un certain temps et les cellules peuvent se détacher ;
- Une adhésion irréversible qui intervient dans un deuxième temps grâce à l'exopolymères sécrétés par les bactéries permettant de consolider leur fixation au support. Dans ce cas des interactions fortes s'établissent entre la surface et la bactérie avec des liaisons hydrophobe.

II.2.2. Formation des micro-colonies

Lorsque l'attachement irréversible est établi, l'agglutination, la croissance et la multiplication des cellules vont pouvoir former des micro-colonies qui vont recouvrir une partie ou toute la surface conditionnée. Selon la composition en bactéries, les conditions chimiques et hydrodynamique, ces micro-colonies seront suivies par l'élaboration d'un biofilm plus au moins complexe **(Aye, 2015)**.

II.2.3. Maturation de biofilm

Le biofilm a une croissance exponentielle se traduisant par une augmentation importante de son épaisseur jusqu'à la formation d'un film hétérogène tridimensionnel. La distance entre deux cellules diminue lorsque le nombre de cellules microbiennes augmente. Cela provoque la sécrétion d'exopolymères qui contribuent à la forte adhésion des cellules les unes aux autres d'un côté et de l'ensemble à la surface d'un autre côté à partir des relations physiologiques. Une fois que le biofilm atteint une certaine épaisseur, les conditions à sa base deviennent anaérobies. Cela indique que le biofilm est proche d'un état de maturité, avec une grande diversité **(Alnasouri, 2010)**.

II.2.4. Dispersion de biofilm

Lorsque l'épaisseur maximale du biofilm est atteinte, le stade final de développement du biofilm peut avoir lieu en réponse à des perturbations externes. Il s'agit du stade de détachement. Cette étape implique la dispersion des cellules individuelles de la matrice de biofilm et le détachement d'une partie des bactéries par érosion en favorisant la colonisation de nouvelles surfaces et par conséquent la formation de nouveaux biofilms (Lattab, 2018).

II.3. Facteurs favorisant la formation de biofilm

De nombreux facteurs influencent la formation d'un biofilm (Virginie, 2008 ; Grasteau, 2011) :

- Les caractéristiques de la surface rappelant que les surfaces rugueuse son colonisées de façon préférentielle à cause de l'augmentation de la surface de fixation et la diminution des forces répulsives. Les paramètres physico-chimiques de la surface peuvent modifier aussi la présence de polymère (L'hydrophobicité d'une surface joue un rôle important dans l'adhésion des micro-organismes) ;
- La nature et la concentration des éléments nutritifs (carbone inorganique, fer, matière organique, phosphate...);
- La densité des bactéries et des espèces bactériennes introduites ;
- L'avantage et la compétition donnée à certaines espèces ;
- La capacité des bactéries à synthétiser les éléments favorisant l'adhésion (exemple : stimulation de synthèse de fimbriae de type 1 par les bactéries quand il y a une déficience d'acides aminés ou carbone).

II.4. *Klebsiella oxytoca* et formation de biofilm

II.4.1. Classification et caractère généraux de l'espèce *Klebsiella oxytoca*

Klebsiella oxytoca (*K. oxytoca*) est une bactérie Gram négative en forme de bâtonnet, non mobile, dotée d'une capsule polysaccharidique proéminente, qui fournit une résistance contre les mécanismes de défense de l'hôte. Elle appartient au :

- Règne : Procaryotes ;
- Phylum : *Protobacteria* ;
- Classe : *Gammaproteobacteria* ;
- Ordre : *Enterobacteriales* ;
- Famille : *Enterobacteriaceae* ;
- Genre : *Klebsiella* ;
- Espèce : *oxytoca* .

Le principal réservoir des bactéries du genre *Klebsiella* est les êtres humains notamment les nourrissons infectés (en général asymptomatiques) colonisés par des souches envahissantes, les patients hospitalisés (à cause d'infections nosocomiales) et certaines plantes (**Fritz et al., 2008**).

La culture de *klebsiella* s'effectue sur les milieux sélectifs des entérobactéries (Drigalski, Hektoen, Mac Conkey...); l'espèce *K. oxytoca* forme souvent des colonies muqueuses avec un diamètre de 3 à 4 mm en 18-24 h à 37 °C (**Prescott et al., 2003 ; Carip et al., 2015**).

Comme les entérobactéries, *K. oxytoca* a un métabolisme respiratoire aérobie-anaérobie facultatif, catalase (+), oxydase (-), fermente le glucose avec production de gaz, possède une nitrate-réductase, une uréase et une lysine décarboxylase, elle produit l'acétoïne, l'indole et fermente de très nombreux sucres (**Larpen, 1997**).

Les *Klebsiella* sont normalement associées aux infections communautaires et hospitalières, en particulier chez les patients immunodéprimés. Les patients subissant des procédures neurochirurgicales, cathéters intravasculaires, des coloscopies, des transfusions de plaquettes, des infections des voies urinaires et colite préexistante d'origine virale ou induite par des antibiotiques sont plus enclins à l'infection par *K. oxytoca* (**Burgess et al., 2003**).

Actuellement, *K. oxytoca* est connue par sa résistance aux antibiotiques, elle a développé des enzymes β -lactamases à spectre étendu (BLSE) et des carbapénémases. Par conséquent, elle est généralement résistante à certains antibiotiques comme le céfotaxime, le ceftazidime et l'aztréonam (**Trivedi et al., 2015**).

II.4.2. Formation de biofilm par *Klebsiella oxytoca*

La capacité de *Klebsiella oxytoca* à former des biofilms est un puissant outil de survie qui peut perturber ou maintenir la santé de nombreux écosystèmes.

Selon les études antérieures, les *Klebsiella* produisent des biofilms via plusieurs types d'adhésifs retrouvés à la fois chez *Klebsiella pneumoniae* et *K. oxytoca*, principalement sous forme de capsule, de fimbriae type 1 et de type 3 (encodées par les gènes *mrkA* et *mrkD* qui représentent les principales sous-unités de rattachement) (**Ghasemian et al., 2019**).

Nombreux autres facteurs de virulence décrits chez les *Klebsiella* sont connus pour être impliqués à des degrés divers dans la formation de biofilms. Parmi ces facteurs : la présence des polysaccharides capsulaires, l'intervention du système *Quorum Sensing* à travers une synthèse d'autoinducteurs (AL-2) ainsi que l'antigène 43, le PGA (Poly- β -1,6-N-acétylglucosamine), la cellulose ou l'acide colanique qui ont un rôle dans la maturation du biofilm (**Goller, 2006**).

