



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

***Proteus mirabilis* au niveau CHU Constantine
Caractérisation biochimique, microbiologique
et la mutagénèse**

Présenté et soutenu par : *HAMDOUCHE CHAIMA*

Le : 19/06/2016

TABAI AMIRA

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Mme SATTA .D* Professeur- UFM Constantine 1.

Rapporteur : *Mme BECHKRI .S* MAA- UFM Constantine 1.

Examineur : *Mme SAOUDI .M* MAA- UFM Constantine 1.

*Année universitaire
2015 - 2016*

REMERCIEMENTS

El hamdoulillah

*Nous voudrions présenter nos remerciements et notre gratitude en premier lieu au chef de service de laboratoire du CHU de Constantine Mr **BENLABED. K** pour nous avoir accueillies dans son laboratoire et qui nous a aidées à réaliser la grande partie de la présente étude.*

*Un merci particulier à Mme **SAOUDI M** pour son aide.*

*Au Mr **YASSER** pour son soutien dans la réalisation de la partie pratique.*

*Nous remercions très sincèrement Mme **BECHKRI S** pour nous avoir encadrées et nous avoir suivies régulièrement pour la réalisation de ce travail et de tout ce qu'elle a fait pour nous permettre d'atteindre ces résultats.*

*Un remerciement très particulier à mes chers **MANEL** et **MOUHAMED** qui nous ont beaucoup aidés pour réaliser notre partie pratique .Nous vous remercions de tout notre cœur.*

*Nos remerciements s'adressent également à tous les membres de jury : Mme **SATTA D** et Mme **SAOUDI M** qui nous ont fait l'honneur de leur présence et d'avoir consacré leur temps pour juger ce travail.*

Ces remerciements s'adressent à tous nos enseignants du département de Biologie animale, qui nous ont transmis le goût des études. Et toutes les personnes ayant contribué, de près ou de loin, à la réalisation de ce travail.

**Merci* À ceux et à celles qui nous ont aidé d'une façon ou d'une autre, de près ou de loin dans notre travail, nous les remercions du fond du cœur.*

Merci à tous.....

Dédicace

Je dédie ce travail

♥ *A Ma très chère mère NADIA* ♥

Qui a œuvré ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude. Puisse Dieu le tout puissant, te préserver et d'accorder santé, longue vie et bonheur.

♥ *A Mon très cher père KAMEL* ♥

Qui peut être fier et trouver ici le résultat de longue années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie .Merci pour l'éducation et le soutien permanent venu de toi .Dieu tout puissant te farde et te procure santé

♥ *Mes chères grands-parents* ♥

♥ *Ma chère sœur* ♥

MOULOUK

♥ *Mes chères frères* ♥

CHAMSE ADDINE TAKIE ADDINE CHAHINE

♥ *A toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines* ♥

♥ *A mes chères ami(e)s* ♥

♥ *A mes chers collègues* ♥

♥ *A oncle DJAMEL* ♥

Qui m'ont aidé durant toute ma vie estudiantine, et a ceux qui m'ont aidé près ou de loin.

Dédicace

Je dédie ce travail

A

♥ Mes chers grands -parents♥

Qui m'ont soutenus

*Jusqu'à la fin de mes études, qui m'ont aidée et entouré d'amour avec
fierté*

Mes très chers et adorables parents

♥ Mes chères sœurs et mes frères ♥

♥ A toute ma famille : oncles, tantes, cousins et cousines ♥

♥ A mes chères ami(e)s ♥

♥ A mes chers collègues ♥

Et en fin à la personne qui m'a beaucoup aidé

Pour son soutien moral et sa gentillesse sans égale, oncles Djamel.

SOMMAIRE

Introduction	01
--------------------	----

Chapitre I : Synthèse Bibliographique

Généralités sur *Proteus Mirabilis*

I.1/ Historique.....	03
I.2/ Classification.....	04
I.3/ Caractères bactériologiques.....	04
I. 3-1/ Caractères morphologiques	04
I.3-2/ Caractères cultureux.....	05
I. 3-3/ Caractères biochimiques.....	05
I.4/ Habitat	06
I.5/ La génétique	06
I.6/ Pouvoir pathogène	07
I-7- Virulence et pouvoir pathogène.....	08
I-7-1-Les facteurs de virulence	08
II- Les antibiotiques.....	10
II-1- Définition	10
II-2- Classification	10
II-3- Mode d'action	12
II-4- Les différentes familles d'antibiotiques.....	12
II-4-1- Les β -lactamines	12
II-4-2- Les aminosides.....	13
II-4-3- Les Quinolones	13
II-5- Résistance de <i>Proteus mirabilis</i> aux antibiotiques.....	14
II- 5-1 -Notion de la résistance bactérienne.....	14
II-5-2- Les mécanismes de résistance.....	14

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I- Matériels	16
I-1- Lieu et durée de l'étude.....	16
I-2- Echantillonnage.....	16
I-3 - Matériel utilisés	17

<i>I-4 - Milieux de culture</i>	17
I-4-1- Milieux de culture solides	17
I-4-2- Milieux d'identification biochimiques	17
I.5 - Antibiotiques	17
II - Méthodes	18
II-1- Type des prélèvements	18
II-2 - Préparation des souches	18
II-2-1- Ré-isolement	18
II-3- Identification microbiologiques	18
II-3- 1- Examen macroscopique	18
II-3- 2 -Examen microscopique	18
II-4- Identification biochimique	20
II-4-1- Le milieu mannitol mobilité	20
II-4-2- Le milieu citrate de Simmons	21
II-4-3 - Milieu Triple Sugar Iron (TSI)	22
II-4-4- Milieu urée indole	23
II-4-5- Milieu Clark et Lubs	25
II-4-6- La recherche des ODC, LDC, ADH	27
II-4-7- La recherche des enzymes	29
a/ Le test d'ONPG	29
b/ Le test de la catalase	30
c/ Test d'oxydase	31
II-5- Réalisation de l'antibiogramme	33
II-5-1- Principe	33
II-5-2- Technique	34
II-6- Mutagénèse	35
II-6-1 - But de l'irradiation par les rayons ultraviolets (UV)	35
II-6-2- La techniques	35
II-7- La galerie biochimique après la mutagenèse	37
II-7-1- Méthode	38
 Chapitre III : Résultats et Discussions 	
I- Distribution des souches <i>Proteus mirabilis</i>	39
I-1- Selon l'origine du prélèvement	39

I-2- Selon le sexe	40
II - Les caractères cultureux.....	40
II- 1- Examen macroscopique.....	40
II.2- Examen microscopique.....	41
III- Les caractères biochimiques.....	41
III-1-Résultats de la galerie.....	41
III-1-1 - Le milieu mannitol mobilité	42
III-1-2 -Le milieu citrate se Simmons.....	43
III-1-3- Le milieu TSI.....	43
III-1-4 -Recherche de l'activité uréasique	44
III-1-5- Milieu Clark et Lubs.....	46
III-1-6- La recherche des enzymes.....	47
III-2-Résultats de l'antibiogramme	51
IV – Résultats de la mutagenèse	54
IV- Galerie biochimique après mutagenèse.....	55
V- Résultats de la galerie biochimique après mutagenèse	55
V -1- Test Mannitol-Mobilité	55
V -2- Test de citrate de Simmons	56
V -3-Triple-Sugar- Iron (TSI).....	56
V- 4 - Test Urée-indole	57
V-5- Test de catalase et d'oxydase	57
V -6- Test ODC – ADH –LDC.....	57
V -7- Test VP – RM- ONPG.....	58
Conclusion.....	60
Références bibliographiques.....	61
Résumé	
Annexe	

Liste des abréviations

ADH : Arginine dihydrolase.

AMC : Amoxicilline + acide clavulanique.

AMX : Amoxicilline.

Ak : Amikacine.

ATB : Antibiotique.

BLSE : Bêta- lactamase à spectre Elargi ou Etendu .

C+G% : Pourcentage en guanine + cytosine du génome (anciennement coefficient de Chagraff).

C1G : Céphalosporine de 1ère génération.

C3G : Céphalosporine de 3ème génération.

C4G : Céphalosporine de 4ème génération.

CHUC : Centre hospitalo-universitaire de Constantine.

CIP : Ciprofloxacine.

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CS : Colistine.

CTX : Céfotaxime.

CZ : Céfazoline.

FOX : Céfoxitime

H : heure.

H₂O₂ : Eau oxygénée.

H₂S : Sulfure d'hydrogène.

I : Intermédiaire.

IMP : Imipénème.

LDC : Lysine décarboxylase.

LPS : lipopolysaccharide.

NA : Acide nalidixique.

NaCl : Chlorure de sodium.

O : Antigène capsulaire.

ODC : Ornithine.

ONPG : Orthonitrophényl-β-D-galactopyranoside.

PLP : Protéine liant les pénicillines.

R : Résistance.

RM : Rouge de Méthyle.

S : Sensible.

SXT : Sulfaméthoxazole + Triméthoprime.

TDA : Tryptophane désaminase.

TIC : Ticarcilline.

TSI : Triple Sucre a Identifié.

VP : Voges-Proskauer.

SDS-PAGE : Poly Acrylamide Gel Electrophoresis contenant du lauryl Sulfate De Sodium

ORL : L'oto-rhino-laryngologie

PTA : protéine autotransporteur membrane

Liste des figures

Figure 01 : Mode d'action des antibiotique.....	12
Figure 02 : Le milieu Mannitol Mobilité.....	21
Figure 03 : Le milieu citrate de Simmons	22
Figure 04 : Le milieu TSI.....	23
Figure 05 : Le test Urée Indol.	24
Figure 06 : Le Test TDA.....	25
Figure07 : Le milieu Clark et Lubs.....	26
Figure 08 : Test VP et Test RM.....	26
Figure 09 : Test: ODC –LDC –ADH.....	28
Figure 10 : Le test ONPG.	30
Figure 11 : Test de catalase	31
Figure 12 : Test d'Oxydase.....	32
Figure 13 : Les étapes de la mutagénèse d'une souche de <i>Proteus mirabilis</i>	36
Figure 14 : Test Manitol/ Mobilité - Citrate de Simmons –TSI - Urée /Indol.....	37
Figure 15 : Test TD	37
Figure 16 : Test ONPG.....	37
Figure 17 : Test d'oxydase.....	38
Figure 18 : Test de catalase.....	38
Figure 19 : Test ODC-LDC-ADH.....	38
Figure 20 : Test RM, VP	38
Figure 21 : Répartition des souches <i>Proteus mirabilis</i> selon l'origine du prélèvement.....	39
Figure 22 : Répartition globale des souches de <i>Proteus mirabilis</i> selon le sexe.....	40
Figure 23 : Aspect macroscopique des colonies <i>proteus mirabilis</i> sur gélose Hecktoene....	41
Figure 24 : Aspect microscopique des colonies <i>proteus mirabilis</i> (G * 100).....	41
Figure 25 : Aspect du milieu mannitol.....	42
Figure 26 : Aspect du milieu de la Mobilité.....	43
Figure 27 : Aspect du milieu citrate de Simmons.....	43
Figure 28 : Aspect du milieu TSI.....	44
Figure 29 : Aspect du milieu Urée-indol (a) pour positive et (b) pour négative.....	45
Figure 30 : Aspect du milieu TDA.....	46
Figure 31 : Aspect du milieu pour le test VP et RM.....	47
Figure 32 : Aspect du milieu ODC – LDC – ADH.....	48
Figure 33 : Aspect du milieu avec le test ONPG.....	48

Figure 34 : Le Test de catalase.....	49
Figure 35 : le Test de l'oxydase.....	50
Figure 36 : Antibiogramme d'une souche <i>Proteus mirabilis</i> étudiée.....	52
Figure 37 : Pourcentage de résistance et la sensibilité de <i>Proteus mirabilis</i> aux β -lactamines.....	53
Figure 38 : Taux de résistance et la sensibilité de <i>Proteus mirabilis</i> aux autres antibiotiques.....	54
Figure 39 : Les colonies d'une souche <i>Proteus mirabilis</i> après irradiation.....	55
Figure 40 : Aspect du milieu Mannitol Mobilité avec la souche mutante.....	55
Figure 41 : Aspect du milieu citrate de Simmons avec la souche mutante.....	56
Figure 42 : Aspect du milieu TSI avec la souche mutante.....	56
Figure 43 : Aspect du milieu Urée-indol – TDA avec la souche mutante.....	57
Figure 44 : Test de catalase (b) et Oxydase (a) avec la souche mutante.....	57
Figure 45 : Test ODC – ADH - LDC avec la souche mutante.....	58
Figure 46 : Test VP- RM- ONPG avec la souche mutante.....	58

Liste des tableaux

Tableau 01 : Caractères biochimiques de <i>Proteus mirabilis</i>	05
Tableau 02 : Origine des souches utilisées.....	16
Tableau 03 : Indentification biochimique à l'aide de la galerie classique.....	32
Tableau 04 : Répartition des souches de <i>Proteus mirabilis</i> parmi les prélèvements clinique...39	
Tableau 05 : Répartition globale des souches de <i>Proteus mirabilis</i> selon le sexe.....	40
Tableau 06 : Couleur d'origine des milieux de la galerie biochimique.....	42
Tableau 07 : Caractères biochimiques des souches <i>Proteus mirabilis</i> étudiées.....	50
Tableau 08 : Tableau présente les caractères biochimiques des souches de <i>Proteus mirabilis</i> après la mutagénèse.....	58

Introduction

Tout au long de l'histoire, il y a eu une bataille continuelle entre l'homme et la multitude de micro-organismes qui causent l'infection et la maladie, en affectant une partie substantielle de la population humaine et provoquant une morbidité et une mortalité importantes. À partir du milieu du 20^{ème} siècle, des avancées majeures dans le développement des médicaments antibactériens et autres moyens de lutter contre les infections ont aidé à renverser la tendance en faveur de l'homme (Misra et al., 1984).

Les entérobactéries sont largement répandues dans la nature. Elles sont à l'origine de maladies de gravité très variables, en raison de mécanismes pathogéniques distincts. Un des exemples le plus frappant pour illustrer ce propos est le genre *Proteus* qui regroupe les espèces possédant une uréase et souvent considéré comme responsable des contaminations et/ou colonisations, mais il est fréquemment impliqué dans les infections hospitalières et même au cours des infections communautaires (Ohara et al., 2000).

Les *Proteus* sont notamment responsables d'infections urinaires et aussi d'infections nosocomiales où elles sont généralement associées à d'autres bactéries (Janda et Abbott, 1998). Les germes appartenant à ce genre sont des composants de la flore bactérienne normale de l'intestin de l'homme et des animaux et elles sont retrouvés aussi à l'état saprophyte sur la peau et les muqueuses (Manos et al., 2006). En raison de leurs habitats variés, ils ont plusieurs voies possibles d'infections humaines.

La résistance aux antibiotiques a été de plus en plus observée pour ce genre. La diffusion de la résistance aux céphalosporines à large spectre en raison de la production du β -lactamase à spectre étendu (BLSE) qui est devenue une grande préoccupation depuis la découverte pour la première fois en 1987 d'une souche *Proteus mirabilis* productrice de BLSE (Sturenburg et al., 2004). Sur l'ensemble des bactéries (toutes espèces confondues) isolées en milieu hospitalier, 61% des souches de *Proteus mirabilis* sont résistantes aux β -lactamines par production de β -lactamases à spectre élargi (Kim et Parck, 2004).

C'est dans ce contexte général que nous avons été amenées à entreprendre le présent travail qui a pour objectifs :

- L'isolement et l'identification des souches de *Proteus mirabilis*.
- L'étude du profil de résistance de *Proteus mirabilis*.
- Une Mutagénèse de *Proteus mirabilis* par UV.
- Identification biochimique après la mutagénèse.

Notre mémoire est structuré de la manière suivante :

- Introduction.

- Synthèse bibliographique.
- Matériels et méthodes.
- Résultats et discussions.
- Conclusion.

Synthèse bibliographique

I -Généralités sur *proteus mirabilis*

I-1- Historique

Le genre *Proteus* a été découvert par un pathologiste allemand nommé Gustav Hauser en 1885 et qui a donné le nom à cette bactérie qui se caractérise par l'envahissement de la gélose (Hauser, 1885) et qui est parvenu à distinguer 04 espèces génomiques. Certaines étant clairement dénommées comme *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgarise*, *Proteus penneri*, *Proteus myxofaciens* (Brenner et Holmes, 1995). Le genre avait à l'origine deux espèces : *Proteus mirabilis* et *Proteus vulgaris*, en fonction de la vitesse de leur capacité à liquéfier la gélatine. *Proteus vulgarise* liquéfie la gélatine rapidement. *Proteus mirabilis* le fait plus lentement (Hauser, 1892). Ce genre de bactéries Gram négatifs, dont beaucoup causent des infections des voies urinaires, et fréquemment isolés à partir de l'urine des patients âgés subissant un cathétérisme à long terme chez l'homme (Warren,1991). *Proteus mirabilis* causent 90% de ces infections. En raison de leurs habitats variés, elles ont plusieurs voies possibles d'infections humaines (Liu ,2010).

En 1894, Smith Théobald a indiqué les caractéristiques de fermentation de ces deux espèces en utilisant le glucose, le saccharose et le lactose (Smith , 1894).

En 1919, Wenner et Rettger ont étudié les caractéristiques biochimiques d'un groupe plus important de souches de *Proteus*. En accord avec le travail de Hauser, toutes ces souches produisent du sulfure d'hydrogène et ne fermentent pas le lactose. Elles fermentent le glucose, le saccharose et le maltose (Wenner et al., 1919).

En 1983, Williams et al ont fait un rapport sur cinq patients dans une unité de chirurgie cardiaque avec une septicémie causée soit par *Proteus mirabilis*, *Morganella morgani*, ou les deux organismes. Aucune source de l'environnement n'a été identifiée, bien que le O sérotypage ait confirmé une infection croisée des patients par les deux espèces (Williams., 1983).

Au cours des 10 dernières années, il y a eu un rapport dans la littérature pour suggérer que *Proteus mirabilis* peut jouer un rôle étiopathogénique dans la polyarthrite rhumatoïde. Cette étude a montré que les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ont des niveaux plus élevés de *Proteus* urinaire que ne le font les contrôles comparables sains des deux sexes ou les femmes avec des non-polyarthrite-rhumatoïde conditions arthritiques (Wilson., 1997).

I-2 - Classification

La classification des bactéries de genre *Proteus* a changé au cours du XXe siècle. Le genre *Proteus* est actuellement défini comme appartenant à la famille des Enterobacteriaceae au sein de l'ordre Entérobactériale qui regroupe l'espèce *Proteus mirabilis* (Bergey's, 1998).

Règne : Bacteria.

Embranchement : Protoeubacteria.

Classe : Gamma Proteobacteria.

Ordre : Entérobactériale.

Famille : Enterobacteriaceae.

Genre : *Proteus*.

Espèce : *Proteus mirabilis* (Bergey's, 1998).

I-3- Caractères bactériologiques

I-3-1- Caractères morphologiques

Les bactéries appartenant à l'espèce *Proteus mirabilis* ont une morphologie des petits bacilles à Gram négatif en forme de bâtonnet, généralement très mobiles, polymorphes, mesurant de 0,4 à 0,8 µm de diamètre sur 1,0 µm à 80 µm de longueur, très flagellé en alternance entre les nageurs végétatives et cellules grouillantes hyper-flagellé (Belas, 1996). *Proteus mirabilis* a la capacité de s'allonger et sécréter un polysaccharide lorsqu'il est en contact avec des surfaces solides, ce qui rend extrêmement mobiles sur des éléments tels que l'équipement médical. Elle se caractérise par sa motilité de l'essaimage, sa capacité à fermenter le maltose et son incapacité à fermenter le lactose (Liu, 2010).

Proteus peut afficher deux formes morphologiques et physiologiques différentes : l'une est connue comme les cellules de nageur et l'autre comme cellules grouillantes. En suspension aqueuse *Proteus mirabilis* se trouve dans l'état de la nageuse, qui est une petite cellule en forme de tige à 2 µm de longueur. Elles contiennent 8 à 10 flagelles qui aident à leur motilité de natation. Lors d'un contact avec une surface, *Proteus mirabilis* passe à l'état de Grouillant où la cellule augmente considérablement dans la longueur pour former des filaments très flagellés qui sont de 20 à 80 µm de longueur. Ces cellules alignées en parallèle pour former des radeaux qui sont capables de se déplacer rapidement sur des

Surfaces en masse. Sur des surfaces semi-solides telles qu'une surface de la gélose, ils forment des anneaux concentriques de croissance (Pearson et al., 2008).

I-3-2 - Caractères culturels

Proteus mirabilis se développe en aéro-anaérobiose. Elle n'a pas d'exigence particulière.

Proteus mirabilis pousse bien sur milieux ordinaires (c'est une Entérobactérie) à 37°C.

- Les colonies grosses, non hémolytiques, envahissant la surface de la gélose en ondes concentriques (cette propriété est liée à la mobilité exceptionnelle que lui confèrent plusieurs centaines de flagelles).
- Sur BCP, les colonies sont petites, transparentes en 24 h (Maryse et Danielle, 2004).
- En bouillon, les cultures se développent en donnant souvent un voile en surface.

I-3-3- Caractères biochimiques

Proteus mirabilis présente les caractères généraux des Entérobactéries .C'est une bactérie aéro-anaérobie facultative, fermentant le glucose avec production de gaz , H₂S +, oxydase négatif, catalase positif, possède une nitrate-réductase, Rouge de méthyle positif et Voges- proskauer négative (peut être à la fois RM et VP positif) (Maryse et Danielle, 2004).Les caractères TDA, ONPG. Indiquent qu'il s'agit d'un *Proteus mirabilis*. Elle peut utiliser l'urée, forme des films transparents sur un milieu de croissance, utilise le citrate. Elle peut vivre dans des environnements hautement alcalins. Ces caractères biochimiques sont facilement mis en évidence sur les galeries miniaturisées (Maryse,2004)._Les caractères biochimiques d'identification de l'espèce sont présentés dans le tableau 01

Tableau 01 : Caractères biochimiques de *Proteus mirabilis* (Maryse, 2004).

Caractères biochimiques	<i>Proteus mirabilis</i>
Glucose	+
Lactose	-
Saccharose	-
H ₂ S	+
Citrate	-
Mannitol	-
Urée	+
Indole	+
TDA	+
VP	-

RM	+
ADH	-
LDC	-
ODC	+

I-4/ Habitat

Les *Proteus mirabilis* sont largement répartis dans l'environnement naturel, y compris l'eau polluée, le sol et le fumier, on les rencontre aussi dans la viande putride, des abcès. Elles sont pour la plupart des habitants de voies urinaires de l'homme où elles est censé causer des infections des voies urinaires associés à la formation de calculs rénaux et de la vessie, souvent connus sous le nom des calculs vésicaux (Kelley Struble et al., 2009).

Elles sont impliquées dans la décomposition de la matière organique d'origine animale. Par conséquent, elles sont souvent isolés de matières fécales humaines et animales (Janda et al., 2006). Environ un quart de la population humaine sont porteurs intestinaux de *Proteus* et les patients peuvent être infectés par leurs propres flore (autoinfection). Elles sont les hôtes habituels de tube digestif de l'homme et des animaux. Ces infections peuvent également être contactées par la transmission des bactéries provenant d'autres patients ou à partir d'un réservoir commun (Holt et al., 1986). *Proteus mirabilis* nécessite un environnement qui a une alcalinité élevée, qui est mesurée en termes de pH, qui doit être élevée. Un milieu approprié pour *Proteus mirabilis* doit avoir un pH supérieur à 7 (frasca et al., 2008).

I-5- Génétique

Le génome de *Proteus mirabilis* a été achevé le 28 Mars 2008 (Pearson et al., 2008). Il est constitué de 24 gènes qui codent pour des composants d'un système permettant d'injecter des protéines bactériennes dans des cellules hôtes. Ce système de type III semble être constitué par le transfert horizontal de gènes. Est noté pour sa relativement plus faible teneur en G + C par rapport au reste du génome (Holmes et al., 2008). La longueur totale du génome est constitué d'un chromosome de 4.063 Mb avec une teneur en GC (G + C) de 38,88%. Ce génome est constitué par un seul plasmide de 36289 nucléotides. Le plasmide lui-même ne contient pas de gènes de virulence, mais il peut contenir une bactériocine et son système immunitaire (Melanie et Pearson, 2007). L'annotation du génome est identifiée 3,685 séquences codantes et sept locus ARNr. L'analyse de la séquence a confirmé la présence des déterminants de virulence identifiés précédemment, ainsi que d'un régulon flagellaire 54 kb contigu et 17 types de

fimbriae. Cette information se caractérise par une souche uropathogène spécifique de *Proteus mirabilis* HI4320. Elle est la première séquence complète de la bactérie à partir de plus de 75 souches connues qui ont été identifiés en utilisant une SDS-PAGE de la plupart des protéines cellulaires d'origine humaine (Holmes et al., 2008).

Le chromosome de *Proteus mirabilis* est considérablement plus petit que les chromosomes des autres entérobactéries. En outre, le génome de *Proteus mirabilis* possède quatre copies en tandem du gène du métallo protéase zapE , des gènes codant pour six autotransporters putatifs, une extension de l'opéron fimbriale atf , six gènes y compris un homologue mrpJ et des gènes codant pour au moins cinq mécanismes d'absorption de fer et deux systèmes potentiels de type IV de sécrétion, 16 régulateurs à deux composants (Pearson et al., 2008).

I-6- Pouvoir pathogène

Proteus mirabilis est une espèce non pathogène mais qui provoque une infection urinaires avec une fréquence la plus élevée parmi toutes les espèces de *Proteus* .Elle est impliquée dans les infections compliquées et les infections chez les patients cathétérisés pendant une longue durée (Philips, 1955). *Proteus mirabilis* est plus fréquemment isolée à partir des échantillons cliniques. Elle est l'un des principaux agents pathogènes de l'appareil urinaire humain chez les patients hospitalisés. Ces infections urinaires peuvent donner lieu à des bactériémies hautement mortelles et qui sont difficiles à traiter et souvent fatale. Qui peuvent être opportunistes et causer des lésions septiques sur d'autres sites du corps (Holt et al., 1986). Dans les infections urinaires communautaires ou nosocomiales. *Proteus mirabilis* grâce à son uréase puissante peut alcaliniser les urines et être responsable de lithiases. Ces lithiases se comportent comme du matériel étranger qui permet à l'infection de devenir chronique, entraînant ainsi une destruction progressive du parenchyme rénal. Sur le plan des infections des voies respiratoires surtout en milieu hospitalier peut provoquer une infection ORL et pneumopathies (Maryse et Danielle, 2004). L'incidence des infections par cet organisme est à seulement 44% des patients avec des voies urinaires compliqués, à savoir ceux présentant des anomalies fonctionnelles ou anatomiques ou avec une instrumentation chronique comme le cathétérisme à long terme (Kemper et al., 1988). Ce qui rend l'infection nosocomiale la plus fréquente. Bien qu'infectant le tractus urinaire, *Proteus mirabilis* a une prédilection pour les reins (Maryse et Danielle, 2004). Enfin et surtout, non seulement cette bactérie cause de la cystite et pyélonéphrite aiguë mais la production de calculs urinaires, une caractéristique de l'infection par cet organisme (Cover et al., 2001).

I-7- Virulence et pouvoir pathogène

Les termes pathogénicité et virulence sont souvent utilisés comme synonymes. Mais certains auteurs font une distinction claire entre les deux. Le terme pathogénicité définit la capacité de la bactérie à causer une maladie alors que la virulence est la mesure ou le degré de pathogénicité (Podschun et Ullmann, 1998).

I-7-1-Les facteurs de virulence

Proteus mirabilis est une bactérie bien adaptée à l'hôte. La colonisation du tractus urinaire est accomplie grâce à l'expression de plusieurs facteurs de virulence. Ces facteurs sont liés aux processus d'adhésion, la toxicité, l'évasion et la motilité. De nouveaux génomes de cette bactérie ont été séquencés (Cristiani et al., 2014), *Proteus mirabilis* est très virulente et contient de nombreuses caractéristiques qui l'aide de sa pathogénicité. Elle possède un flagelle qui est nécessaire pour la motilité et qui impliqué dans l'apparition des infections. Cette bactérie produit également de l'uréase, qui est responsable des calculs rénaux à la suite de l'hydrolyse de l'urée en ammoniac. En outre, l'hémolysine que la bactérie sécrète est cytotoxique pour les cellules épithéliales des voies urinaires qui sont soumis à l'invasion par les *Proteus* (Misra et al., 1984).

- Uréase

L'uréase est très importante dans la pathogenèse de *Proteus mirabilis*, cette enzyme est composée de trimères en UréA, UréB, UréC (Jones et Mobley, 1998) et un co-enzyme de nickel. Qui catalyse la formation de calculs rénaux et de la vessie (Cocker et al., 2000). *Proteus* présente une activité uréase lors d'un contact avec l'urée. L'uréase provoque la décomposition de ce dernier en ammoniac et en dioxyde de carbone (McClean et al., 1988). Donc l'ammoniac augmente le pH et provoque la précipitation des minéraux dans l'urine, ce qui peut conduire à des calculs de la vessie et du rein. Ainsi que la formation de biofilms cristallins le long d'un cathéter (Jones et Mobley, 1991). Cette modification du pH est importante lors de la colonisation de *Proteus* de cathéter, ce qui facilite l'adhérence bactérienne (Nicholson et al., 1991).

- IgA Protéase

Les *Proteus mirabilis* peuvent produire une autre enzyme extracellulaire d'immunoglobuline sérique capable de cliver les IgA. C'est la métallo protéase de la famille de serralyse de protéase de zinc codé par ZapA (Wassif et Cheek, 1995). Le pH alcalin est optimal pour l'activité d'un grand nombre de ces types de protéase, ce qui est souvent présent en raison de l'activité de l'uréase. Au cours de l'infection, ZapA est produit et actif. Ce qui provoque la dégradation de l'IgA in vivo (Sonior et al., 1991). Il a été également montré que ZapA est

muté, le nombre des bactéries récupérées est spécifiquement diminué dans l'urine et la vessie avec une diminution d'un facteur 100 000 et 10 000 respectivement (Walker et al., 1999).

- **Hémolysine**

L'hémolysine est une toxine qui s'insère dans les membranes cellulaires des eucaryotes. L'activité hémolytique est communément retrouvée chez les bactéries à Gram- et Gram+. *Proteus mirabilis* présente une activité hémolytique codée par les gènes hpmB et hpmA. C'est un système de sécrétion de deux conjoints. HpmB est probablement trouvée dans la membrane externe, elle transporte et active hpmA. HpmA se trouve dans le périplasme (Welch, 1987). La fonction hémolytique est de former des pores dans les cellules hôtes cibles, ce qui permet au *Proteus* de se propager dans les reins lors de l'infection (Cocker et al., 2000). Ceci est probablement médié par la capacité accrue des cellules hémolytiques de cette bactérie à envahir les tissus de l'hôte (Peebooms et Verwrij, 1984). Cette hémolysine n'est pas aussi active au cours de l'infection in vivo ou l'activité d'autres facteurs de virulence masquent sa contribution (Mobley et al., 1991). D'autres études ont indiqué également que les souches qui n'ont pas une activité hémolytique sont moins virulentes (Peebooms et Verwrij, 1983).

- **Agglutinine toxique**

Une toxine découverte, la PTA produite par *Proteus* est à la fois cytotoxique et possédant la capacité d'agglutination. La PTA est une protéine calcium dépendante qui reste à la surface de la cellule. L'activité cytotoxique est liée au PTA quand elle est associée à une cellule. Il a été montré que la PTA est exprimée in vivo au cours d'une infection et que les bactéries dépourvues de PTA ont des symptômes de la maladie moins graves dans les reins. Ces données suggèrent le rôle important de la PTA dans la pathogenèse de *Proteus mirabilis* (Alamuri et Mobley, 2008).

- **Flagelles et essaimage**

L'essaimage (ou swarming) est une alternative à la nage observée lorsque les bactéries sont cultivées en milieu solide, ensemencées au centre d'une boîte de milieu gélosé. Les bactéries se multiplient pour donner une colonie (Rozalski et Staczek, 2009). L'essaimage est un phénomène collectif et cordonné car une cellule isolée est capable d'essaimer à la surface d'une gélose. L'induction de l'essaimage est déclenchée par des facteurs inhibant la rotation des flagelles (telle que l'augmentation de la viscosité du milieu) et par la présence de signaux extracellulaires (Verstraeten et al., 2008). Les capacités à essaimer sont variables selon les espèces et les souches. Il peut ne pas exister avec certaines souches de *Proteus mirabilis* qui forme un voile continu (envahissement continu sans périodicité), soit des colonies parfaitement circonscrites (absence totale d'envahissement) (Siloverblatt et Ofek, 1978).

- Fimbriae

Les fimbriae sont des appendices de surface bactérienne pour l'adhésion. Le séquençage récent de génome de *Proteus mirabilis* a révélé qu'il y a 17 opérons fimbriaux différents couvrant 5 classes différentes de fimbriae. Seuls quelques-unes d'entre eux ont été impliqués dans la virulence. Les fimbriae sont normalement exprimés à l'inverse des flagelles (Bahrani et Mobley, 1994). Ils sont responsables d'une hémagglutination non inhibée par le mannose. Les fimbriae MR/P sont fréquemment synthétisées par les *Proteus mirabilis* (Zahao et al., 1997).

II- Les antibiotiques

II- 1- Définition

Le mot antibiotique fut créé en 1889 par Paul Vuillemin. Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique et/ou semi-synthétique obtenue par modification chimique d'une molécule de base naturelle (Lavigne, 2007). Un antibiotique est un dérivé produit par le métabolisme de microorganismes possédant une activité antibactérienne à faible concentration et n'ayant pas de toxicité pour l'hôte (Perronne, 1999). On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. (Prescott, 2003).

II-2/ Classification

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur différents critères tels que :

Leurs origines, leurs structures et leurs mécanismes d'action. Leur spectre d'activité (Yala et al. 2001).

- **Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi-synthétique).

- **Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.

- **Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

- **Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle β lactame) sur laquelle il y a hémi synthèse.

La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles

Il existe plusieurs familles d'antibiotiques. Les principales sont :

- Les bêta-lactamines.
- Les macrolides.
- Les glycopeptides.