II.5. Stratégies anti-biofilm

Plusieurs moyens et stratégies contre la formation de biofilm ont été développés :

- L'hygiène reste le moyen classique qui permet d'éviter la contamination microbienne et donc l'adhésion et la formation ultérieure de biofilm (**Lebeaux et al., 2014**) ;
- Des peintures anti-adhérentes, sans biocide, généralement à bases de silicone ou de fluoropolymère sont utilisées afin de limiter l'effet des forces d'adhésion des microorganismes aux surfaces (**Klien, 2011**) ;
- Ces dernières années et vu la capacité des micro-organismes d'adhérer aux différentes surfaces, des options de lutte alternatives sont utilisés telles que les composés naturels (N-heptylsulfanylacétyl-l-homosérinelactone extrait d'ail (**Bodet et al., 2008**), les nouveaux produits chimiques (Tween 20 et Triton X-100) (**Chen et Stewart, 2000**) et les métaux inorganiques comme le cuivre et les alliages de cuivre (le laiton, le cupronickel, le cuivre-nickel-zinc et le bronze) (**Warnes et al., 2015**).
- Récemment, des stratégies basées sur l'utilisation des enzymes bactériennes comme la dispersine B (capable de dégrader le polymère de N-acétyl-glucosamine de la

matrice du biofilm) et des bactériophages ont également montré une capacité de lutter contre la formation des biofilms (**Donlan, 2002**).

III. Biorésistance bactérienne au cuivre

Les bactéries ont une régulation fine pour le maintien (homéostasie) et le contrôle des concentrations intracellulaires de cuivre. Cette régulation évite l'expulsion du métal présent aux concentrations homéostatiques, ou l'entrée en quantité toxique (**Nies, 1999**).

Les ions cuivreux entrent dans la cellule par un système actif lent d'import qui possède une forte affinité pour son substrat et utilise l'hydrolyse de l'ATP comme source d'énergie. Sa production est induite en fonction du gradient chimio-osmotique et des besoins de la cellule (**Kühlbrandt, 2004**).

À forte concentration, le cuivre devient toxique. Pour faire face à cette toxicité, les bactéries ont développé des mécanismes de résistance.

La résistance aux métaux et la survie sont le résultat d'une coopération entre les mécanismes de résistance et le métabolisme métallique cellulaire normal. Il existe une grande diversité de mécanismes de résistance aux ions métalliques, liée à leur valence, taille, indice de solubilité, potentiel redox et la forme sur laquelle l'élément se trouve (**Monchy, 2007**).

Plusieurs mécanismes de résistance au cuivre chez les bactéries sont apparus (**Espirito Santo et al., 2011 ; O'Gorman et Humphreys, 2012**):

- **Exclusion par perméabilité de la membrane** : les bactéries forment naturellement un « revêtement » de polysaccharides extracellulaires, absorbant les ions métalliques et les empêchant d'interagir avec les composés cellulaires vitaux ;
- **Efflux actif** : il s'agit du mécanisme de résistance le plus utilisé. Les bactéries utilisent les mécanismes de transport actif pour exporter les métaux toxiques depuis leur cytoplasme jusqu'au milieu extracellulaire. Chez les bactéries à Gram négatif, l'ion Cu^{2+} est exporté par un mécanisme impliquant 4 protéines séquestrant le cuivre dans le périplasme ;
- **Séquestration intracellulaire** : Principalement par la production de protéines chélatantes comme les métallothionéines qui sont des protéines intracellulaires riches en cystéine, elles ont été identifiées comme capable de séquestrer des

cations de Cu, Zn et de Cd. Il permet la séquestration des métaux au sein du cytoplasme afin d'éviter l'exposition des composants cellulaires essentiels aux métaux ;

- **Détoxification enzymatique** : Elle fait appel à des gènes impliqués dans la réduction des composés métalliques ;
- **Réduction de la sensibilité des cibles cellulaires des métaux** : cette protection se déroule par mutation, diminuant ainsi la sensibilité sans altérer les fonctions de base de la cellule ;
- **Production de sidérophores** : en liant le métal dans le milieu extracellulaire, le sidérophore diminue la concentration en métaux libres, affectant sa diffusion dans la bactérie et ainsi sa toxicité.

Les pressions sélectives exercées par les environnements chargés de métaux ont entraîné le développement de systèmes de résistance pour la plupart des métaux. Ces systèmes sont surtout de type plasmidique, très spécifiques et sont présents virtuellement chez tous les groupes bactériens. Les modifications dans la paroi cellulaire, la membrane, ou l'enveloppe d'un microorganisme sont des exemples d'exclusion du métal par la barrière de la perméabilité membranaire. Ce mécanisme est une tentative effectuée par l'organisme pour protéger les composants cellulaires essentiels sensibles aux métaux, un exemple frappant est l'exclusion de Cu^{2+} résultant de l'altération de la production de la protéine porine au niveau du canal membranaire chez *E. coli* (**Rouch et al., 1995**).

Donc, le potentiel émergent de lignées de bactéries sauvages résistantes aux surfaces en cuivre pourrait apparaître, ce qui rendrait peu probable le taux rapide de destruction cellulaire par contact et la dégradation complète de l'ADN (**O'Gorman et Humphreys, 2012**).

Partie II :
Étude
expérimentale

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 de la souche bactérienne

La souche bactérienne choisie pour la présente étude est l'espèce *Klebsiella oxytoca*. Cette souche a été isolée à partir d'un milieu hospitalier de la région de Guelma.

Le choix de cette bactérie 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 les études antérieures de Dr. BENHALIMA (Tableau 1).

Tableau 1 : Certaines caractéristiques de la souche à étudier
(Résultats de Dr. BENHALIMA qui ne sont pas encore exploités)

Souche bactérienne	Origine	État de la souche	Résistance aux antibiotiques	Résistance aux métaux	Capacité de formation d'un biofilm
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Poignée de la porte d'une chambre des patients	Conservée sur la gélose nutritive	Bactérie Multi-résistante (BMR)	Résiste au cuivre et au cadmium	Formatrice de biofilm

I.2. Vérification de la pureté de la souche bactérienne

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 de la souche bactérienne étudiée, nous avons suivi les étapes suivantes :

I.2.1. Revivification de la souche bactérienne

À partir de la bactérie 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 de la souche bactérienne

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 (**Chabot et al., 1993**).

La souche bactérienne a subit une caractérisation phénotypique à savoir la caractérisation morphologique selon les méthodes classiques de microbiologie décrites par **Guiraud (2003)** et la caractérisation biochimique par utilisation du système miniaturisé API 20 E (Annexe).

II. Étude de la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez *Klebsiella oxytoca*

II. 1. Préparation des coupons du cuivre

Les surfaces en cuivre se caractérisent par leur résistance à la corrosion et ses propriétés antibactériennes (**Elguindi, 2011**).

La composition chimique des surfaces en cuivre utilisées dans la présente étude est la suivante (**Humphreys, 2014**):

- Cuivre : >99,90 % ;
- Phosphore : 0,015 à 0,04 %

Des coupons en cuivre de 1×1cm sont préparés afin d'étudier la capacité de notre souche bactérienne à former un biofilm. Parallèlement, des coupons en Polyvinylchloride (PVC) de 1×1cm sont utilisés comme un contrôle positif .

Avant chaque expérience, les coupons du cuivre subissent un nettoyage et une stérilisation comme suite (**Noyce et al., 2006**):

- Mélanger les coupons du cuivre avec un volume d'acétone et laisser les pendant 30 secondes ;
- Tremper les coupons dans l'éthanol absolu ;
- Stériliser les coupons à la flamme du bec Bunsen ;
- Conserver les coupons dans des boites de Pétri.