- Les aminosides.
- Les tétracyclines.
- Les quinolones.
- Les sulfamides.

II-3- Mode d'action

En thérapie, les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte (Smaoui, 2010). Les antibiotiques agissent à l'échelon moléculaire au niveau d'une ou de plusieurs étapes métaboliques indispensables à la vie de la bactérie (Fomba, 2006).

- Action sur la paroi bactérienne (peptidoglycane).
- Action sur la structure de la membrane cytoplasmique bactérienne.
- Action sur la synthèse protéique bactérienne.
- Action sur la synthèse de l'ADN de la bactérie.

Les modes d'action des antibiotiques sur les bactéries sont illustrés dans la figure 01.

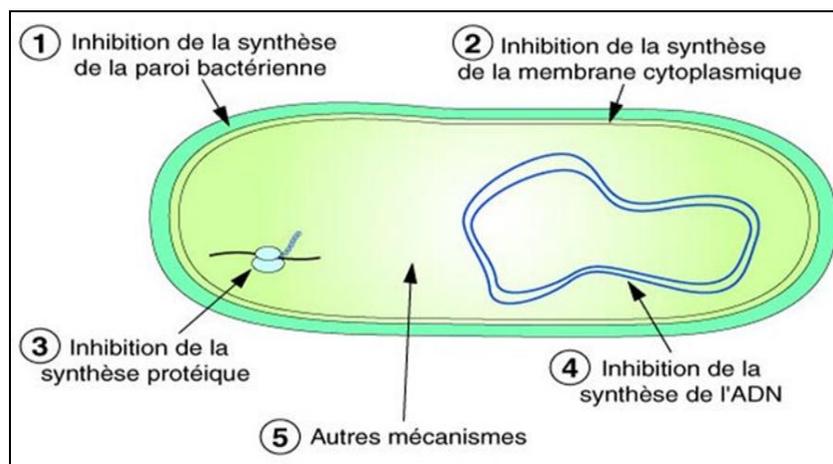


Figure 01 : Mode d'action des antibiotiques (Fomba, 2006).

II-4- Les différentes familles d'antibiotiques

II-4-1- Les β -lactamines

- Définition

Les β -lactamines sont les antibiotiques de première ligne dans le traitement des infections causées par les entérobactéries. Cependant, dès le début de leur utilisation de masse dans les années 1940. Leur efficacité a été confrontée à la production d'enzymes les inactivant : les β -lactamases (Ruppé, 2010).

- Structure et classification

La structure de base des β -lactamines est le noyau azétidinone qui contient la structure carbonyle lactame indispensable à l'activité des molécules. Sur cette structure est fixée un cycle penta-atomique saturé (pénème), insaturé (pénème) ou hexa-atomique (céphèmes). Le noyau azétidinone seul (β -lactamine monocyclique) peut être substitué. En fonction des substituants de l'atome d'azote (Bryskier, 1999). Les β -lactamines sont divisées en plusieurs familles et chaque famille donne différentes sous familles on cite :

a/ Pénicilline

- Ampicilline et Amoxicilline spectre élargi orienté sur certains bacilles à Gram négatif mais inactivées par les pénicillinases y compris celle du staphylocoque. Inactives sur les bacilles à Gram négatif naturellement producteurs de céphalosporinases comme certaines entérobactéries *Proteus mirabilis* (Cavallo et al., 2004).

- Carboxypénicillines, Ticarcilline. Spectre élargi sur les bacilles Gram négatif comme *Pseudomonas aérogenosa* (Cavallo et al., 2004).

- l'amoxicilline + l'acide clavulanique, utilisés comme inhibiteur de β -lactamases en association avec une autre β -lactamine (amoxicilline ou ticarcilline+acide clavulanique) et l'acide clavulanique + ticarcilline (Cavallo et al., 2004).

b/ Les céphalosporines

-Céfazoline : est une céphalosporine de première génération (C1G). Il est hydrolysé facilement par les β lactamases acquises. Leur spectre d'activité regroupe les cocci à Gram positif, essentiellement les streptocoques et à quelques entérobactéries ne produisant pas de céphalosporinase inductible (Cavallo et al., 2004).

- Céfotaxime : est une céphalosporine de troisième génération (C3G) (Jarlier et Nordmann, 2000). Les C3G se caractérisent par leur stabilité à la plupart des β -lactamases comme les pénicillinases de type TEM ou les céphalosporinases chromosomiques des entérobactéries (Cavallo et al., 2004).

- Mode d'action des β -lactamines

Les β -lactamines inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane (polymère majeur spécifique de la paroi des bactéries à Gram négatif et positif). Les cibles des β -lactamines sont des enzymes situées dans la partie externe de la membrane cytoplasmique bactérienne et appelées PLP. Ces enzymes correspondent aux transpeptidases impliquées dans la synthèse du peptidoglycane. La fixation des β -lactamines sur ces PLP est responsable de l'arrêt de la synthèse du peptidoglycane (Cavallo et al., 2004).

II-4-2- Les aminosides

- Définition

Ce sont des antibiotiques bactéricides de la famille des Aminoglycosides. Ils comprennent la kanamycine, l'amikacine, la gentamycine, la nétilmycine, la tobramycine (Bryskier, 1999). Ce sont des hétérosides naturels formés par un ou plusieurs glycosides liés à un aminocyclitol (Yala et al., 2001).

- Mode d'action

Le spectre d'action des aminosides est large, agissant sur les bacilles Gram négatifs aérobies. Notamment les entérobactéries et sur les bacilles à Gram positif (*Listeria*). Ils sont actifs sur les *staphylococcus aureus* sécrétants de pénicillinase et sur les cocci à Gram négatif. Les aminosides perturbent la synthèse des protéines au niveau de la sous-unité 30S des ribosomes des bactéries entraînant la destruction bactérienne (Yala et al., 2001).

II-4-3- Les quinolones

- Définition

Les quinolones sont des antibiotiques synthétiques, découvertes en 1962 par Leshner qui a isolé l'acide nalidixique à partir d'une préparation de chloroquine destinée au traitement du paludisme. Ces fluoroquinolones, qui sont des quinolones de deuxième génération ciprofloxacine (Yala et al., 2001). Sont largement utilisés en médecine humaine et vétérinaire, notamment dans le cas d'infections urinaires et respiratoires (Meradi et al., 2009).

- Mode d'action

Les fluoroquinolones malgré leur efficacité sur les bactéries à gram négatif leur utilisation doit être raisonnée afin de contrôler l'émergence de résistance (Botto, 2003). Les fluoroquinolones ont un spectre d'activité élargi, qui recouvre les bactéries à Gram négatif. Les quinolones inhibent spécifiquement la synthèse d'ADN bactérien en agissant sur les topo-isomérases de type II ainsi que la topo-isomérase IV. Elles se fixent sur la sous-unité A de la gyrase (cible préférentielle des bactéries à Gram négatif) (Meradi et al., 2009).

II-5- Résistance de *Proteus mirabilis* aux antibiotiques

II-5-1 - Notion de la résistance bactérienne

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (Carl, 2009). L'efficacité de l'antibiotique dépend d'au moins trois facteurs : la quantité d'antibiotique au contact de la cible, l'affinité de l'antibiotique pour la cible et la production d'enzymes inactivant l'antibiotique. Ces facteurs sont responsables soit d'une résistance naturelle et donc présents chez toutes les souches de l'espèce, soit d'une résistance acquise par

certaines souches. Suite à l'apparition de mutations chromosomiques ou à l'acquisition de matériel génétique tels que des plasmides, des transposons ou des intégrons (Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 1997).

II-5-2- Les mécanismes de résistance

- Les b-lactamases

Les études actuelles montrent qu'il existe un certain nombre d'antibiotiques qui étaient autre fois efficace contre *Proteus mirabilis* qui sont désormais inutiles en raison de longues béta lactamases du spectre (BLSE). Ce sont des enzymes qui détruit ou inactive l'antibiotique, traversé les plasmides et on les trouve dans la plupart des entérobactéries. Ces plasmides ont été trouvés dans les abcès, le sang, pointes de cathéter, les poumons, le liquide péritonéal, crachats et la culture de la gorge. Citons par l'exemple des β -lactamases produites par les entérobactéries pour inactiver les lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame (Farkosh et al., 2008).

- Diminution de la perméabilité

Par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leurs synthèse par les quelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie. Par exemple le cas de la résistance de *Pseudomonas aërogenozsa* à l'imipénème causée par la perte d'une porine spécifique aux carbapénèmes (Lozniewski et Rabaud, 2010).

- Altération (ou modification) des sites de liaison

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides. Ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action comme le cas d'altération des protéines de liaison aux pénicillines (PLP) (Jacoby et al., 2006).

- Pompes à efflux

Expulsion rapide de l'agent hors de la cellule avant qu'il puisse agir. Un certain nombre de bactéries possède une capacité intrinsèque de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Cette propriété est très connue chez les bactéries à Gram négatif qui possèdent dans leur membrane des protéines appelées pompes effluentes. Qui expulsent les antibiotiques (Lee, 2006, Jayaraman, 2009).

Matériels et Méthodes

I-Matériels**I-1- Lieu et durée de l'étude**

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-Universitaire Ben Badis de Constantine. Elle s'est étalée sur une période Trois mois (du 07 Février au 07 Mai 2016). La manipulation de la mutagénèse s'est déroulée au niveau du laboratoire de Zoologie de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mantouri.

I-2-Echantillonnage

Durant la période de notre stage, nous avons étudié 20 souches de *Proteus mirabilis* isolées à partir des prélèvements pathologiques des services du CHU de Constantine. Le tableau 02 présente l'origine des souches utilisées selon le Sexe, l'âge, la nature de prélèvement et le service.

Tableau 02 : Origine des souches utilisées selon le sexe, âge, nature de prélèvement et le service.

N°de prélèvement	Référence	Sexe	Age	Nature de prélèvement	Service
P1	147	F	/	Sonde Vésicale	Réanimation
P2	602	F	/	Pus	Traitement Ambulatoire
P3	648	H	/	Urine	/
P4	664	F	48	Urine	/
P5	706	H	/	Pus	/
P6	728	H	/	Pus	Traitement Ambulatoire
P7	765	H	/	Urine	Centre des brulures
P8	711	H	/	Pus	Traitement Ambulatoire
P9	837	H	/	Pus	/
P10	1183	F	51	ECBU	Infectiologie
P11	1282	F	/	ECBU	Medecine interne hommes

P12	1295	F	30	Urine	Histologie
P13	1173	H	/	ECBU	Infectiologie
P14	1639	F	/	ECBU	Traitement Ambulatoire
P15	1653	H	17	ECBU	/
P16	1676	H	/	Pus	Traitement Ambulatoire
P17	1946	H	/	ECBU	/
P18	1701	F	/	ECBU	/
P19	654	F	32	ECBU	/
P20	2447	F	60	ECBU	Infectiologie

F : Femme **H** : Homme.

I-3 - Matériel utilisés

- Microscope optique
- Pipettes Pasteur.
- Pipettes graduées.
- Tubes à essai
- Lames et lamelles, Ecouvillons.
- Lampe UV.

I-4 - Milieux de culture

I-4-1 -Milieux de culture solides

- Gélose nutritive.
- Bouillant nutritive.
- Milieu Hecktoen.
- Mueller Hinton.

I-4-2- Milieux d'identification biochimiques et métaboliques

- Milieu TSI.
- Milieu Mannitol mobilité.
- Milieu Citrate de Simmons.
- Milieu Liquide Urée Indole.
- Milieu Clark et Lubs, RM, VP.

- Milieu Moeller Témoin, ODC –LDC –ADH.

I.5 - Antibiotiques

Les antibiotiques utilisés étaient :

Les antibiotiques utilisés étaient :

- Amoxicilline.
- Amoxicilline + acide clavulanique.
- Ticarcilline.
- Céfazoline.
- Céfoxitine.
- Céfotaxime.
- Imipénème.
- Gentamicine.
- Amikacine.
- Acide nalidixique.
- Ciprofloxacine.
- Triméthoprim +Sulfaméthoxazole.
- Colistine.
- Chloramphénicol.

II - Méthodes

II-1- Type des prélèvements

Les prélèvements correspondaient aux différents sites (urines, pus, sonde urinaire) .

II-2 - Préparation des souches

II-2-1- Ré-isolement

Il Consiste à faire l'ensemencement d'une seule colonie prélevée à partir d'une culture mère contenant différents germes.

- Technique

-De la boîte mère contenant plusieurs germes, on prélève une seule colonie de la souche qu'on veut étudier en se basant sur les caractères morphologiques de notre bactérie pour la différencier des autres.

- À l'aide d'une pipette Pasteur ou une anse de platine stérilisée, on réalise des stries en utilisant la méthode de trois cadrons sur milieu Hecktoen (milieu sélectif pour les trois germes).

- Incubation dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- Lecture

Mettre en évidence les caractères culturels et morphologiques des colonies comme la couleur, l'aspect, la forme, la taille et même l'odeur.

II-3 - Identification microbiologique

L'identification des bactéries appartenant à l'espèce *Proteus mirabilis* est basée sur la succession des tests qui suivent : examen macroscopique et examen microscopique, tests biochimiques et un antibiogramme.

II-3- 1- Examen macroscopique

L'examen est appliqué principalement sur la gélose Hecktoen, basé sur la recherche de caractéristiques suivantes : la couleur, la forme, l'aspect de surface, l'aspect des bords de colonies, l'odeur, la fermentation du lactose. Ces caractéristiques macroscopiques de colonies sont les plus impliquées dans la connaissance de l'espèce *Proteus mirabilis*.

II-3- 2 -Examen microscopique

L'examen microscopique après coloration de Gram, permet non seulement d'observer la morphologie des cellules de *Proteus mirabilis* et leurs modes de regroupement, leur mobilité. Mais aussi de différencier ces bactéries à Gram négatif et des bactéries à Gram positif.

Un frottis est préparé à partir des colonies suspectes, en fixant sur une lame en verre une goutte de la suspension bactérienne. Ce frottis est coloré par la méthode de Gram. La coloration elle est effectuée en plusieurs étapes

✓ Protocole

- Etaler une goutte de suspension microbienne sur une lame.
- Laisser bien sécher.
- Recouvrir la lame avec du violet de Gentiane, laisser agir 1 min.
- Par-dessus ajouter le Lugol 1 min.
- Eliminer les colorants et décolorer rapidement à l'alcool 30sec.
- Rincer à l'eau pour arrêter la décoloration.
- Recouvrir la lame de Fuchsine ou safranine 1 min.
- Rincer à l'eau et laisser sécher à l'air (ou à la flamme).
 - Observation à l'objectif X 100 avec l'huile à immersion.

c) Principe

Après l'application du violet de gentiane et de la solution de Lugol, il se forme un complexe coloré dans les cellules et toutes sont colorées en bleu-violet. Il existe une différence de perméabilité à l'agent de décoloration (alcool) entre la structure des parois des bactéries Gram+ et Gram-. Ce qui entraîne une différence dans la vitesse de dissolution des complexes formés. Ainsi les bactéries Gram+ conservent leur coloration violette alors que les Gram- sont complètement décolorés. La dernière étape (fuchsine) constitue simplement une coloration de contraste afin de recolorer les bactéries Gram- en rose-rouge pâle.

La lecture des frottis est réalisée à l'huile d'immersion au microscope optique pour détecter la présence des germes mobiles.

II-4- Identification biochimique**- Méthodes**

Après l'isolement et l'identification des caractères cultureux de *Proteus mirabilis*. On a réalisé la galerie biochimique pour mettre en évidence les caractères biochimiques de cette bactérie. Pour chaque souche, préparer d'abord la suspension en mettant une colonie prélevée de la boîte de pétrie après repiquage dans 5 ml d'eau stérile ou bien bouillon nutritif. Cette suspension a servi à ensemencer différents milieux de culture en tubes permettant ainsi de mettre en évidence différents caractères biochimiques. Les milieux de culture suivants ont été utilisés :

II-4-1- Le milieu mannitol mobilité**- But**

Ce milieu solide permet l'étude de la fermentation du mannitol et la mobilité de la souche ainsi que la recherche du nitrate réductase.

- Principe

Le milieu mannitol-mobilité est utilisé pour la différenciation rapide des Entérobactéries. Il permet de déceler la dégradation du mannitol et la mobilité de la bactérie.

La présence d'une faible teneur d'agar (gélose semi-molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale. La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

- Technique d'ensemencement

- L'ensemencement se fait par piqûre centrale à l'aide d'une pipette pasteur contenant quelques gouttes de la suspension bactérienne.
- Incuber 24 heures à 37°C.



Figure 02 : Le milieu Mannitol Mobilité.

- Lecture

- La mobilité positive : trouble homogène, formant une spirale autour de la piqûre centrale. Déplacement des bactéries dans le milieu. Plus la bactérie est mobile plus elle augmente et s'élargit.
- Mobilité négative : la culture bactérienne est limitée à la piqûre centrale. Pas de déplacement des bactéries dans le milieu. Les bactéries sont probablement immobiles.
- Si le milieu jaune : Acidification du milieu révélée par un virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide. La bactérie fermente le mannitol donc elle est dite mannitol +.
- Si le milieu rouge : Absence d'acidification du milieu. La bactérie ne fermente pas le mannitol, elle est dite bactéries mannitol -. (Le Minor ,1993).