II.2. Effet du cuivre et capacité de formation de biofilm chez *Klebsiella oxytoca*

Le protocole de l'étude du pouvoir de formation de biofilm sur les surfaces en cuivre ainsi que l'effet antibactérien de ce dernier est illustré par la figure 3.

Technique

- Préparer une culture jeune dans le milieu TSB ;
- Placer les coupons de cuivre dans des boites de Pétri avec 5ml TSB ;
- Prendre 50 µl de la bactérie sur chaque coupon ;
- Incuber à la température ambiante (20-25°C) et à 37°C ;
- Dénombrer la culture durant le temps : 0, 30, 90 min, 24, 48 et 72 heures.

Durant le temps nécessaire :

- Immerger aseptiquement le coupon dans 10 ml du Tampon phosphate saline (PBS) afin de neutraliser l'effet du cuivre ;
- Mélanger pendant 60 secondes ;
- Prendre 0,1 ml de ce bouillon et faire une dilution décimale (jusqu'à 10^{-4}) dans PBS ;
- Prendre 50 µl de chaque dilution et l'ensemencer sur TSB agar ;
- Incuber à 37°C pendant 18 h à 24 heures ;
- Dénombrer les colonies et exprimer les résultats en UFC/cm² puis transformer en Log₁₀ UFC/cm² (**Noyce et al., 2006**).

Les mêmes étapes sont appliquées avec les coupons de PVC.

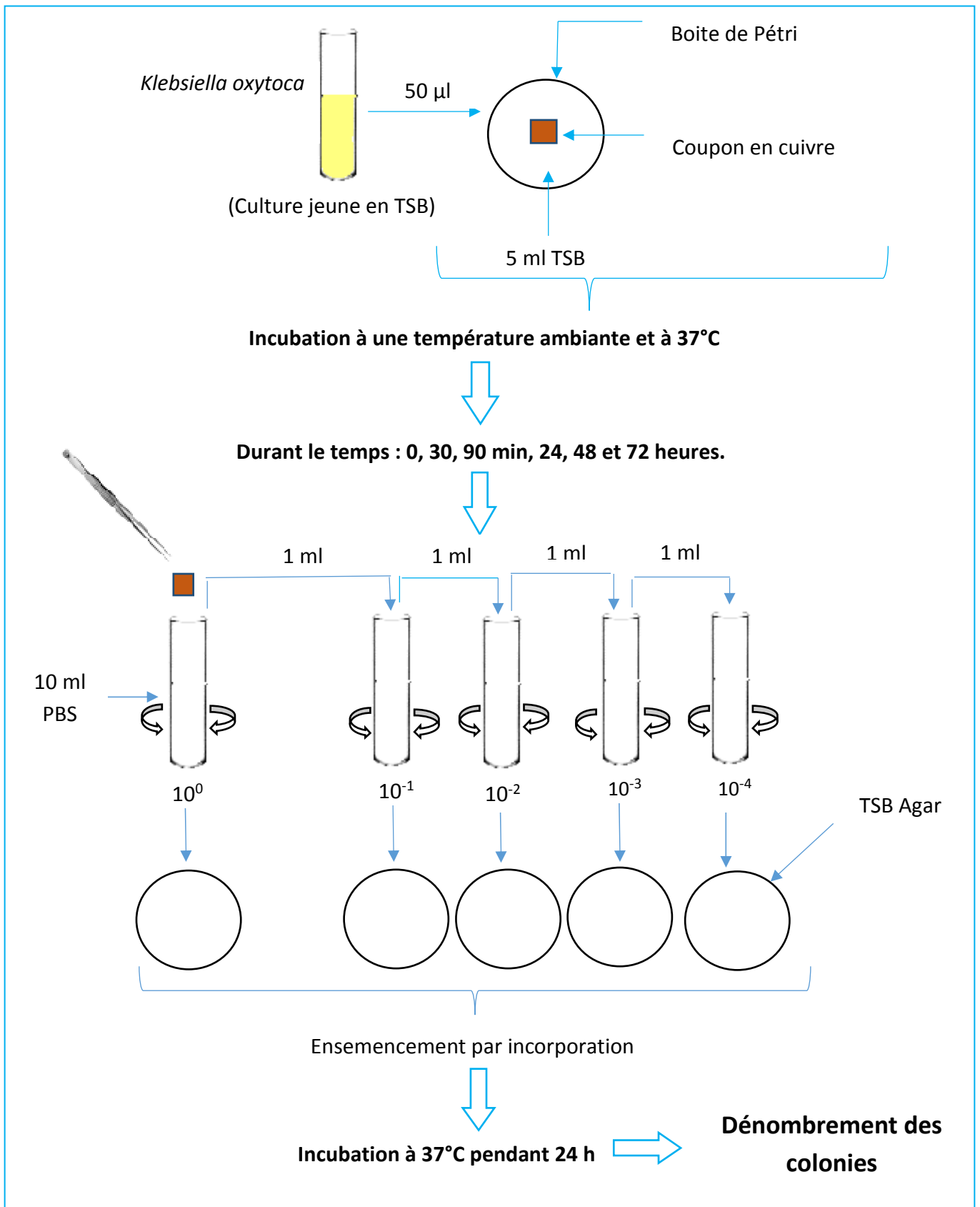


Figure 3 : Étude de la capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez *Klebsiella oxytoca*.

Lecture

- **Détermination de la capacité de formation d'un biofilm**

Les souches bactériennes compte tenu de leur pouvoir adhérent, sont classées en deux catégories (**Hola et Ruzicka, 2011**) :

- UFC/cm² Cuivre < UFC/cm² Témoin (T) : Bactérie non formatrice du biofilm ;
- UFC/cm² Cuivre ≥ UFC/cm² T : Bactérie formatrice du biofilm.

- **Détermination de l'effet du cuivre**

- Si le résultat est ≥2 à 3 Log₁₀ par rapport au Temps 0 = activité bactériostatique ;
- Si le résultat est ≥ 3 Log₁₀ par rapport au Temps 0 = activité bactéricide.

Remarque

- Toutes les manipulations sont répétées en duplicate ;
- La composition des milieux de cultures est représentée en annexe ;
- La formule de dénombrement des colonies sur milieu solide est la suivante :

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1n_2)} \times \frac{1}{d}$$

ΣC : Somme totale de colonies comptées sur les boites retenues ;

V = Volume de dilution ;

1/d = Plus fort facteur de dilution comptable ;

n1 : Nombre de boites à la plus faible dilution comptable ;

n2 : Nombre de boites à la plus forte dilution comptable (**Larpen, 1997**).

II.3. Analyse statistique

Afin de visualiser et de comparer l'effet de la température sur le pouvoir adhérent des bactéries, les résultats sont soumis au test T de Student, les différences ont été considérées significatives à une probabilité $p \leq 0,05$. L'étude statistique a été réalisée par le logiciel statistique SPSS 25,0.

Partie III :

Résultats et

discussion

I. Vérification de la pureté de la souche bactérienne

La caractérisation phénotypique de la souche bactérienne à étudier a confirmé la pureté de notre isolat (Tableau 2).

Tableau 2: Identification de la souche bactérienne à étudier.