II-4-2-L'utilisation de citrate de Simmons**- But**

Ce milieu permet l'étude de l'utilisation du citrate (acide organique) par la bactérie comme seule source de carbone.

- Principe

Le milieu citrate de sodium (Simmons) est utilisé pour l'identification des bacilles Gram négatif. Il permet de rechercher l'utilisation de citrate de sodium comme seul source de carbone. Seules les bactéries autotrophes possédant un citrate perméase peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone.

- Technique

- Le milieu est présenté sous forme de gélose inclinée.

- Ensemencement par des stries longitudinales le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur, on prend une goutte de la suspension et on la dépose sur le milieu citrate de Simmons incliné. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.



Figure 03 : Le milieu citrate de Simmons.

- Lecture

- L'utilisation du citrate de sodium se traduit par un virage de couleur du vert au bleu qui signifie qu'il y a eu une alcalinisation du milieu et que la bactérie possède un citrate perméase.

- Absence de culture bactérienne [Milieu inchangé (vert)] : les bactéries n'utilisent pas le citrate comme seule source de carbone. Les bactéries ne possèdent pas de citrate perméase elles sont dites citrate –.

II-4-3- La fermentation des sucres ,Triple Sugar Iron (TSI)

- But

La mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène.

- Principe

Le milieu Triple-Sugar-Iron est un milieu d'identification rapide pour les entérobactéries. Permet de mettre en évidence la fermentation du glucose (avec ou sans dégagement gazeux), du lactose, du saccharose et la production de H₂S.

- Technique d'ensemencement

- Ensemencement de culot par piquer centrale et la pente par des stries serrées à l'aide d'une pipette pasteur contenant la suspension bactérienne

- Incuber 24 heures à 37°C.



Figure 04 : le milieu TSI.

- **Lecture**

✓ **Fermentation de Glucose**

-Si le culot est de couleur rouge orange (couleur inchangé) cela veut dire que la bactérie n'a pas fermenté le Glucose. Elle est Glu- .

-Si la couleur du culot devient jaune. On comprend donc le Glucose a été fermenté par la bactérie. Elle est Glu +.

✓ **Fermentation du lactose et/ou du saccharose**

-Pente inclinée rouge : lactose et saccharose non fermentés. La bactérie est Lac - / Sach- .

-Pente inclinée jaune : lactose et/ou saccharose fermentés. La bactérie est Lac+ /Sach+.

✓ **Production de H₂S dans le culot**

- Formation d'H₂S , une coloration noire entre le culot et la pente ou le long de la piqûre. Donc elle est H₂S +.

II-4-4 - Milieu urée indole

- **But**

Ce milieu permet de mettre en évidence les caractères suivants :

-Présence d'une uréase.

-Présence d'une tryptophanase.

-Présence d'une tryptophane désaminase (TDA).

- **Principe**

L'indole permet la culture des germes ne présentent pas d'exigence particulière. La recherche de la production d'indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase qui dégrade le tryptophane en acide indole-acétique ou en acide carboxylique. Seules les bactéries indologènes poursuivent cette dégradation jusqu'à la formation d'indole. Selon la réaction suivante :



Le milieu urée-tryptophane appelé improprement milieu urée-indole. C'est un milieu complexe qui fournit un ensemble de résultats utiles pour la différenciation des entérobactéries. Il permet de rechercher :

- L'uréase : Les entérobactéries peuvent dégrader l'urée qui est un composé organique et qui peut servir de source d'azote unique aux bactéries possédant une uréase très active. En présence de cette enzyme, les bactéries uréolytiques peuvent transformer l'urée en ammoniac et en carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu et qui fait virer l'indicateur coloré de pH (le rouge de phénol) du jaune au rouge en milieu basique.

- La tryptophane-désaminase TDA : La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl_3) une coloration brune.

- **Technique**

A l'aide d'une pipette Pasteur, quelques colonies sont prélevées et introduites dans un tube contenant de l'urée-indole puis les tubes sont incubés pendant 24 heures. Un résultat positif se traduit par le virage de couleur de la solution vers le rose violacé.



Figure 05 : Le test Urée -Indole.

- Recherche de la tryptophane désaminase (TDA) :

L'ensemencement se fait au moyen d'une pipette pasteur par l'ajout de quelques gouttes du réactif TDA dans le milieu urée-indole contenant la suspension bactérienne. Agiter bien le mélange. La lecture se fait immédiatement.



Figure 06 : Le Test TDA.

- Lecture

-Si le milieu devient rose violacé : Alcalinisation du milieu due à la dégradation de l'urée, la bactérie possède l'uréase. Elle est uréase +.

-Si le milieu reste orangé (inchangé) : Pas d'alcalinisation du milieu, la bactérie ne possède pas l'uréase. Elle est uréase –.

Après l'ajout de 2-3 gouttes du réactif de Kovac et sans agiter le milieu :

-S'il y'a apparition d'un anneau rouge : Présence d'indole, le tryptophane a donc été hydrolysé. La bactérie a produit de l'indole. Elle est indole +.

-Si l'anneau reste orange : Absence d'indole, La bactérie n'a pas produit d'indole. Elle est indole –.

Après addition de réactif TDA, la lecture comme suivant :

- Obtention d'un précipité brun foncé, présence d'acide indole pyruvique. Le tryptophane a été désaminé. La bactérie possède le tryptophane désaminase. Elle est TDA +.

-Absence de précipité : Absence d'acide indole pyruvique, la bactérie ne possède pas le tryptophane désaminase. Elle est TDA –.

II-4-5- Milieu Clark et Lubs

- But

Ce milieu permet d'étudier une voie de fermentation du glucose : la voie du butanediol et la mise en évidence des bactéries produisant des acides organiques.

- Principe

Le milieu de Clark et Lubs permet l'étude des produits de fermentation du glucose, différenciation entre les fermentations « acides mixtes » et « butylène glycolique ».

- Test RM (rouge de méthyle) : Ce test permet la mise en évidence grâce au rouge de méthyle, de la fermentation acide mixte par acidification d'un milieu glucosé après fermentation du glucose.

- Test VP (Voges-Proskauer) : cherche une étape intermédiaire de la transformation de l'acide pyruvique qui consiste en la production d'acétoïne qui est transformée en alcool : le 2,3-butanédiol, c'est la réaction de VOGES-PRAUSKAUER

- **Technique**

Mettre quelques colonies dans le tube contenant le milieu Clark et Lubs, incubation à 37°C dans l'étuve pendant 24 heures. Après l'incubation diviser le milieu dans deux tubes stériles

-**Tube 1** : ajouter quelques gouttes de rouge de méthyle.

-**Tube 2** : ajouter quelques gouttes de VP1 .Attendre quelques secondes et rajouter deux ou trois gouttes de VP2 et mettre les deux tubes dans une position inclinée pour bien observer le virage.



Figure07 : Le milieu Clark et Lubs.



Figure 08: Test VP et Test RM.

-Lecture

1/ Le test RM

- Si les bactéries produisent des acides forts au cours de la fermentation. Le milieu reste acide et donc en rouge. Ces bactéries sont RM+.

- Si les bactéries produisent des acides faibles, le milieu s'est acidifié puis ré-alcalinisé. Le milieu est donc jaune. Elles sont RM- .

2/ Le test VP (Voges-Proskauer) :

-Le réactif ajouté (l'alpha naphthol) permet dans le cas d'un milieu basique et en présence de dioxygène, d'obtenir une coloration rosé ou rouge. La bactérie est VP +.

-Si le milieu reste incolore .Elle est VP - .

II-4-6- la recherche des : ODC –LDC –ADH bactériennes**-Principe**

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae*, *Pseudomonas* et genres associés. Est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).

- Dans un premier temps, les bactéries en anaérobiose, fermentent le glucose et donc les milieux s'acidifient.

- dans un deuxième temps les bactéries ayant épuisées le glucose peuvent utiliser l'acide aminé présent dans le milieu si elles possèdent les enzymes adéquats. En anaérobiose et en milieu acide c'est la décarboxylation des acides aminés par les décarboxylases qui est favorisée. L'amine produite ré-alcalinise le milieu ce qui a pour effet de faire virer au violet le milieu.

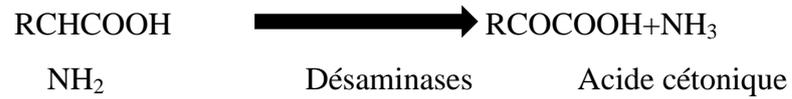
Les décarboxylases et les dihydrolases sont :

La lysine décarboxylase (LDC) : Lysine $\xrightarrow{\text{LDC}}$ Cadavérine + CO₂.

L'ornithine décarboxylase (ODC) : Ornithine $\xrightarrow{\text{ODC}}$ Putricine + CO₂.

L'arginine dihydrolase (ADH) : Arginine $\xrightarrow{\text{ADH}}$ Agmatine + CO₂.

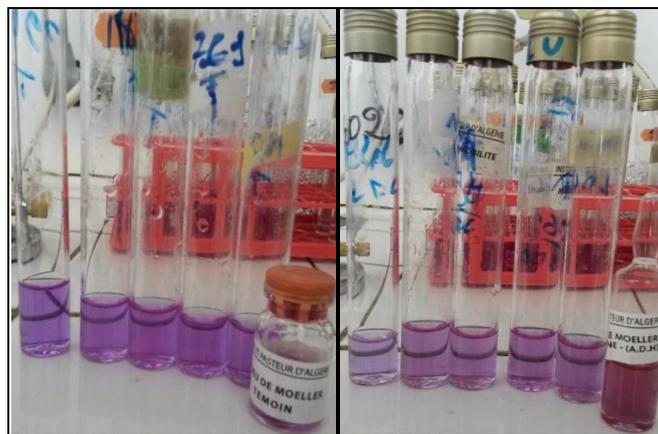
Les décarboxylases ou carboxylases, scindent les acides aminés entraînant la formation de l'amine correspondant avec la libération de CO₂. Suivant la réaction :



- Technique

Le test est réalisé avec le milieu Moeller avec des colonies bien agité et réparti dans 4 tubes à hémolyse différents :

- Le premier tube constitue le témoin. Il contient essentiellement du glucose en petite quantité et du pourpre de bromocrésol comme indicateur de pH.
- Les trois autres tubes contiennent en plus du milieu témoins, un des trois acides aminés suivants : Arginine, Lysine ou Ornithine.
- incubé à 30°C pendant 24 à 48 h.



Témoin (a)

(b)



(c)

(d)

Figure 09: Test ODC (c) –LDC (d) –ADH (b).

- Lecture

Pour réussir la lecture, il faut toujours s'assurer qu'il s'agit d'une Entérobactérie (fermentation du glucose) et qu'il y a croissance dans les tubes. Si non le diagnostic sera orienté vers une bactérie aérobie stricte (Le minor ,1993).

Après incubation la lecture comme suit :

- Coloration jaune : absence d'enzymes. ADH-, ODC-, LDC-.

Une bactérie non décarboxylante utilisera les peptones du milieu et produira des acides organiques ainsi que des bases faibles comme l'ammoniac. Le milieu deviendra jaune.

-Coloration violet : présence d'une décarboxylase. ODC+, LDC+.

-Coloration violette franche pour l'ADH, se lit ADH+.

Une bactérie décarboxylante après avoir utilisé le glucose va produire du dioxyde de carbone et des amines. L'alcalinité des amines est importante et le virage de l'indicateur de pH sera obtenu : le milieu restera violet.

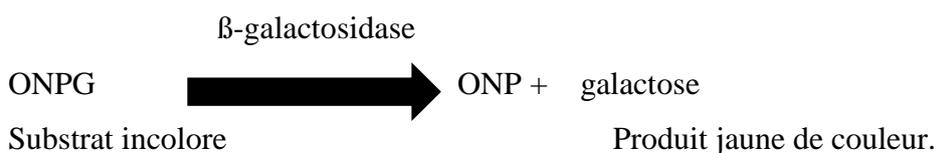
II-4-7-La recherche des enzymes

a/ la recherche de la β –galactosidase : Le test d'ONPG

- Principe

Le test ONPG (Ortho-Nitro-Phényl-Galactopyranoside) ou test de l'ONPG-hydrolase est complémentaire, voir indispensable, à l'étude de la dégradation du lactose chez les Entérobactéries. Pour que des entérobactéries dégradent le lactose, il faut qu'elle possède deux enzymes :

- Une perméase membranaire, nécessaire à la pénétration du lactose dans la cellule.
- Une β -galactosidase permettant de dégrader la molécule de lactose en galactose et glucose. Le test ONPG consiste à rechercher la présence de β -galactosidase. On utilise comme substrat, non pas le lactose, mais un autre β -galactoside : l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) qui possède une structure analogue au lactose ; et qui présente l'avantage d'être Hydrolysé en l'orthonitrophénol : ONP qui est responsable de la coloration jaunâtre de milieu Selon la réaction suivante :



- Technique

Préparer une suspension dense d'une culture bactérienne à étudier dans un tube à essai stérile contenant 0.5ml d'eau distillée, puis y ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque ONPG. Incuber au bain marie à 37°C pendant un temps variant entre 15 à 30 minutes et jusqu'à 24h au maximum.



Figure 10 : Le test ONPG.

- Lecture

La lecture se fait à des intervalles de temps différents : après 15mn, 30mn, 1 heure, 6 heures et 24 heures.

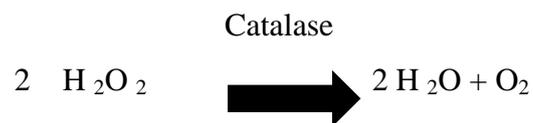
-Si la bactérie hydrolyse l'ONPG en ONP : la couleur du produit est jaune. On dit que la bactérie possède la β -galactosidase. Donc elle est ONPG +.

-S'il n'y a pas de coloration. On dit que la bactérie ne possède pas la β -galactosidase. Donc elle est ONPG -.

b/ Le test de la catalase

- Principe

La catalase est un enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) avec dégagement d'oxygène selon la réaction suivante :



Le test consiste à mettre des bactéries en quantité suffisante en contact de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Si elles possèdent la catalase, elles dégradent l' H_2O_2 en eau et dioxygène visible par la formation de bulles.

- Technique

- Sur une lame propre et sèche déposer une goutte eau oxygénée à 10 volumes à l'aide d'une pipette pasteur boutonnée.

- Observer immédiatement.



Figure 11 : Test de Catalase.

- Lecture

Le dépôt des colonies isolées dans le milieu d'eau oxygéné à 10 volumes a révélé l'apparition des bulles d'air dégagement gazeux de dioxygène à la surface. Ce résultat positif indique la présence d'une catalase. La bactérie possède la catalase, elle est catalase +.

- Pas de bulles, Elle est catalase –.

c/ Test d'oxydase

- But

Ce test est à la base de l'identification des bactéries Gram -. Il permet de mettre en évidence une enzyme la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé.

- Principe

Ce test permet de mettre en évidence une enzyme la phénylène diamine oxydase des bactéries à partir de leur culture en milieu gélosé. Cette enzyme est capable d'oxyder un réactif : le N diméthyl paraphénylène diamine en une semi-quinone colorée en rouge violacée. Ce réactif est incolore et en présence d'enzyme, il libère un composé rose-rouge noircissant à l'air.

- Technique

Ce test est réalisé en ajoutant un disque d'oxydase à une suspension bactérienne épaisse en eau distillée.

Sur une lame propre, déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-paraphénylène-diamine. Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile. Un excès d'eau peut nuire à la lecture. À l'aide d'une anse de platine prendre une colonie de la bactérie à identifier et la déposer sur le disque.



Figure 12 : Test d'Oxydase.

-Lecture

Les colonies des isolats déposées sur le disque de l'oxydase révèlent l'apparition d'une coloration rose. Ce qui indique la présence d'une oxydase. Donc La bactérie possède l'activité oxydase, elle est oxydase+.

- Si la colonie reste incolore, la bactérie ne possède pas d'oxydase. Elle est Oxydase -.
La technique d'ensemencement de chaque milieu est présentée dans le tableau 03.

Tableau 03 : Indentification biochimique à l'aide de la galerie biochimique.

Tests	Ensemencement
TSI	Ensemencement de culot par piquer centrale et la pente par des stries serrées à l'aide de la pipette pasteur, incubation à 37°C pendant 24 h.
Utilisation de citrate	Ensemencement par des stries le long de la pente à l'aide de la pipette pasteur, incubation à 37°C pendant 24 h.
test de mannitol mobilité	Ensemencement par pique centrale à l'aide d'une pipette pasteur, incubation à 37°C pendant 24.
Recherche de l'uréase et l'indole.	Ce milieu est inoculé avec quelques gouttes de la suspension bactérienne, incubation à 37°C pendant 24 h .après incubation nous l'avons ajouté 2à 3 gouttes de réactifs de kovacs.la lecture est immédiate.
Test TDA	Faire une suspension en milieu Urée-tryptophane, Etuver le tryptophane désaminase (TDA), après l'addition de réactif.
Test ONPG	- réaliser une suspension épaisse des bactéries testées en eau distillée.