Bactérie	Aspect microscopique	Enzymes respiratoires	Type de l'API	Code de l'API	Degré de similitude (%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Bacilles à Gram (-)	Cat (+) OX (-) NR (+)	API 20E	7274773	100 %

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

Les résultats de l'isolement et des différents tests d'identification de la souche *K. oxytoca* sont illustrés par la figure 4.

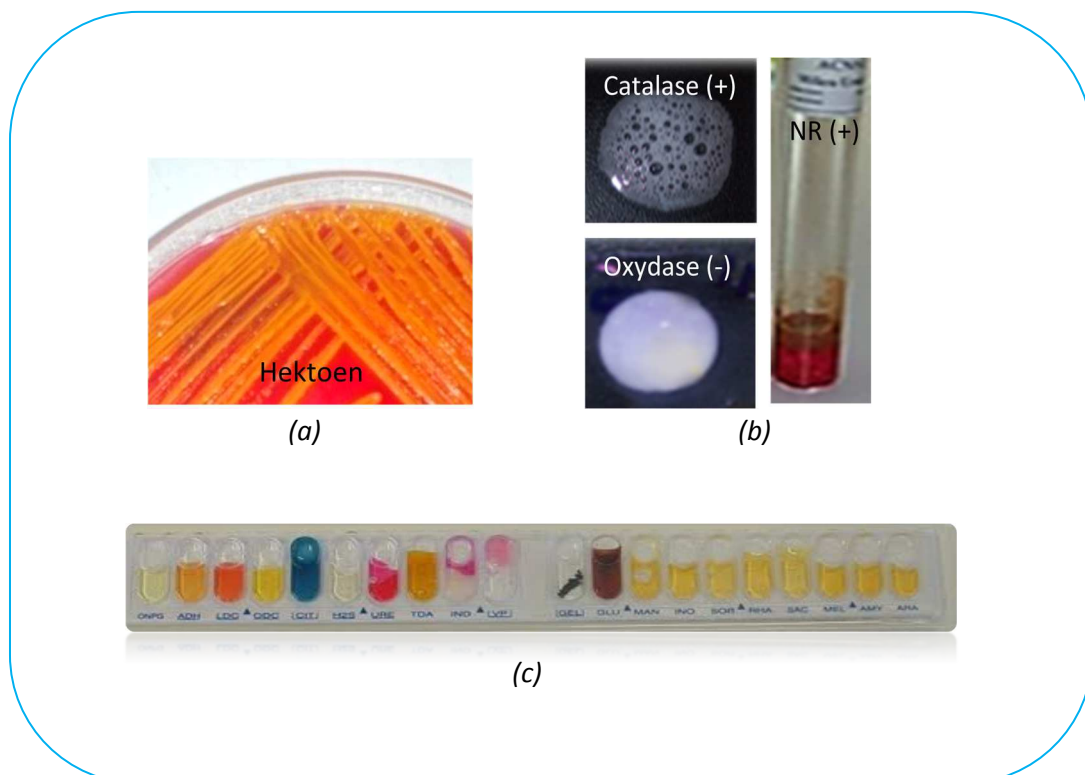


Figure 4: (a) Aspect macroscopique, (b) enzymes respiratoires et (c) profil biochimique de *Klebsiella oxytoca*.

II. Capacité de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez *Klebsiella oxytoca*

Le pouvoir adhérent de *K. oxytoca* aux surfaces en cuivre a été déterminé en modifiant la température pour mieux comprendre l'influence de ce paramètre impératif.

À une température approximative de 22 à 25°C, sur des coupons en cuivre, il a été observé que notre souche *K. oxytoca* est capable de former des jeunes biofilms après 24 et 72 H de contact. Par ailleurs, pendant les premiers temps sur le cuivre (30 et 90 min) et après 48 H, le pouvoir adhérent de *K. oxytoca* était faible et la bactérie est considérée comme incapable de former un biofilm (Tableau 3).

Tableau 3: Capacité de *Klebsiella oxytoca* à former un biofilm sur des surfaces en cuivre à une température ambiante (22°C-25°C).

	PVC Moy ± EC (UFC/cm²)	Cuivre Moy ± EC (UFC/cm²)	Catégorisation de la Formation de biofilm
0 min	$1,65 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$	$1,65 \times 10^7 \pm 0,25 \times 10^7$	Bactérie Formatrice
30 min	$1 \times 10^6 \pm 0,71 \times 10^6$	$2,34 \times 10^5 \pm 1,55 \times 10^5$	Bactérie Non formatrice
90 min	$6,7 \times 10^5 \pm 0,4 \times 10^5$	$1,34 \times 10^5 \pm 0,9 \times 10^5$	Bactérie Non formatrice
24 H	$0,8 \times 10^6 \pm 0,53 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6 \pm 00,00$	Bactérie Formatrice
48 H	$0,9 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5 \pm 2,8 \times 10^5$	Bactérie Non formatrice
72 H	$4,9 \times 10^5 \pm 0,2 \times 10^5$	$6,4 \times 10^5 \pm 00,00$	Bactérie Formatrice

Moy : moyenne ; EC : Ecartype

De même à 37°C sur le cuivre, *K. oxytoca* montre toujours une inaptitude à la formation de biofilm et présente une charge bactérienne moindre que le contrôle après 30 et 90 min de contact. Après des durées de contact avec le cuivre plus longues (24, 48 et 72 H), les résultats montrent que la souche *K. oxytoca* est capable de former un biofilm (Tableau 4).

Tableau 4: Capacité de *Klebsiella oxytoca* à former un biofilm sur des surfaces en cuivre à la température 37°C.

	PVC Moy ± EC (UFC/cm²)	Cuivre Moy ± EC (UFC/cm²)	Catégorisation de la Formation de biofilm
0 min	1,65×10 ⁷ ± 0,25×10 ⁷	3×10 ⁷ ± 1,9×10 ⁷	Bactérie Formatrice
30 min	2,1×10 ⁵ ± 00,00	1,52×10 ⁴ ± 1,1×10 ⁴	Bactérie Non Formatrice
90 min	5,5×10 ⁵ ± 0,05×10 ⁵	5,85×10 ⁴ ± 0,6×10 ⁴	Bactérie Non Formatrice
24 H	8,95×10 ⁴ ± 0,15×10 ⁴	2,71×10 ⁵ ± 1,8×10 ⁵	Bactérie Formatrice
48 H	1,25×10 ⁵ ± 0,05×10 ⁵	1,34×10 ⁵ ± 1,07×10 ⁵	Bactérie Formatrice
72 H	9,8×10 ⁴ ± 0,05×10 ⁴	3,8×10 ⁵ ± 1,1×10 ⁵	Bactérie Formatrice

Moy : moyenne ; EC : Ecartype

Les surfaces jouent un rôle important dans la dissémination d'agents pathogènes. Plus longtemps un microorganisme pathogène à capacité « nosocomial » persiste sur une surface, plus longtemps il sera source de transmission d'infection. Aujourd'hui l'utilisation des surfaces en matériau inerte, ne provoquant pas d'augmentation de dissémination de germes infectieux, est devenue très important (**Masson, 2015**). L'utilisation des surfaces en cuivre semble avoir un effet beaucoup plus important sur la survie des bactéries et la formation des biofilms (**Warnes et al., 2016**).

La production excessive de biomasses fixées sur les surfaces peut porter atteinte à la santé publique, en particulier en milieu hospitalier et essentiellement vis-à-vis des populations fragilisées. Généralement, la majorité des matériaux est potentiellement générateurs d'un développement bactérien et d'une formation de biofilm du fait de leur composition et des adjuvants nécessaires à leur stabilisation, l'âge et l'état de la surface mais aussi le relargage de composés biodégradables (**Squinazi, 2004**).

Dans la présente étude, nous avons constaté que la souche *K. oxytoca*, isolée à partir d'une poignée de porte d'une chambre de patients, a la capacité de former un biofilm sur des coupons en cuivre surtout après des durées de contact plus longues. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que *K. oxytoca* a d'une part la capacité à résister au cuivre ce qui est confirmé par l'étude de **Brahimi et Mellaoui (2017)** qui ont trouvé que cette espèce est la plus résistante au cuivre parmi les entérobactéries provenant du même établissement

hospitalier de notre étude. D'autre part, *K. oxytoca* a plusieurs propriétés qui l'aident à former des biofilms même sur des surfaces antibactériennes comme le cuivre. **Ghasemian et al. (2019)** confirment que 35 isolats de *K. oxytoca* producteurs de biofilms possèdent les gènes *pilQ*, *matB*, *fimA* et *mrkA* qui jouent un rôle significatif dans le pouvoir adhérent. Ils ont noté aussi que les fimbriae de type 1 et 3 et les adhésines permettent à cette bactérie de coloniser et de produire un biofilm et en outre de résister aux agents antibactériens (**Ghasemian et al., 2018**).

Le temps de contact joue également un rôle important dans la formation de biofilm. Plusieurs études ont signalé que plus que la bactérie est résistante plus que la formation de biofilm augmente principalement avec l'augmentation de la durée de contact (**Shatila et al., 2021**).

En revanche, l'incapacité de notre souche à former un biofilm dans les premiers temps ainsi qu'après 48 H de contact sur le cuivre à la température ambiante pourrait s'expliquer par le fait que la formation d'un biofilm peut présenter des variations en raison de l'interaction entre différents facteurs environnementaux tels que l'abondance des nutriments, le pH et la température. **Agarwal et al. (2011)** ont montré que les biofilms de différentes souches d'un même genre peuvent se comporter différemment même s'ils sont incubés dans les mêmes conditions, de telles observations ont été attribuées à des variations de sérovars, à l'origine des souches ou à des mutations dans les gènes qui contrôlent les biofilms. D'autres études montrent l'apparition de l'action bactériostatique du cuivre avec une capacité à réduire la formation de biofilm (**Virginie, 2008**).

L'application du test T de Student montre qu'il n'existe pas de différences significatives entre les températures d'incubation ($p > 0,05$) et donc ces dernières n'ont pas un effet direct sur la capacité de formation de biofilm sur le cuivre chez *K. oxytoca*. Ces résultats sont similaires à ceux de **Masson (2015)** qui a testé la capacité de survie des souches bactériennes (parmi les quelles des *Klebsiella*) sur le cuivre à 99 % à une température ambiante et à une température de 4°C où il a confirmé que la température n'a pas affecté les souches de *klebsiella*. D'après **Boutaleb (2007)**, une température supérieure à 15°C

favorise le développement des biomasses microbiennes tandis qu'une température inférieure à 10°C ralentit les réactions chimiques et donc la formation des biofilms.

Par contre, d'autres études ont rapporté que la formation de biofilms était plus faible à 37 °C par rapport à ceux formés à des températures plus basses. Cette observation a été attribuée à l'épuisement rapide des nutriments, l'absence de biosynthèse du curli et à la diminution de la viscosité des exopolysaccharides à des températures d'incubation plus élevées (Shatila *et al.*, 2021). Aussi, les expérimentations de Mathlouthil *et al.* (2018) ont révélé que la température avait un effet significatif sur la formation de biofilm chez une entérobactérie. En particulier, la formation du biofilm était prononcée à 25°C et à peine détectable à 37°C.

III. Effet du cuivre sur la souche *Klebsiella oxytoca*

À une température ambiante, notre étude montre qu'après 30 à 90 minutes sur le cuivre, le nombre de *K. oxytoca* a été réduit par une valeur supérieur à 2 Log₁₀ par rapport au temps 0 (2,04 ± 0,04 Log₁₀), ce qui confirme l'effet bactériostatique du cuivre vis-à-vis de la bactérie étudiée. Durant la période allant de 24 à 72 H de contact sur une surface de cuivre, le nombre de *K. oxytoca* a connu des fluctuations mais ces dernières représentent une différence moyenne par rapport au temps 0 de 1,37 ± 0,2 Log₁₀, ce qui classe la souche à étudier dans la catégorie « résistante » (Fig. 5).

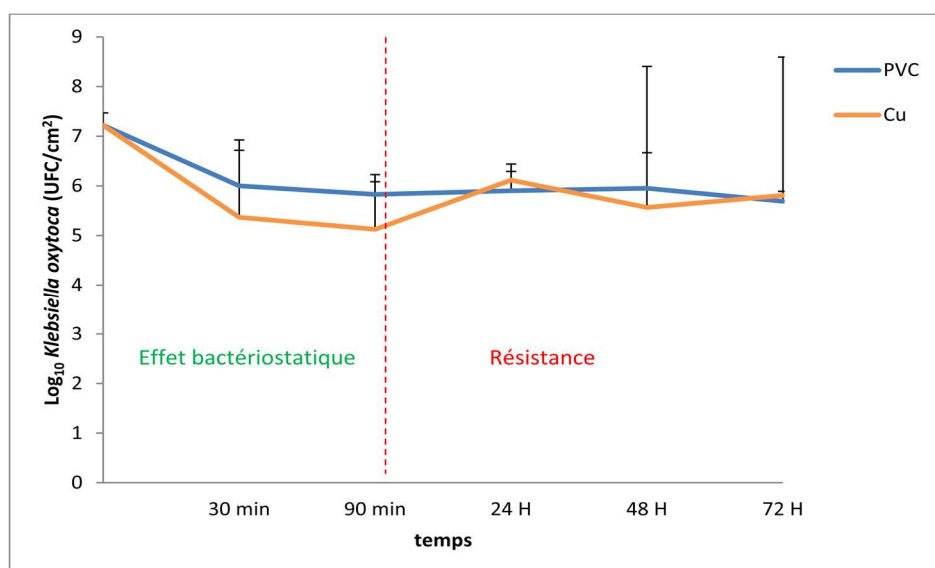


Figure 5: Effet du cuivre sur la souche *Klebsiella oxytoca* à une température ambiante.

À une température de 37°C, l'espèce *K. oxytoca* a montré une plus forte réduction de survie ($3,02 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$) sur le cuivre après 30 minutes de contact. Alors qu'après 90 min, une croissance continue a été observée, et en comparant le résultat obtenu durant cette période (24 H – 72 H) avec le temps 0 (réduction de $1,81 \pm 0,1 \text{ Log}_{10}$), nous constatons que notre souche est résistante au cuivre (Fig. 6).