	- ajouter avec une pince flambée mais refroidie un disque imprégné d'ONPG, incubé 30 min à 37°C.
Test VP	Ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse). Incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation, Attendre quelques min à 1 heure.
Test RM	Ensemence par l'ajout de quelques gouttes de la suspension bactérienne, incubation à 37°C pendant 24 h. après incubation, nous l'avons ajouté 2 à 3 gouttes de réactifs de rouge de méthyle. la lecture est immédiate.
Test oxydase	l'aide de disques prêts à l'emploi, imprégnés du réactif : N-diméthyl paraphénylène diamine, sur lequel nous avons déposé une colonie. La lecture du résultat était immédiate et sans incubation.
Test de la catalase	l'aide d'une pipette boutonnée une colonie est prélevée à partir de la boîte de Pétri et déposée sur une lame. Une goutte de H ₂ O ₂ (10 volumes) est déversée sur cette colonie.
Décarboxylase ODC, LDC, ADC	Ensemencer le milieu de Moeller avec des colonies. Agiter (si le tube n'est pas plein le recouvrir de vaseline stérile). Fermer le tube entièrement afin de créer une anaérobiose relative. Mettre à l'étuve 24 heures à 37°C.

II-5- Réalisation de l'antibiogramme

II-5-1-Principe

L'antibiogramme par diffusion permet de déterminer la sensibilité des bactéries à croissance rapide vis-à-vis d'un disque d'antibiotiques. Des disques imprégnés d'antibiotiques sont déposés à la surface d'un milieu de culture standardisé (milieu de Mueller-Hinton) préalablement ensemencé avec une dilution calibrée de la bactérie à tester. L'arrêt de la croissance à distance du disque se produit en présence de la concentration minimale inhibitrice de l'antibiotique. Nous avons utilisé la technique de diffusion en gélose. Cette méthode est basée sur le principe de correspondance entre les valeurs critiques des CMI en mg/l et des mesures des diamètres d'inhibition.

II-5-2- Technique**- Milieu de culture**

On utilise un milieu non sélectif Mueller-Hinton. L'épaisseur de la gélose doit être strictement de 4 mm, quelles que soient les dimensions et la forme de la boîte de Pétri utilisée. Les boîtes ont été séchées à 37 °C avant leur emploi.

- Réalisation de l'inoculum bactérien

Il est impératif de travailler sur une souche pure. L'identification et l'antibiogramme sont réalisés à partir d'une même suspension originelle. La suspension bactérienne est obtenue en mettant une colonie bien isolée dans 10 ml d'eau distillée stérile suivie d'une agitation.

- Ensemencement par inondation

Quelques ml de l'inoculum sont versés de façon à recouvrir entièrement la surface gélosée. Des mouvements de rotation dans les trois axes, imprimés par la main accélèrent le recouvrement puis à sécher pendant 15 min à l'étuve.

Application des disques Les disques d'antibiotiques en cartouches sont disponibles. Après 15 min de séchage, les disques choisis sont posés soit à la pince flambée, soit à l'aide d'un distributeur de disques périodiquement désinfecté. Les disques sont appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose.

- Choix des antibiotiques

Dans notre étude, les antibiotiques utilisés sont :

- L'ampicilline, Amoxicilline-acide clavulanique, Ticarcilline, Céfoxitine, Céfazoline, Céfotaxime, pour les β -lactamines.

- Imipenèmes pour les carbapénèmes.
- Amikacine, Gentamicine pour les aminosides.
- Ciprofloxacine, Acide nalidixique pour les quinolones.
- Sulfaméthoxazole + Triméthoprime.
- Colistine.
- Chloramphénicol.

L'ensemble est déposé à l'étuve pendant 18 à 24 heures à 37 °C.

- Lecture

Après incubation on procède à la lecture des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique à l'extérieur de la boîte fermée.

-Le diamètre des zones d'inhibition est interprété en sensible, intermédiaire ou résistant conformément aux recommandations du comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie.

Comparer ces résultats aux valeurs critiques et les Classées dans l'une des catégories :

Sensible : les souches S sont celles pour lesquelles la probabilité de succès thérapeutique est acceptable. On doit s'attendre à un effet thérapeutique dans le cas d'un traitement à dose habituelle par voie générale.

Résistante : les souches R sont celles pour lesquelles il existe une forte probabilité d'échec thérapeutique. On ne peut s'attendre à un effet thérapeutique quel que soit le traitement.

Intermédiaire : les souches I sont celles pour lesquelles le succès thérapeutique est imprévisible. Elles forment un ensemble hétérogène pour lequel la seule valeur de la CMI n'est pas prédictive.

II-6- Mutagénèse

II-6-1 - But de l'irradiation par les rayons UltraViolets (UV)

Les rayons ultraviolets appelés couramment UV, sont un rayonnement électromagnétique de même nature que la lumière visible mais dont les longueurs d'onde sont inférieures et donc non perceptible par l'œil. Cette expérience permet d'illustrer clairement les effets néfastes des UV sur la multiplication des souches *Proteus mirabilis*.

II-6-2- La technique

On prélève une colonie de *Proteus mirabilis* à l'aide d'une pipette pasteur fermée et stérilisée et on la dépose dans 5ml de bouillon nutritif puis l'incuber dans l'étuve à 37°C pendant 24 heures **Figure 13 (a)**.

- La dilution

-On prépare 05 tubes à essai stériles, on met dans chacun 9ml de l'eau distillé **Figure 13 (b)**.

- à l'aide d'une pipette graduée de 5 ml. Prendre 1ml de la suspension bactérienne et la verser dans le premier tube. Agiter délicatement pour homogénéiser la suspension.

-Prendre 1ml de la suspension de tube 1 et la mettre dans le deuxième tube, agiter.

-Reprendre 1ml de la suspension du deuxième tube et la renverser dans le troisième tube, agiter.

-Reprendre 1ml de la suspension du troisième tube et la renverser dans le 4 ème tube, agiter.

-Reprendre 1ml de la suspension du quatrième tube et la renverser dans le 5 ème tube, agiter.

- L'étalement

-A l'aide d'une pipete Pasteur. On prend une goutte de la suspension du 5^{eme} tube diluée et on réalise l'étalement à l'aide d'un râteau stérile sur la boîte qui contient la GN (la boîte Témoin).

- On refaire les même étapes pour ensemencée les 4 autres boîtes pour l'irradiation

- L'irradiation

-Allumer la lampe UV (UVsl , 25/ long wave) .

- Mettre une boîte sous les UV. Enlever le couvercle. Enlever vos mains de dessous les UV et déclencher le chronomètre **Figure 13 (c)**.

- Après 10 secondes, remettre le couvercle et enlever la première boîte des UV.

- On marque 10 secondes sur le dos de la boîte.

- N'exposer pas la boîte à une trop forte intensité de lumière visible après la mutagenèse afin d'éviter la photoréversion **Figure 13 (d)**.

- Refaire la même étape en exposant les autres boîtes pendant 30, 50, 90 secondes respectivement. Marquer les durées d'exposition aux UV aux dos des boîtes.

- La première boîte ne sera pas exposée aux UV (marquer 0 seconde au dos de celle-ci). Il s'agit du témoin de l'expérience.

- Incuber les boites à l'envers pendant 24 H à 37°C (ou éventuellement).

- la lecture selon le nombre de colonies dans chaque boîte.

**(a)****(b)**



(c)

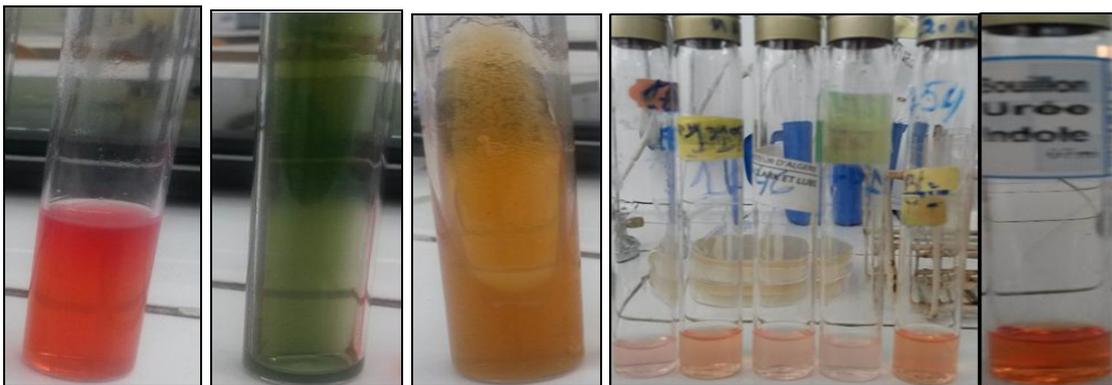
(d)

Figure 13 : Les étapes de la mutagenèse d'une souche de *Proteus mirabilis*.

II-7- La galerie biochimique après la mutagenèse

II-7-1- Méthode

-Refaire la galerie biochimique en suivant le même protocole précédant pour chaque milieu.



(a)

(b)

(c)

(d)

Figure 14 : Test Manitol/ Mobilité (a) - Citrate de Simmons (b) –TSI (c)- Urée /Indole (d).



Figure 15: Test TDA.



Figure 16: Test ONPG.

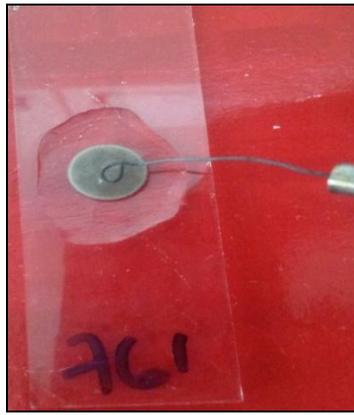


Figure 17: Test d'oxydase.



Figure 18: Test de catalase.



(a)

(b)

(c)

(d)

Figure 19: Test ODC (b) -LDC (c) -ADH (d) .



(a)

(b)

Figure 20: Test RM (a), VP (b).

Résultats et Discussions

I - Distribution des souches de *Proteus mirabilis*

Durant la période d'étude, 20 souches de *Proteus mirabilis* ont été colligés :

I-1- Selon l'origine du prélèvement

Les résultats illustrés ci-dessous montrent que tous les souches étudiés sont des souches hospitalières.

Tableau 04 : Répartition des souches de *Proteus mirabilis* selon les prélèvements Cliniques.

Prélèvement	Nombre de souches isolées	Pourcentage (%)
Urine	12	60%
Pus	7	35%
Sonde vésical	1	5%
Totale	20	100%

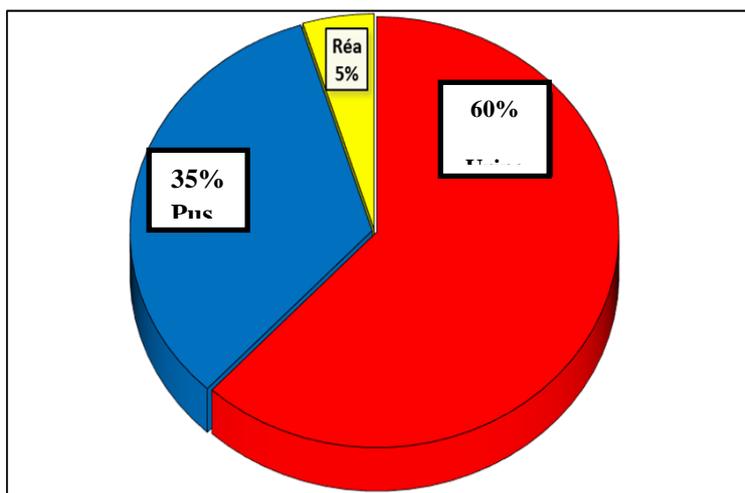


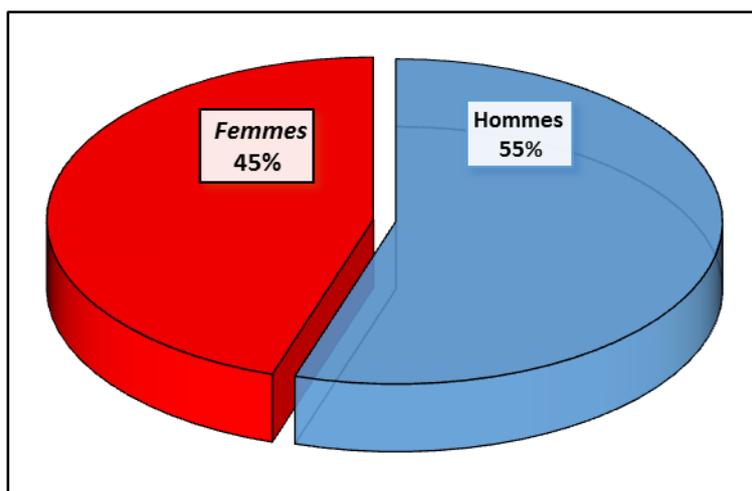
Figure 21 : Répartition des souches *Proteus mirabilis* selon l'origine du prélèvement.

Nous avons remarqué que parmi les souches de *Proteus mirabilis* étudiés dans les différents sites pathologiques : 60% proviennent des prélèvements d'urine. Elle est suivie par les prélèvements de pus avec 35% des cas et 5% ont été diagnostiquées dans service de réanimation a partie de sonde vésicale. Ces valeurs correspondent aux rapports de la littérature, où les prélèvements urinaires sont toujours dominants.

I.2/ Selon le sexe

Tableau 05 : Répartition globale des souches de *Proteus mirabilis* selon le sexe.

Sexe	Effectif	Pourcentage (%)
Femme	9	45%
Homme	11	55%
Totale	20	100%

Figure 22 : Répartition globale des souches de *Proteus mirabilis* selon le sexe.

Parmi les 20 souches isolées, 09 de sexe féminin présentaient un pourcentage de 45% et 11 de sexe masculin présentaient un pourcentage de 55%. Donc On peut remarquer une dominance des souches isolées chez les hommes par rapport à celle des femmes.

II - Les caractères culturaux

II-1- Examen macroscopique

Les résultats de ré-isolément des 20 souches étudiées (après incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C), montrent l'apparition des souches de *Proteus mirabilis* sur milieu en Hécktoen présentant les caractères morphologiques suivants : de petites colonies rondes, transparentes avec un centre noir envahissantes. Montrant des vagues successives avec une odeur désagréable. Ces caractères culturaux correspondent au *Proteus mirabilis*.



Figure 23 : Aspect macroscopique des colonies de *Proteus mirabilis* sur gélose Hecktoen.

II-2- Examen microscopique

L'examen microscopique nous a permis l'identification de la pureté des souches. Et La coloration de Gram, réalisée à partir des colonies apparues. Montre la présence de bactéries Gram négatif. Elles se présentent sous la forme de bacille droit ou diplobacilles colorées en rose. Ce sont les caractères morphologiques *Proteus mirabilis* sous microscope optique.

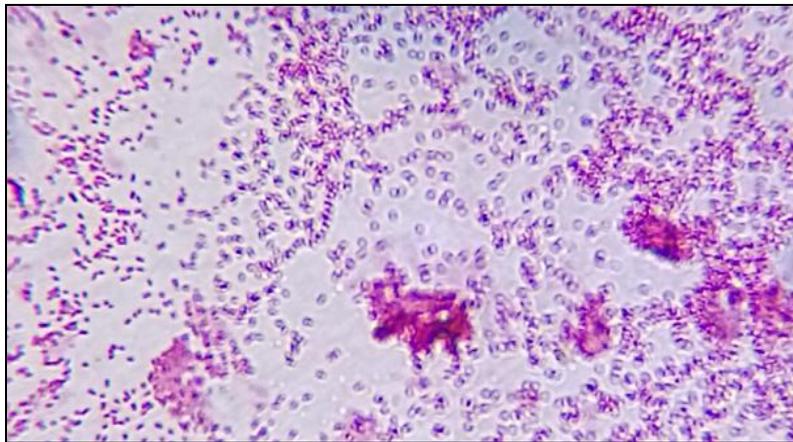


Figure 24 : Aspect microscopique des colonies de *Proteus mirabilis* (G * 100).

III- Les caractères biochimiques

III-1-Résultats de la galerie

La mini galerie biochimique nous a permis d'identifier quelques caractères biochimiques de *Proteus mirabilis*. Le tableau 06 montre la couleur des milieux de culture avant la manipulation par les souches. Les figures montrent les résultats de la galerie biochimique d'une souche *Proteus mirabilis*.

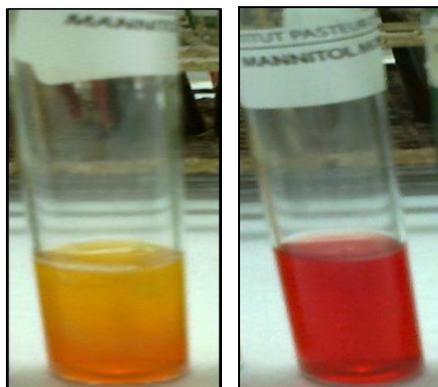
Tableau 06 : Couleur d'origine des milieux de la galerie biochimique.

Citrate de Simmons	TSI	Mannitol mobilité	Urée indole	TDA	RM	VP	ODC-LDC-ADH
Vert	Rouge orange	Rouge	Orange	Jaune	rouge	rosé ou rouge	Violet

III-1-1-Le milieu mannitol mobilité

- Fermentation du mannitol

Les résultats obtenus montrent que parmi les 20 souches étudiées ,19 souches sont incapables de fermenter le mannitol et de l'utiliser comme source de carbone et d'énergie donc elles sont mannitol (-) **figure 25 (b)**. Ces résultats sont incompatibles avec ceux obtenus par les travaux de Meziane. 2012. Sauf une seule souche qui représente un résultat positif pour l'utilisation du mannitol **figure 25 (a)**.