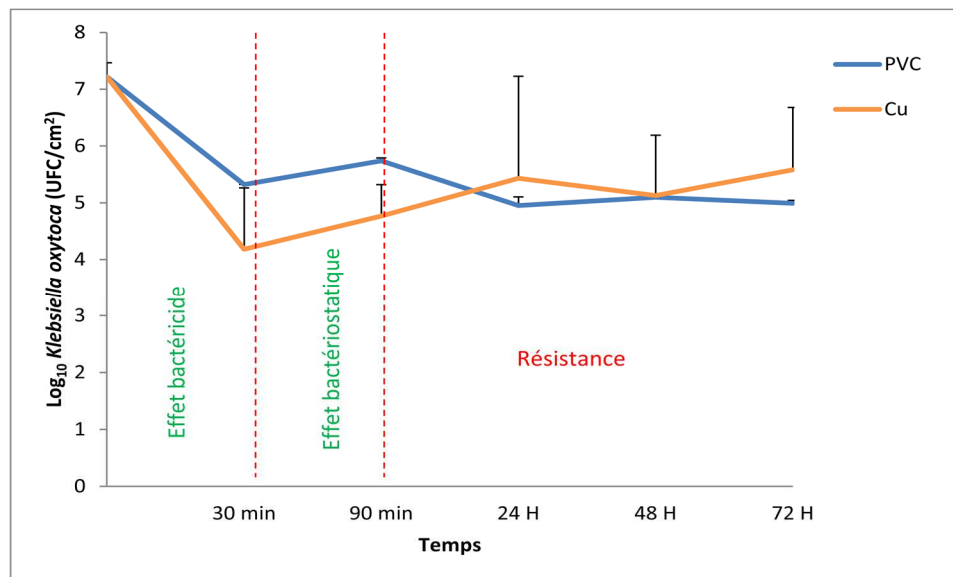


Figure 6: Effet du cuivre sur la souche *Klebsiella oxytoca* à la température 37°C.

Dans les établissements de santé, certains pathogènes sont robustes et peuvent survivre pendant des mois sur les surfaces environnementales, ceci n'augmente pas seulement la transmission perpétuelle de microorganismes causant des infections, mais aussi l'augmentation du potentiel de transmissions d'informations génétiques entre les microorganismes, ce qui inclut évidemment la propagation de résistance aux antibiotiques (Warnes et Keevil, 2011).

La présente étude montre que les coupons de cuivre ont un fort pouvoir sur *K. oxytoca* après seulement des courtes durées de contact (30 à 90 min). En revanche, la bactérie répond par une adaptation qui augmente avec le temps.

Selon les travaux de Benhalima *et al.* (2019), le cuivre a des propriétés bactériostatiques ou bactéricides sur des bactéries à Gram négatif d'origine clinique.

L'observation de ces effets vis-à-vis de *K. oxytoca* dès les premiers contacts montre une action temporaire et toxique du cuivre. **Souli et al. (2013)** confirment également que le cuivre a démontré une activité antibactérienne contre des isolats de *Klebsiella*. Cet effet était bactéricide après 5 H d'incubation sur Cu à 99%.

L'effet antibactérien rapide du cuivre s'explique par le fait que la majeure partie des ions cuivriques ont comme cible la membrane cellulaire, ce qui peut éclaircir que l'arrêt de respiration apparaît rapidement puis qu'elle est dépendante du gradient de protons de cette membrane cytoplasmique (**Bleichert et al., 2014**).

Plusieurs études ont expliqué aussi le pouvoir antibactérien d'une surface de cuivre par le stress oxydatif généré par les ions de cuivre et la désintégration de l'ADN qui jouent un rôle très important dans la mort cellulaire (**Warnes et keevil, 2011**)

La plupart des études montrent que, pour la majorité des espèces bactériennes y compris les entérobactéries, quelques minutes à quelques heures sont suffisantes pour éliminer complètement jusqu'à 10^9 bactéries sur un coupon en cuivre pur (Cu > 99,9%) (**Wilks et al., 2005**). L'étude de **Mehtar et al. (2008)** a montré que, sur une surface cuivrée, l'élimination complète d'une charge comprise entre 10^7 et 10^8 bactéries par cm^2 est effectuée en seulement 60 minutes pour *Klebsiella*.

La résistance de notre isolat *K. oxytoca* remarquée après 24 à 72 H sur le cuivre, confirme que cette souche a développé des mécanismes d'adaptation à la surface de cuivre. D'après **Zulfiquar et Shakoori. (2012)**, les bactéries à Gram négatif exposées à une forte concentration de cuivre, expriment des déterminants *cus* qui jouent un rôle important dans le pompage de ce métal. Ces déterminants comprennent deux opérons, l'un régulateur (*cusRS*) et l'autre structurel (*cusCFBA*). Chez *Klebsiella*, ce système d'efflux a été exprimé plusieurs fois sous l'action du cuivre à la fois dans des conditions aérobies et anaérobies.

L'inexistence de différences significatives entre les températures d'incubation (T de Student ; $p > 0,05$), confirme que ces dernières n'ont pas un effet sur l'activité antibactérienne du cuivre vis-à-vis de *K. oxytoca*.

Certaines études ont cherché à identifier l'effet de la température et de l'humidité sur l'efficacité du cuivre. Selon **Warnes et Keevil (2011)**, la viabilité des bactéries sur des surfaces à caractère antimicrobien pourrait durer plusieurs mois dans un milieu humide à

22°C. Par ailleurs, **Michels *et al.* (2009)** révèlent, pour une température de 35°C, que l'effet antibactérien du cuivre est plus important à > 90% d'humidité (réduction de la charge bactérienne de $6,4 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$) qu'à 20% d'humidité (réduction de $5,5 \pm 00,00 \text{ Log}_{10}$).

Cette étude a pu clairement démontrer que la souche *K. oxytoca* isolée d'un environnement hospitalier est considérée comme résistante et capable à former des biofilms sur le cuivre. Donc, une limite de l'utilisation du cuivre peut être discutée, il s'agit du risque de diminution de son activité antibactérienne en raison de résistances et la capacité de formation des biomasses. Seul le temps nous montrera si le cuivre conserve son pouvoir antibactérien ou si l'adaptation des microorganismes le rendra obsolète.

Conclusion et Perspectives

Les résultats de l'étude du pouvoir de formation de biofilm sur des surfaces en cuivre chez la souche *Klebsielle oxytoca* isolée d'un milieu hospitalier permettent de tirer les conclusions suivantes :

- La température n'a pas un effet direct sur la capacité de formation de biofilm sur le cuivre chez *K. oxytoca* ;
- À une température ambiante et à 37°C, *K. oxytoca* est capable de former des biofilms principalement après des longues durées de contact avec le cuivre ;
- Le temps de contact joue un rôle important dans la formation de biofilm ;
- Le cuivre a un effet bactériostatique à bactéricide vis-à-vis de *K. oxytoca* après des courtes durées de contact ;
- *K. oxytoca* est résistante au cuivre même après des durées importantes de contact avec ce métal.