(a)

(b)

Figure 25 : Aspect du milieu mannitol.

- La mobilité

D'après notre étude. Nous avons obtenu des résultats positifs concernant le test de mobilité avec toutes les souches qui sont diffusées à partir de la ligne verticale d'ensemencement en créant un trouble, **figure 26**. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par Meziani. 2012.



Figure 26 : Aspect du milieu de Mobilité.

III-1-2-Le milieu Citrate de Simmons

Après 24 h d'incubation .On a remarquées qu'il n'y a pas une alcalinisation du milieu, la couleur du milieu reste verte. C'est ce qui ont été observé pour toutes les souches, **figure 27** .Donc elles sont citrate (-), elles sont dépourvus de citrate perméase et par conséquent cette bactérie est incapable d'utilisé le citrate comme seule source de carbone, notant que ce dernier est le premier composé du cycle de Krebs. Nos résultats sont non convenables à celle observé par Meziani. 2012.



Figure 27 : Aspect du milieu Citrate de Simmons.

III-1-3- Le milieu TSI

C'est un milieu coulé en pente et en culot, au niveau du quelle nous avons recherché 4 caractères :

- La fermentation du Glucose sur le culot qui se traduit par virage au jaune.
- La fermentation du saccharose et Lactose sur la pente également qui se matérialise par virage au rouge.
- La présence de gaz qui se matérialise par le décollement du culot et/ou la présence de bulles d'air.
- La production de H₂S qui se traduit par une coloration noire.

Après l'incubation. On a remarqué pour toutes les souches, il y a eu une acidification dans la pente et le culot d'où le virage du rouge de phénol au jaune avec présence des bulles d'air. La fragmentation du Glu est due à la production de gaz (hydrogène, CO₂) résultant des fermentations sucrées et la production de sulfure d'hydrogène. Qui se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire (noircissement) de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique de noircissement, donc ces souches sont : lactose et saccharose (-), glucose (+), gaz (+), H₂S(+). Alors que pour une seule souche, il y a eu une acidification que dans la pente, avec présence des bulles d'air et absence de noircissement donc la souche est lactose et saccharose (+), glucose (-), gaz (+), H₂S (-).

Les résultats obtenus montre que l'espèce *Proteus mirabilis* a fermenté le glucose avec production de gaz et H₂S, mais elle n'a pas fermenté ni le lactose ni le saccharose. Nous avons donc trouvé le même profil biochimique concernant la gélose TSI comme signalé par Delarras en 2007.



Glu +/ H₂S +/Gaz + H₂S - Lac / Sacch -

Figure 28 : Aspect du milieu TSI.

III-1-4 -Recherche de l'activité uréasique

- **Uréase**

La production d'uréase se matérialise par un changement de la coloration orange vert le rose, du fait de l'alcalinisation du milieu. En utilisant le milieu Urée-Indole pour rechercher cette enzyme. Nous avons obtenu les résultats suivant : La plupart des souches étaient urée (+) car il y a eu une alcalinisation du milieu d'où le virage de couleur de l'orange vers le rose, donc l'urée est transformé en carbonate d'ammonium. Ce résultat indique la présence d'une activité uréasique très intense chez les souches. Ce qui confirme leur appartenance à l'espèce *Proteus mirabilis*. Alors que seules 2 souches

(P12 - P14) étaient urée (-) car il n'y a pas eu un virage de couleur. Cela s'explique par l'absence de l'enzyme de l'uréase chez les 2 souches.

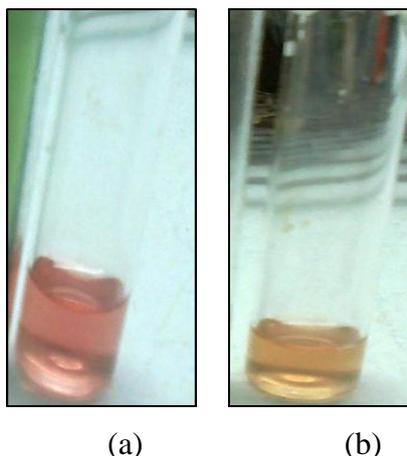


Figure 29 : Aspect du milieu Urée-indol, (a) pour positive et (b) pour négative.

- **Recherche de la production d'indole**

Notre étude nous a permis de distinguer des souches qui ont donné une réaction positive avec le test indole après l'ajout de réactif Kovacs. Formation d'un anneau rouge en surface. Par contre, ce n'était pas le cas pour les autres souches étudiées. (Le Minor 1993).

L'indole est obtenu de la dégradation du tryptophane, grâce à une enzyme bactérienne « la tryptophanase ». L'indole est apolaire, donc soluble dans les solvants organiques et réagit fortement en milieu acide avec le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde contenus dans le réactif de Kovacs et forme un anneau rouge, ce qui est le cas pour plupart des souches et non pas pour le reste des souches (P7-P8-P11-P12-P18) qui ont dépourvus de la tryptophanase. Les résultats obtenus sont en conformité avec ceux de Souna en 2011 et Meziane en 2012.

- **Recherche du tryptophane désaminase (TDA)**

Après l'addition du réactif TDA. On a remarqué l'apparition d'une coloration brun foncé pour toutes les souches. Ce qui montre que la bactérie *Proteus mirabilis* est TDA (+) **figure 30**.

La tryptophane-désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant l'acide pyruvique. Ce dernier donne avec le perchlorure de fer (FeCl_3) une coloration brune. Cette réaction a été constaté pour la souche *Proteus mirabilis* ce qui prouve que cette dernière possède une tryptophane-désaminase. Les résultats obtenus du test TDA avec souches sont compatibles avec ceux de Souna en 2011.



Figure 30 : Aspect du milieu TDA, Test positive.

III-1-5- Le milieu Clark et Lubs

Ce milieu permet d'étudier la voie de fermentation du glucose et la production d'acétoïne, de dyacétyl et de butanediol.

- Rouge de méthyle (RM) : Il permet de détecter la production d'acides plus ou moins forts et plus ou moins volatiles au cours de la fermentation.
- La réaction de Voges Proskauer (VP) : s'est fait sur le milieu Clark et Lubs permet de détecter la production d'acétoïne, de dyacétyl et de butanediol par une réaction colorée à partir de la fermentation du glucose.

Nos résultats montrent que toutes les souches étaient VP négatif car après ajouts des réactifs VP1 et VP2, il n'y a pas eu de réaction (pas de coloration) **figure 31 (a)**. Concernant le test RM. Les souches sont RM positifs car le milieu est devenu rouge après l'addition du réactif de rouge de méthyle, **figure 31 (b)**. Donc l'espèce de *Proteus mirabilis* fermente le glucose en produisant de nombreux acides organiques plus ou moins forts par la voie des fermentations acides mixtes. Cette distinction des deux voies peut justifier une règle parfois contestable mais fréquemment vérifiée. Les bactéries VP + sont toujours RM -, les bactéries RM + sont VP -. D'après notre étude. Nos résultats sont en parfait accord avec ceux décrits par les auteurs Denis et al. 2007.

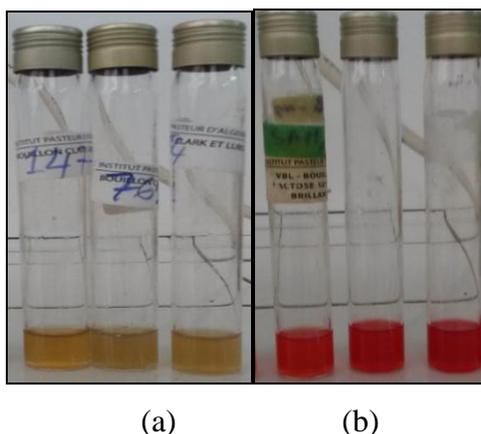


Figure 31 : Aspect du milieu pour le test VP(a) et RM(b).

III-1-6- La recherche des enzymes

• La recherche des Décarboxylase ODC, LDC, ADH

Les enzymes décarboxylases (LDC, ODC) et décarboxylase, dihydrolase (ADH) utilisées dans la galerie biochimique réalisée pour l'identification des souches bactériennes isolées, présentent toutes un intérêt taxonomique. Pour la recherche de ces enzymes, nous avons utilisé les milieux de Moeller, contenant l'acide aminé étudié (soit la lysine soit l'ornithine, soit l'arginine) du glucose et un indicateur coloré c'est le bromocrésol pourpre. La réaction s'effectue en deux temps lorsque le glucose est fermenté. Il y a virage au jaune du bromocrésol pourpre, lorsque l'acide aminé est décarboxylé. Il y a une réalcalinisation du milieu qui vire au violet.

Après avoir effectué les tests et l'incubation, Nous avons obtenu les résultats suivants :

Le milieu de Moeller, Témoin reste obligatoirement Jaune, **figure 32 (a)**.

- ODC : couleur violet, **figure 32 (b)**.
- LDC – ADH : couleur jaune, **figure 32 (c)**.
- LDC – ADH : couleur violet, **figure 32 (d)**.

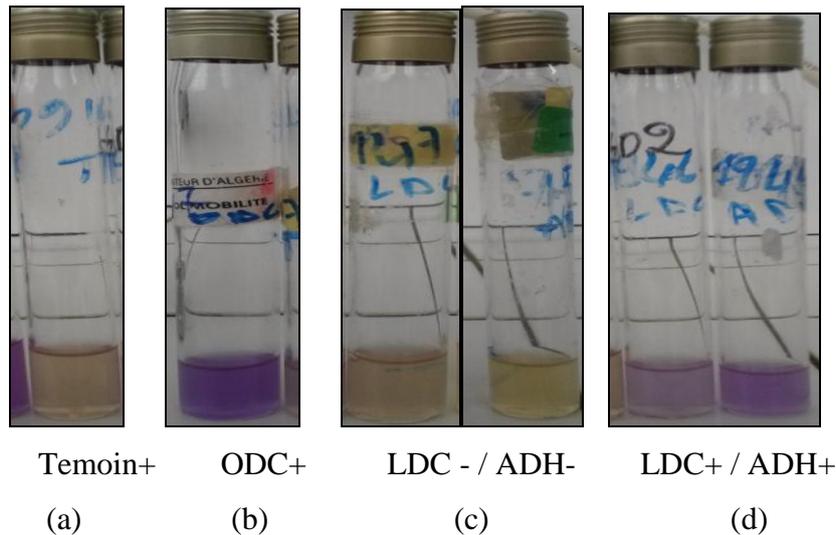


Figure 32 : Aspect du milieu ODC – LDC – ADH.

- Le test ODC : Les souches présentent une réaction positive car le milieu reste violet. Veut dire que toutes les souches douées d'une décarboxylase pour l'acides aminé (ODC+), **figure 32 (b)**.
- Le test ADH- LDC : Les souches dans les milieux de Moeller ADH et LDC ont changé de couleurs et sont devenus jaunes, donc sont négatifs car les milieux sont devenus acides, il aurait fallu avoir une ré-alcalinisation, **figure 32 (c)**. Donc toutes les souches sont décarboxylase (-). Par contre une seule souche qui donne un résultat négative pour LDC-ADH, la couleur reste violet.

- **Le test d'ONPG :**

Toutes les souches *Proteus mirabilis* ont donné un résultat négatif avec le test ONPG c'est-à-dire le milieu restait incolore ONPG (-).



Figure 33 : Aspect du milieu avec le test ONPG.

Un test ONPG positif montre que l'organisme qui est testé contient les enzymes nécessaires à la fermentation du lactose et peut donc être classé comme un lactose fermenteur. Dans notre étude, nous avons observé le caractère lactose (-) chez les souches *Proteus mirabilis* qui sont incapables de scinder le lactose en glucose et galactose et libérer l'orthonitrophénol soluble qui donne la coloration jaune, **figure 33**. La réaction ne peut être possible qu'en présence d'une autre enzyme intracellulaire la β -galactosidase, également intracellulaire, la β -galactoside perméase qui assure la pénétration du lactose dans la cellule bactérienne et par conséquent sa fermentation. En comparant nos résultats avec ces données, nous pouvons déduire que nos résultats obtenus avec le test ONPG chez *Proteus mirabilis* sont corrects. Dans notre travail, la souche de *Proteus mirabilis* est ONPG (-), ces résultats sont vérifiés par ceux notés par Denis et al. 2007.

- **Le Test de la catalase**

Après avoir effectué le test catalase. Toutes les souches que nous avons analysées sont des catalases positives, dont la présence de la catalase se matérialise par la production de bulles d'air, **figure 34**. Ces résultats sont confirmés par Khan et al. 2011 qui montrent que les Entérobactéries que nous avons analysées sont des catalases positives.

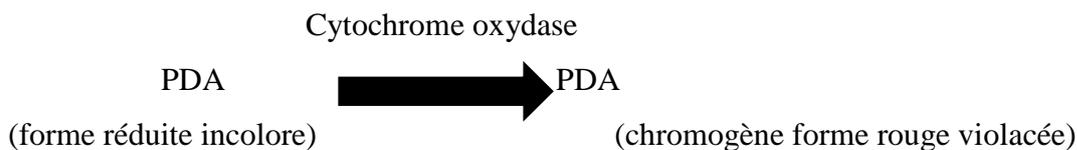


Figure 34 : Test de catalase.

- **Le test de l'oxydase**

Ce test est essentiel pour orienter l'identification des bacilles Gram négatif. Est un bon contrôle pour les bactéries appartenant à la famille des Enterobacteriaceae, car elles sont toutes oxydases négatives. La réaction positive s'est traduite par l'apparition d'une coloration violette pour les Gram - à l'endroit où la colonie a été déposée soit immédiatement, soit quelques secondes après. Si la bactérie possède l'enzyme

respiratoire, appelée le cytochrome oxydase (dernière enzyme de la chaîne), elle peut faire la réaction suivante :



En réalisant ce test, nous avons obtenu des résultats conformes à ceux rapportés par Delarras, 2007 qui prouvent que nos souches *Proteus mirabilis* sont oxydase négatives et elles ne possèdent pas l'enzyme respiratoire, **figure 35**. En comparant nos résultats avec ceux rapportés par Le Minor en 1989. Nous pouvons dire que notre identification par rapport à ce caractère biochimique a été excellente, nous avons trouvé presque les mêmes résultats.



Figure 35 : Test de l'oxydase.

D'une manière générale, d'après notre étude et la série de tests biochimiques que nous avons réalisés, nos résultats montrent qu'ils sont dans la majorité des cas stables et intéressants pour l'identification bactérienne. Après l'incubation, les résultats finaux de la galerie biochimique classique sont présentés dans le tableau 07.

Tableau 07 : Caractères biochimiques des souches *Proteus mirabilis* étudiées.

	Glu	lac	Sacc	Urée	Indole	citrate	Mannitol	Mobilite	Gaz	H ₂ S
P1	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
P2	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+

P3	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P4	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
P5	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
P7	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
P8	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
P9	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P10	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P11	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
P12	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
P13	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
P14	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+
P15	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P16	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P17	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P18	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P19	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+
P20	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+

Test	TDA	RM	VP	ONPG	catalase	oxydase	ODC	LDC	ADH
Proteus	+	+	-	-	+	-	+	-	-

+ : Positif - : Négatif

III-2-Résultats de l'antibiogramme

Comme nous l'avons mentionné précédemment, chaque souche identifiée a été soumise à un antibiogramme afin de déterminer la sensibilité aux différentes bactéries. Pour rappel les 14 molécules d'antibiotiques appartenant à des familles différentes dont les β -lactamines, les aminosides, les quinolones, et la colistine, un phénicol : le chloramphénicol et les sulfamides. Les résultats de la mesure du diamètre des zones d'inhibition basée sur la standardisation CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques sont repris au tableau (Annexe05).

Cette étude a été effectuée sur un collectif de 20 souches de bacilles à Gram négatif *proteus mirabilis*. Il apparaît dans nos résultats que les souches montrent une résistance et une sensibilité aux plusieurs antibiotiques actuellement utilisés dans les traitements.

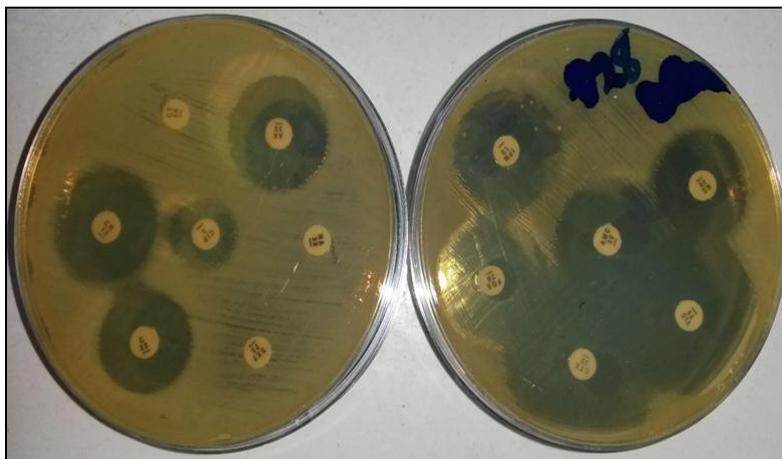


Figure 36 : Antibiogramme d'une souche *Proteus mirabilis* étudiée.

Selon la figure chez *Proteus*, on rapporte généralement une diminution des taux de résistance aux antibiotiques : Ampicilline (75%), Ticarcilline (70%), Amoxicilline + acide clavulanique (60%), Colistine (55%), Céfazoline (50%), Triméthoprim / Sulfaméthoxale (45%), Chloramphénicol (35%), acide nalidixique (30%), Amikacine (30%), céfoxitine (20%), Gentamicine (20%), Ciprofloxacine (10%) et Céfotaxime (5%) Imipinem (5 %).

A partir des résultats obtenus, toutes les souches étudiées ont montré une résistance élevée à tous les antibiotiques de la famille B-lactamines testés. L'AMP et la TIC présentent une bonne activité sur les souches de *Proteus mirabilis* avec une résistance totale 70% - 75% respectivement. Elle est due à une résistance naturelle des souches à cet antibiotique. En revanche nos résultats s'éloignent de ceux mentionnés par France et

Mahamat en 2006 notant un pourcentage de 59% pour l'AMP et 48% pour TIC suivi par L'association Amoxicilline-Acide clavulanique (AMC) qui présente un taux de résistance de 60% .

Concernant la Céfazoline (CZ) et le Céfotaxime (FOX) présentent des taux de résistance respectivement de 50% et 20% mais la Céfotaxime beaucoup plus faible que Céfazoline.

À l'exception de l'Imipinèm (IMP) et la Cefoxitine (CTX). Les souches présentent une très faible résistance avec un taux de 5%. Donc une excellente activité est enregistrée pour ces derniers .Ces résultats indiquant clairement que CTX et IMP sont les molécules les plus efficaces sur les souches étudiées. Elle est due à sa sensibilité naturelle pour ces molécules, ceci se conforme avec d'autre donnée en 2006 par Avril. Selon Kassama, la majorité des Entérobactéries étaient sensibles à l'imipénème indiquant sa place en premier choix dans le traitement des infections sévères à bactéries multi résistantes. Nos résultats sont relativement très proches de ceux mentionnés par Kassama et al en 2013.

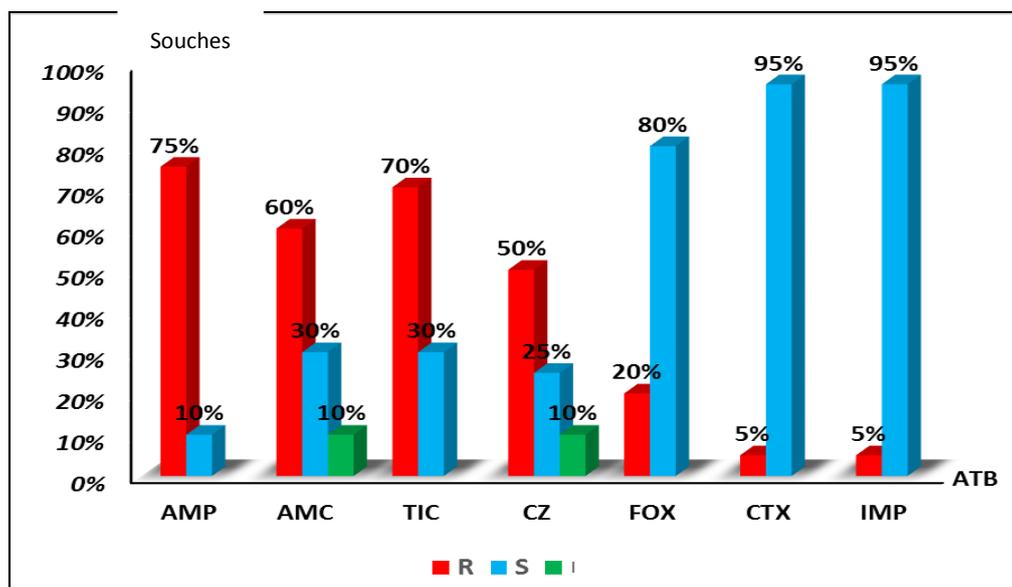


Figure 37 : Pourcentage de résistance et la sensibilité de *Proteus mirabilis* aux β -lactamines.

En ce qui concerne les Aminoglycosides. On remarque que le taux le plus important a été observé pour CS et SXT qui restent toujours moins actif sur la bactérie avec un taux de 55 % et 45% respectivement. Suivi de l'Amikacin et l'Acide nalidixique (quinolone de 1ere génération) sont toutefois moins efficaces avec 30% de souches résistantes. Nos

résultats sont identiques que celles de Pearson et Dance. *Proteus mirabilis* a une résistance naturelle à colistine (spécificité de l'espèce mirabilis) (Pearson et al., 1987).

Un point très important a été remarquée vis-à-vis de la Gentamicine. Soit 20%, en tenant compte que cette molécule est moins active sur les espèces de *Proteus* (Cattoir, 2006). Donc une sensibilité totale est enregistrée pour ce dernier Alors qu'une activité plus faible a été observée vis-à-vis du Ciprofloxacine avec un taux de 20%. Nos résultats non conforme aux travaux de Danielle Clave et Kassama en 2013. Qui rapportent des taux de résistance plus élevés pour les quinolones de 100% (Danielle Clave, 2013).

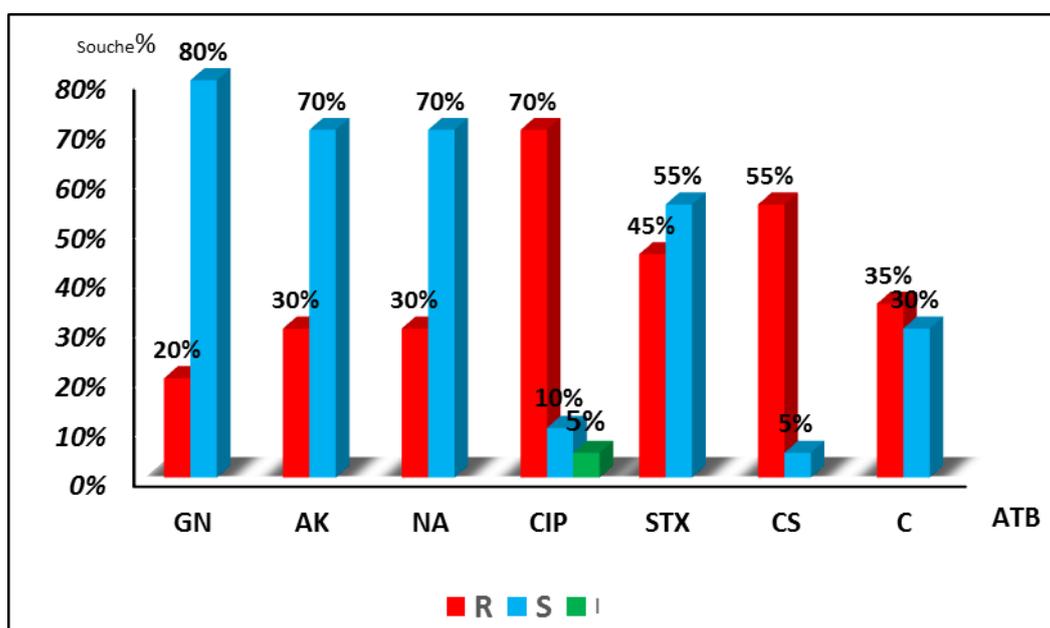


Figure 38 : Taux de résistance et la sensibilité de *Proteus mirabilis* aux autres antibiotiques.

IV – Résultats de la mutagénèse

Après l'exposition des souches aux UV et après incubation à l'étuve pendant 24 heures à 37°C. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 38.

En comparant les boîtes irradiées avec la boîte témoin. Après 24h d'incubation et observation des boîtes on remarque que la boîte irradiée pendant 20 secondes contient des colonies de *Proteus mirabilis* avec un nombre réduit par rapport au nombre sur la boîte témoin. Alors que la boîte irradiée pendant 40 secondes contient un nombre plus réduit que la dernière à chaque fois on expose la boîte aux UV. Donc les UV ont un effet létal sur la survie des bactéries. A chaque fois qu'on augmente le temps d'exposition on obtiendra un nombre limité de colonies. On peut dire donc que les souches *Proteus*

mirabilis sont plus sensibles aux UV et que leur survie après irradiation dépend du temps d'exposition aux rayons.

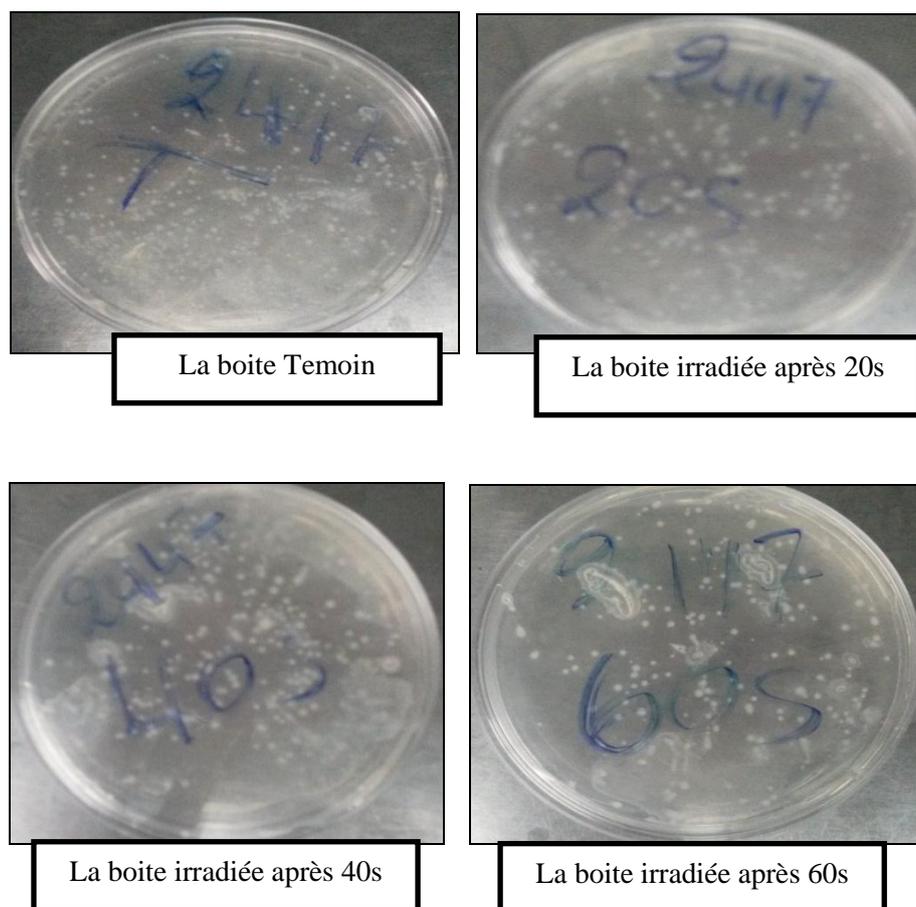


Figure 39 : Les colonies d'une souche *Proteus mirabilis* après irradiation.

V- Résultats de la galerie biochimique après mutagenèse

On a réalisé cette étape pour voir les caractères biochimiques sur 5 souches *Proteus mirabilis* étudiées après la mutagenèse. Nous n'avons pas grand-chose à signaler sauf qu'il y a des souches qui gardent leurs caractères biochimiques Par contre qu'il y a des souches qui changent leurs caractères à cause des UV. Dans ce cas on peut dire qu'il y a des mutations au niveau des gènes responsable de chaque caractère.

V -1- Test Mannitol-Mobilité

Nos résultat montrent que toutes les souches (S1, S2, S3, S4, S5) gardent leur pouvoir de mobilité et leurs incapacité de fermenter le mannitol .Donc elles sont Mobilité + / mannitol –.



Figure 40 : Aspect du milieu Mannitol Mobilité avec la souche mutante.

V -2- Test de Citrate de Simmons

Un résultat positif se manifeste par une alcalinisation du milieu qui devient bleu, c'est le cas d'une seule souche S1. Cette souche a utilisé le citrate comme seule source de carbone d'où le virage du vert au bleu **figure 40 (b)**. Alors que les souches S2, S3, S4, S5 ne provoquent aucun changement de couleur .Elles sont Citrate -, **figure 40 (a)**.

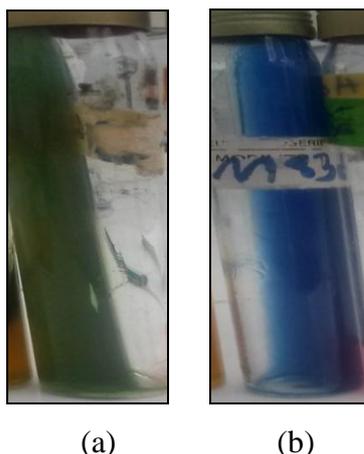


Figure 41 : Aspect du milieu citrate de Simmons avec la souche mutante.

V -3-Triple-Sugar- Iron (TSI)

Nos résultats montrent que toutes les souches de la mutagénèse dégradent le glucose mais ni le saccharose ni le lactose ne sont dégradés. Cette activité se manifeste par un changement de couleur de culot et la pente vers le Jaune sans dégagement du gaz. Tandis que les souches S1, S3 et S5 produisent l' H_2S . Alors que S2, S4 deviennent H_2S - et lac -/ Sacch-.

Remarque : Au cours de notre étude, nous avons trouvé que les souches *Proteus mirabilis* que nous avons analysées avant la mutagénèse ne fermentent ni le lactose ni le saccharose. Mais elles fermentent le glucose avec production de gaz et de l' H_2S .Tandis que parmi ces souches et après la mutagénèse on distingue des souches qui ont devenus

Lac- / Sacch - / H₂S - et gardent le même caractère pour la fermentation du Glu et la production Gaz.



Figure 42 : Aspect du milieu TSI avec la souche mutante.

V-4- Test Urée-indole

L'hydrolyse de l'urée est décelée par virage de couleur du milieu (orange vert rose). Une alcalinisation du milieu qui est observée chez les 5 souches testées S1, S3, S4 et S5, **figure 43 (a)**. Donc elles sont Uréase +. Concernant le test TDA, toutes les souches sont TDA+ **figure 43 (c)**.

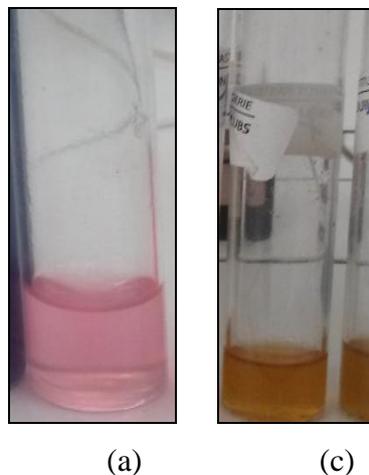


Figure 43 : Aspect du milieu Urée-indol- TDA avec la souche mutante.

V-5- Test de catalase et d'oxydase

Toutes les souches ont données une réaction négative avec le test de catalase et l'oxydase. Donc elles sont catalase +, **figure 44(b)**. Oxydase -, **figure 44 (a)**.

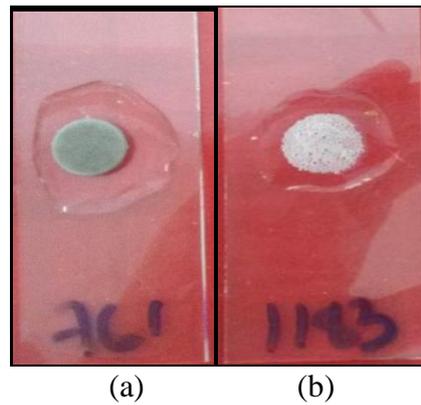


Figure 44 : Test de catalase (b) et Oxydase (a) avec la souche mutante.

V -6- Test ODC – ADH –LDC

Nos résultats montrent que toutes les souches présentent une réaction positive. Toutes les souches sont donc pourvues d'une décarboxylase pour les trois acides aminés (ADH+, LDC+, ODC+), **figure 45**. Donc elles sont décarboxylase (+).

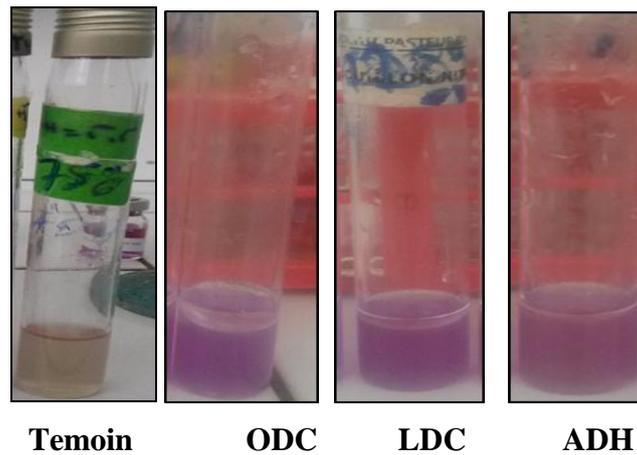


Figure 45 : Test ODC – ADH - LDC avec la souche mutante.