En perspectives, il serait intéressant de :

- Étudier la formation de biofilm sur d'autres matériaux afin de tirer les avantages et/ou les inconvénients de l'utilisation des surfaces en cuivre ;
- Installer des équipements en cuivre dans les hôpitaux (surfaces et objets) et de surveiller la prévalence des infections nosocomiales afin de prouver l'efficacité de ce métal ;
- Déterminer les supports génétiques de la résistance de *K. oxytoca* au cuivre ;
- Étudier l'effet de d'autres températures ainsi que d'autres facteurs (pH, humidité...) sur la capacité de formation de biofilm chez *K. oxytoca* ;
- Déterminer les mécanismes d'adhésion et mieux comprendre les cinétiques de constitution de biofilms, afin d'améliorer les stratégies anti-biofilms.

Références Bibliographiques

A

Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N., Singh V.P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*. 18(4). p:1493.

Alnnasouri M. (2010). Étude du développement de biofilms dans des réacteurs de traitement d'eau. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés et des Produits, Université de Lorraine, France. p: 15.

Aye A.M. (2015). Mise en évidence du système de communication Quorum Sensing impliquant les AHLs chez des bactéries marines isolées de la Méditerranée. Thèse de Doctorat en Microbiologie/Biochimie, Université de Toulon, France. p: 11.

B

Benhalima L., Amri S., Bensouilah M., Ouzrout R. (2019). Antibacterial effect of copper sulfate against multi-drug resistant nosocomial pathogens isolated from clinical samples. *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 35(5). p: 1328.

Bleichert P., Espérito Santo C., Hanczaruk M., Meyer H., Grass G. (2014). Inactivation of bacterial and viral biothreat agents on metallic copper surfaces. *New York, New York: Springer*.

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.

Boudarel H. (2018). Caractérisation *in situ* du développement d'un biofilm par suivi de microbilles à l'aide d'une méthode de corrélation d'images numériques. Thèse de Doctorat en Matériaux, Clermont auvergne, France. p: 4.

Boutaleb N. (2007). Étude de la formation de biofilms sur les surfaces de matériaux couramment utilisés dans les canalisations d'eau potable. Thèse de Doctorat en Chimie, Université de Bretagne-sud, Bretagne. p: 50.

Brahimi H. et Mellaoui W., (2017). Étude de la résistance de certaines bactéries d'importance clinique aux agents antibactériens : antibiotiques et cuivre. Mémoire de Master, Université 8 Mai 1945 Guelma, Algérie. 74p.

Burgess D.S., Hall R.G., Lewis J.S., Jorgensen J.H., Patterson J.E. (2003). Clinical and microbiologic analysis of a hospital's extended-spectrum β -lactamase-producing isolates

over a 2-year period. *Pharmacotherapy. The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 23(10): 1232-1237

C

Carip C., Marie-Helene S., Armand T. (2015). Microbiologie ; et hygiène et droit alimentaire, Lavoisier Technique et Documentation, p: 80-81.

Cavalier M. (2012). Étude des effets de l'implantation ionique d'azote sur les propriétés du magnésium pur, du cuivre pur et des allages cuivreux. Thèse de Doctorat en Science des Matériaux, INSA de Rennes, France. p: 9.

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

Chen J., Li J., Zhang H., Shi W., Liu Y. (2019). Bacterial Heavy-Metal and antibiotic resistance genes in a copper Tailing Dam Area in Northern China. *Frontiers in Microbiology*. 10: 1916 .

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

D

Debab H. (2018). Synthèse et étude de comportement électrochimique de ligands bases de schiff et leurs complexes métalliques. Thèse de Doctorat en Chimie, Université Ferhat Abbas-Sétif1, Algérie. p: 10.

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

Depner R.F.R., Pontin K., Depner R.A., Neto F., Lucca V., Lovato M.I. (2016). Action of antimicrobial copper on bacteria and fungi isolated from commercial poultry hatcheries. *Brazilian Journal of Poultry Science*. p: 96.

E

- Elguindi J., Moffitt S., Hasman, H., Andrade C., Raghavan S., Rensing C. (2011).** Metallic copper corrosion rates, moisture content, and growth medium influence survival of copper ion-resistant bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 89(6), 1963-1970.
- Esperito Santo C., Wen Lam E., Elowsky C.G., Quaranta D., Domaille D.W., Chang C.J., Grass G. (2011).** Bacterial killing by dry metallic copper surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. p: 794-802.

F

- Fritz H.K., Böttger E.C., Deplazes P., Haller H., Roers A. (2008).** Manuel de poche de microbiologie médicale. Flammarion Médecine-Sciences. p: 238-309 .

G

- Ghasemian A., Mobarez A.M., Peerayeh S.N., Abadi A.T.B. (2018).** The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes and New Infections*. 27: 36–39
- Ghasemian A., Mobarez A.M., Peerayeh S.N., Abadi A.T.B., Khodaparast S., Mahmood S.S. (2019).** Expression of adhesin genes and biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates from patients with antibiotic-associated haemorrhagic colitis. *Journal of Medical Microbiology*. 68(7), 978-985.
- Goller C., Wang X., Itoh Y., Romeo T. (2006).** The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of Bacteriology*. 188: 8022-8032.
- Gomes I.B., Simões M., Simões L.C. (2020).** Copper Surfaces in Biofilm Control. *Nanomaterials*. 10(12), 2491.
- Guiraud J. (2003).** Microbiologie alimentaire. Dunod. p: 185-265.
- Gugala N., Lemire J.A., Turner R.J. (2017).** The efficacy of different anti-microbial metals at preventing the formation of, and eradicating bacterial biofilms of pathogenic indicator strains. *The Journal of Antibiotics*. 70(6), 775-780.

Grasteau A. (2011). Sélection de mutations affectant la formation de biofilm chez *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Thèse de Doctorat en Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, France. p: 33.

Gregor G., Rensing C., Solioz M. (2010). Metallic copper as an antimicrobial surface. *Applied and Environmental Microbiology*. p: 1341–1348.



Hola V., Ruzicka F. (2011). The formation of poly-microbial biofilms on urinary catheters. *Urinary Tract Infections in technology*. 153-72.

Humphreys H. (2014). Self-disinfecting and Microbiocide-impregnated surfaces and fabrics: What potential in interrupting the spread of healthcare-associated infection. *Clinical Infectious Diseases*, 58(6). p:851.



Joachim S., Morin A., Thybaud E. (2009). Effet du cuivre sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. *L'actualité chimique*. 334: 55-58.



Klein G. (2011). Nouvelles molécules naturelles inhibitrices du développement de biofilms de bactéries marines. Thèse de Doctorat en Biotechnologie et Chimie marine, Université de Bretagne Occidentale. p: 42.

Kühlbrandt W. (2004). Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5(4), 282-295.



Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire :Technique de laboratoire. Edition Technique et Documentation. p155.

Lattab A. (2018). Effet des composés naturels sur l'adhérence et la formation de biofilm à *pseudomonas aeruginosa*. Thèse de Doctorat en Science, Université d'Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem, Algérie. p: 24.

Lebeaux D. et Ghigo J.M. (2012). Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?. *Medecine Sciences*. 28(8-9): 727-739.

Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(3): 510.



Marcato C.E. (2007). Origine, devenir et impact de cuivre et du zinc du lisier porcins. Rôle de digestion anaérobie. Thèse de Doctorat en Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques et Bioingénieries, L'institut National Polytechnique de Toulouse, France. p: 15.

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. 106p.

Mehtar S., Wiid I., Todorov S.D. (2008). The antimicrobial activity of copper and copper alloys against nosocomial pathogens and Mycobacterium tuberculosis isolated from healthcare facilities in the Western Cape: an *in-vitro* study. *Journal of Hospital Infection*. 68(1): 45-51.

Mathlouthi A., Pennacchietti E., De B. D. (2018). Effect of temperature, pH and plasmids on *in vitro* biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*. 10(4). p:131.

Michels H.T., Noyce J.O., Keevil C.W. (2009). Effects of temperature and humidity on the efficacy of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* challenged antimicrobial materials containing silver and copper. *Letters in Applied Microbiology*. 49(2): 191-195.

Monchy S. (2007). Organisation et expression des gènes de résistance aux métaux lourds chez *Cupriavidus metallidurans* CH34. Thèse de Doctorat en Science, Université Libre de Bruxelles, Belgique. p:13-33.

Muller A. et Guaguere E. (2014). L'Antibiothérapie n'est pas la seule source d'antibiorésistance : notion de biofilm. Congrès National d'Association Française des Vétérinaires pour Animaux de Compagnie. 2p.



Nies D.H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 51(6): 730-750.

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

Noyce J.O., Michels H., Keevil C.W. (2007). Inactivation of influenza a virus on copper versus stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(8): 2748.



O'Gorman J. et Humphreys H. (2012). Application of copper to prevent and control infection. *Journal of Hospital Infection*. 81(4): 217-223.



Pineda I., Hubbard R., Rodríguez F. (2017). The role of copper surfaces in reducing the incidence of healthcare-associated infections: A systematic review and meta-analysis. *Canadian Journal of Infection Control*. 32 (1): 13-24.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C., Dusart J. (2003). Microbiologie. 2ème édition. Bruxelles: De Boeck. p: 834.



Rodier J., Bazin C., Broutin J., Chambon P., Champsaur H., Rodi L., Dunod. (1996). 8ème édition l'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. Paris. p: 383.

Romeo M. (1991). Toxicologie des métaux traces dans l'environnement marin. *Océanis*. 17(4): 383-402.

Rouch D.A., Lee B., Morby P. (1995). Understanding cellular responses to toxic agents: A model for mechanism choice in bacterial Metal Resistance. Rouch. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 14(2): 132-141.

Roux A. et Ghigo J.M., (2006). Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*. 159(3): 261-268.



Shatila F., Yaşa İ., Yalçın H.T. (2021). Biofilm Formation by *Salmonella enterica* Strains. *Current Microbiology*. 78(4): 1150-1158.

Soliz M. (2011). Copper kills bacteria: end of hospital-acquired infections. Valid on: <http://www.scienceonthenet.eu/content/article/>. Consulted the 29 avril 2021.

Souli M., Galani I., Plachouras D., Panagea T., Armaganidis A., Petrikos G., Giamarellou H. (2013). Antimicrobial activity of copper surfaces against carbapenemase-producing contemporary Gram-negative clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 68(4): 852-857.

Squinazi F. (2004). Biofilm et matériaux des canalisations des réseaux de distribution d'eau. Rapport Scientifique, BananaStock. 52 p.



Trivedi M.K., Patil S., Shettigar H., Bairwa K., Jana S. (2015). Phenotypic and biotypic characterization of *Klebsiella oxytoca*: An impact of biofield treatment. *Microbial and Biochemical Technology*. 7(4): 202-205.



Verginie L. (2008). Influence du cuivre sur les biomasses microbiennes dans les canalisations d'eau. Thèse de Doctorat en Pharmacie, Université Paris-Sud 11, France. 80p.



Warnes S.L et Keevil C.W. (2011). Mechanism of Copper Surface Toxicity in Vancomycin-Resistant *Enterococci* following Wet or Dry Surface Contact. *Applied and Environmental Microbiology*. 6049-6059.

Warnes S.L. et Keevil, C.W. (2016). Lack of involvement of fenton chemistry in death of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains of *Staphylococcus aureus* and destruction of their genomes on wet or dry copper alloy surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(7): 2132-2136.

Warnes S.L., Summersgill E.N., William Keevil C.W. (2015). Inactivation of murine norovirus on a range of copper alloy surfaces is accompanied by loss of capsid integrity. *Applied and Environmental Microbiology*. 8(3): 1085-1091.

Weaver L., Michels H.T., Keevil C.W. (2010). Potential for preventing spread of fungi in air-conditioning systems constructed using copper instead of aluminium. *Letters in Applied Microbiology*. 50(1): 18-23.

Wilks S.A., Michels H., Keevil C.W. (2005). The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology*. 105(3): 445-454.

Z

Zulfiqar S. et Shakoori A.R. (2012). Molecular characterization, metal uptake and copper induced transcriptional activation of efflux determinants in copper resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal de Gene*. 510(1): 32-38.

Annexe

1. Composition des milieux de culture (Source : www.aatbio.com ; www.dufortlavigne.com).

• **Phosphate buffered saline (g/ litre d'eau distillée)**

Chlorure de sodium (NaCl)	08
Pottassium phosphate monobasique (KH ₂ PO ₄)	0,24
Chlorure de potassium (KCl)	0,20
Hydrogénophosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	1,44

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

• **BouillonTryptone-Soja Agar (g/ litre d'eau distillée)**

Peptone	20
Chlorure de sodium	5,0
hydrogénophosphate de potassium	2,5
Glucose	2,5
Agar-agar	15

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

• **BouillonTryptone-Soja (g/ litre d'eau distillée)**

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

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

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

Tableau 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
 CIT 	TriSodium citrate	Utilisation de citrate	Vert	Bleu-vert/orange
H2S	Thiosulfate de sodium	Production de H2S	Incolore	Noir
URE	Urée	Uréase	Jaune	Rouge-Orangé
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	TDA	
			Jaune	Marron
IND	Tryptophane	Production d'indole	Kovacs	
			Incolore	Rose
IVPI	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	VP1+ VP2	
			Incolore	Rose/rouge
IGELI	Gélatine (origine bovine)	Gélatinase	Pas de diffusion de pigment noir	Diffusion de pigment noir
GLU	Glucose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune/jaune-gris
MAN	D-Mannitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
INO	Inositol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SOR	D-Sorbitol	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
RHA	L-Rhamnose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
SAC	D-Saccharose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
MEL	D- Melibiose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
AMY	Amygdaline	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
ARA	L-arabinose	Fermentation /oxydation	Bleu/bleu vert	Jaune
Réduction des nitrates (GLU tube)	Potassium nitrate	Production de NO2	NIT 1+NIT 2, 2-3 min	
			Jaune	Rouge
	Réduction au N2	Zn / 5 min		
			Orange-rouge	jaune
OF-O	Glucose	Oxydation du glucose	vert	jaune
OF-F	Glucose	Fermentation du glucose sous l'huile	vert	jaune