V -7- Test VP – RM- ONPG

1/ Tests VP : Toutes les souches testées sont VP-, **figure 46 (a)**.

2/ Réaction RM : Toutes les souches présentent une réaction RM+ veut dire que le milieu après incubation devient rouge, **figure 46 (b)**.

3/ Test ONPG : Toutes les souches testées sont ONPG -, **figure 46 (c)**.

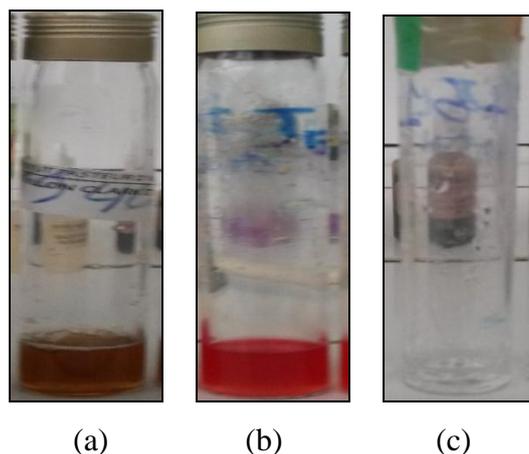


Figure 46 : Test VP (a)- RM(b)- ONPG(c) avec la souche mutante.

D'après notre étude et les tests biochimiques que nous avons réalisés après la mutagenèse, nos résultats finaux sont présentés dans le tableau 08.

Tableau 08 : Les caractères biochimiques des souches de *Proteus mirabilis* après la mutagenèse.

Tests		S1	S2	S3	S4	S5
TSI	Glu	+	+	+	+	+
	Lac/sacch	-	-	-	-	-
	Gaz	+	+	+	+	+
	H ₂ S	+	-	+	-	+
Mannitol	Mannitol	-	-	-	-	-
Mobilite	Mobilite	+	+	+	+	+
Citrate de Simmons		+	-	-	-	-
Urée Indole	Urée	+	+	+	+	+
	Indol	-	-	-	-	-
	TDA	+	+	+	+	+
Clark et Lubs	VP	-	-	-	-	-
	RM	+	+	+	+	+

Milieu Moeller	ODC	+	+	+	+	+
	ADH	+	+	+	+	+
	LDC	+	+	+	+	+
Oxydase		-	-	-	-	-
Catalase		-	-	-	-	-
ONPG		-	-	-	-	-

La mutagenèse par UV a révélé la sensibilité des souches étudiées. D'après nos résultats, les caractères biochimiques des souches mutées sont presque les mêmes que ceux des souches avant la mutagenèse sauf les tests suivants : ADH et LDC, l'utilisation de Citrate de simmonc et la production de H₂S.

Conclusion

Proteus mirabilis est le deuxième germe responsable d'infections urinaires par ordre de fréquence après *Escherichia Coli*. C'est une bactérie que l'on retrouve dans l'eau et couramment dans le tractus intestinal humain. Aujourd'hui elle est l'une des causes responsables d'infections nosocomiales sévères et difficiles à traiter. *Proteus mirabilis* peuvent être généralement présents chez les individus en bonne santé dans le cadre de la muqueuse normale. La bactérie devient un problème important surtout chez les personnes qui ont des systèmes immunitaires vulnérables et sont en danger de transmission nosocomiale, tels que les patients hospitalisés (Farkosh et al., 2008).

Le travail est effectué sur 20 souches du *Proteus mirabilis* isolées à partir de différents produits pathologiques au CHU de Constantine. Le pourcentage d'isolement de l'espèce à partir des prélèvements urinaires est plus important soit 60% de pourcentage. Dans notre étude, nous avons essayé de confirmer ou d'infirmer les caractères morphologiques et biochimiques des isolats qui confirment leurs appartenances à l'espèce *Proteus mirabilis*. Qui après l'isolement et l'identification, *Proteus mirabilis* a montré une morphologie d'un bacille à Gram négatif, très généralement mobile. Les caractères biochimiques suivants : Glu+, Lac/Sacch -, Urée / Indole+ , H₂S /Gaz + , Mobilité + , Mannitol - , et oxydase -, catalase + , VP- , RM+ , Citrate - , ONPG - , ODC + , LDC - , ADH - .

Notre travail qui a fait appel aux techniques de l'antibiogramme de *Proteus mirabilis*, d'établir leur profil de résistance/sensibilité vis à vis des antibiotiques couramment utilisés et montre qu'il existe un certain nombre d'antibiotiques qui ont été une fois efficace contre *Proteus mirabilis*. Un grand nombre de ces souches ont présenté un fort taux de résistance à une ou plusieurs familles d'antibiotiques en particulier les β-lactamines, les aminosides, et les quinolones. Par ailleurs l'imipénème, le cefoxitine et la colistine restent les molécules les plus actives sur *Proteus mirabilis*.

Cette étude avait aussi pour objectif de comparer l'effet des rayons UV chez *Proteus mirabilis*. Après détection des mutants, toutes les souches mutantes sont capables de se développer sur un milieu GN. Elles ont été caractérisées phénotypiquement par des tests biochimiques. Les mutants ainsi isolés possèdent presque les mêmes caractères que ceux avant la mutagénèse.

Références bibliographiques

A

ALAMURI P, MOBLEY H. A novel autotransporters of Uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxine and an agglutinin, *Mol Microbiol*, 2008, Vol68 n° 4, pp 997-1017.

AVRIL J-L, DABERNAT H, DENIS F. Bactériologie Clinique, Ellipses, 3ème Edition, 2000, pp 511.

B

BAHRANI F, MOBLEY H. *Proteus mirabilis* fimbrial operon , Genetic organisation , nucleotide sequence and condition for expression , *J Bacteriol*,1994 ,Vol176 n°11 ,pp 9-3412.

BELAS R. *Proteus mirabilis* Swarmer Cell Differentiation and Urinary Tract Infection in *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management.*" J.W. Warren, Editor, ASM Press: Washington, D.C, 1996, pp 271-298.

BESSARD G. Pharmacologie des antibiotiques, Faculté de médecine de Grenoble, Université Joseph Fourier ,2004.

BOTTO H. Infections urinaires nosocomiales de l'adulte : conférence de consensus, texte court, médecine et maladies infectieuses, 2003, vol 33, pp 370–375.

BRENNER DJ, HOLMES B, HAWKER PM. Replacement of NCTC4175, The current type strain of *Proteus mirabilis*, *J.SystBactriol*, 1995, Vol 26, pp 323-327.

BRYSKIER A. Antibiotiques : Agent antibactériens et antifongiques, Ellipses, Paris 1999, vol 54, pp 436-445.

C

CARL S. La Résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. Le parrainage des antimicrobiennes, 2009, pp 47.

CATTOIR V. Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries, *Pathologie Biologie*, 2004, vol52, pp 607-616.

CAVALLO J-D, R. FABRE R, JEHL F, RAPP C, GARRAB E. Bêta-lactamines, EMC Maladies Infectieuses, 2004, pp 129-202.

CLAIRE W. Fluoroquinolones : Interne-Service Maladies Infectieuses, 2013, Pr Stahl, Grenoble

Comité de l'antibiogramme de la société Française de Microbiologie, 1997.

COKER C, POORE C, LI X & MOBLEY H. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection, *Microbes and Infection*, 2000, Vol 2 ,pp 1497– 1505.

COVER T , BERG D, BLASER M, AND MOBLEY H. *Proteus mirabilis* Pathogenesis, In Eduardo A. Groisman (ed.), Principles of Bacterial Pathogenesis, Academic Press, San Diego, 2001, pp 510-558.

CRISTIANIB, SÉRGIO P, DEJATO RA. Virulence Factors Of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, A Mini Review, International Journal of Scientific & Technology Research, Vol 3, issue 11, 2014, pp 4-27.

D

DANCE D, PEARSON A, SEAL D, LOWES J. A hospital outbreak caused by a chlorhexidine- and antibiotic-resistant *Proteus mirabilis*. J Hosp Infect, 1987, Vol 10, pp10–16.

DELLARRAS C. Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire, Technique et documentation, France, Lavoisier, 2007, pp 462.

DHAYANITHI N, AJITHKUMAR T , KATHIRESAN K. Effect of name extract against the bacteria isolated from marine fish. Journal of Environmental Biology, 2010, Vol 31, pp 409-412.

F

FARKOSH, MARY S. “Extended-Spectrum beta-lactamase Producing Gram Negative Bacilli”, 2000.

FOMBA M. Rôle pathogène et sensibilité aux antibiotiques des Entérobactéries et des Staphylococcus a coagulase négatif à l'hôpital du point G, 2006, Thèse de doctorat en pharmacie.

FRASCA D, DAHYOT-FRIZELIER C, MIMOZ O. La colistine en réanimation, 2008, Vol 17, pp 8- 251.

G

GONZALES, GUS. *Proteus* Infections, Medicine from WebMD. Last edited 2 March 2006. Grall N., Andremont A., Armand-Lefèvre L. Résistance aux carbapénèmes : vers une nouvelle impasse, 2011, pp 16.

H

HAUSER G. About not bacteria and their relationship to Septicemia, Vogel Leipzig, 1985, pp 107.

HAUSE G. Ueber das Vorkommen von *Proteus* bei einer jauchig-phlegmonösen eiterung nebst einigen bemerkungen zur biologie des *Proteus*, MünchMed Wochenschr, 1892, Vol 39, pp103–105.

HOLMES B, COSTAS M, AND WOOD A. Typing of *Proteus mirabilis* from clinical sources by computerized analysis of electrophoretic protein patterns, 1991.

HOLT J. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Williams & Wilkins, Baltimore MD, Vol. I &II, 1986.

J

JANDA J, ABBOT S. the genus *proteus*, in 2nd editor, the Enterobacteriaceae, Washington, DC: ASM Press, 2006

JARLIER V ET NORDMANN. *Proteus* Entérobactéries et β -lactamines, ESKA -Précis de bactériologie clinique, 2000.

JONES B, MOBLEY H. *Proteus mirabilis* urease: genetic organisation, regulation and expression of stucturel genes, J Bacterial, 1988, Vol 170 n°8, pp 9-3342.

K

KASSAMA M, HAMADI S. Evaluation de la résistance aux antibiotiques des souches d'entérobactéries isolées à l'établissement hospitalier spécialisé de Constantine. University constantine1, 2013, pp 62.

KELLEY STRUBLE, MICHAEL STUART BRONZE, RHETT L JACKSON, GUS GONZALEZ, "*Proteus Infections: Overview*", Medicine, 2009.

KEMPER M., MOBLEY H, AND DOYLE R. How do Bacilli Elongate? In G.D, Antibiotic Inhibition of Bacterial Cell Surface Assembly and Function, ASM, Washington, D.C. 1988, pp 98-108.

KHAN F, RIZVI M, SHUKLA I, MALIK A. A novel approach for identification of members of Enterobacteriaceae isolated from clinical samples, Biology and Medicine, 2011, Vol 3 n°2, pp 313-319.

KIM J, PARCK Y, KIM S. Nosocomial outbreak by *Proteus mirabilis* production, extended beta-lactamases, VEB-1 in Korean university, 2004, Vol 54 n°6, pp 7-1144.

L

LAVIGNE J. Effet des antibioques et mécanismes de résistance, Cours de bactériologie, Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes, 2007.

Références bibliographiques

LE MINOR L, RICHARD C. Méthodes de laboratoire pour l'identification des Entérobactéries. Institut pasteur, publication 1993.

LE MINOR L, VERON M. Bactériologie Médicale. Médecine –Science Flammarion. 2ème Edition, 1989, pp 1107.

LIU D. Molecular Detection of Foodborne Pathogens, 2010, CRC Press: Boca Raton

LOZNIIEWSKI A, RABAUD C. Résistance bactérienne aux antibiotiques, Fiche conseil pour la prévention du risque infectieux, Centre de Coordination de lute contre les infections nosocomiales-Sud Est, 2010.

M

MANOS J, BELAS R. The Genre *Proteus*, *Providencia*, *Morganella* .in Dworkin M, Strackebrandt E, 2006, pp 245-69.

MARYSE ARCHAMBAUD, DANIELLE CLAVE. Fiche technique : Bactériologie 051 en ftbac, Laboratoire de Bactériologie, Hygiène CHU Toulouse Rangueil, 2004, vol1, pp 4.

MCLEAN R, NICKEL J, COSTERTON T. The ecology and pathogenicity urease-producing bacteria in urinary tract, Crit Rev Microbiol, 1988, Vol 16 n°1, pp 505-1479.

MESSAI A. Analyse critique des pratiques de l'antibiothérapie en élevages avicoles, 2006, pp 21.

MERADI L, DJAHOUDI A, ABDI A, BOUCHAKOUR M , PERRIER GROS CLAUDE J, TIMIMOUNE M. Resistance aux quinolones de types qnr, aac (60)-Ib-cr chez les Entérobactéries isolées a` Annaba en Algérie. Pathologies Biologie 59, 2011, pp 73-78.

MISRA T, SILVER S. MOBLEY, ROSEN B. Molecular genetics and biochemistry of heavy metal resistance in bacteria. In A.H. Tashjian, Jr. (ed.), Molecular and Cellular Approaches to Understanding Mechanisms of Toxicity. Harvard School of Public Health, 1984, pp 63-81.

MOBLEY H, CHIPPENDALE G, SWIHART K & WELCH R. Cytotoxicity of the Hpm Ahemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells, Infection and Immunity, 1991, Vol 59, pp 2036–2042.

N

NICHOLSON E, CONCAUGH E & MOBLEY H. *Proteus mirabilis* urease: use of a ureA-lacZ fusion demonstrates that induction is highly specific for urea Infection and Immunity, 1991, Vol 59, PP 3360–3365.

NKANG A, OKONKO O, FOWOTADE A, UDEZE A , OGUNNUSI T, FAJOBI E .Antibiotics susceptibility profiles of bacteria from clinical samples in Calabar, Nigeria, J. Bacteriol, 2009, Vol 1 n°8, pp 89-96.

O

OHARA C, BRENNER F , MILLER J. Classification and clinical signification of *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*. Clin Microbiol Rev, 2000, vol 13 n°4, pp 46- 534.

P

PAUL H. ROY. Dissémination de la résistance aux antibiotiques : le génie génétique à l'oeuvre chez les bactéries, Médecine/ sciences n° 8-9, 1997, Vol 13.

PEARSON M. "Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. J Bacteriol» June 2008, Vol 190 n°11, pp 3- 4027.

PEEBOOMS P, VERWRIJ A. Investigation of the hemolytic activity of *Proteus mirabilis* starains, Anatomie van Leeuwenhoek, 1983, Vol 78 n°6, pp 45-2834.

PEEBOOMS P, VERWRIJ A. Vero cell invasiveness of *Proteus mirabilis*, infect immune, 1984, Vol 43 n°3, pp 71-1068.

PERRONNE C. Maladies infectieuses, 1999, Vol 1, pp 65

PHILIPS J. In vitro studies on *Proteus* organisms of animal origin, JHYG (lond) 1955, Vol 53n°1, pp 26-31.

PILET C, BOURDON J, TOMA B. Les Entérobactéries : Bactériologie médicale et vétérinaire : systématique bactérienne, Doins, Paris 1979, pp 109-187.

PODSCHUN R, ULLMANN. *Proteus mirabilis* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin. Microbiol. Rev, 1998, Vol 11, pp 589-603.

R

ROZALSKI A, STACZEK P. *Proteus* in Molecular detection of food borne pathogens, United States of America, 2009, pp 217-30.

RUPPE E. Épidémiologie des β -lactamases à spectre élargi : l'avènement des CTX-M. 2010, Vol 12 - n° 1, pp 3-16.

S

SILOVERBLATT F, OFEK I. Influence of pili on the virulence of *Proteus mirabilis* in experimental hematogenous pyelonephritis, J Infect Dis, 1978, Vol 138 n°5, pp 7-664.

SMITH T. Transactions of the Association of American Physicians, Philadelphia, Pa: Association of American Physicians. Modification temporary and permanent of the physiological characters of bacteria in mixed cultures, 1894, Vol 9, pp 85–109.

SMAOUI S. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, Thèse de doctorat, Génie de procédés et environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France, 2010, pp 207.

SONIOR B, LOOMES L , KERR M .The production and activity in vivo of *Proteus mirabilis* IgA protease in infection of the urinary tract , J Med Microbiol ,1991 ,Vol 35 n°4,pp 67-521.

SOUNA D. Epidémiologie de la résistance aux antibiotiques des Entérobactéries au niveau du C.H.U de Sidi Bel Abbes, Mémoire de Magister, Université Abou Bekr Belkaid – Tlemcen, 2011, pp 127.

STURENBURGYE, MARCKD. Extended-spectrum beta-lactamases: implication for the clinical microbiology, laboratory therapy and infection control, 2003, Vol 47 n°4, pp 95-273.

V

VERSTRAETEN N, BRAEKEN K. Living on a surface swarming and biofilm formation, Trends Microbiol, 2008, Vol 16 n°10, pp 496-506.

VIEU J, VIEU M. Le test à l'O.N.P.G. et l'épidémiologie de *Proteus*. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 1978, Vol 8 n°5, pp 231-234.

W

WALKER K, MOGHADAM –JFARI S, LOKATELL CV. IgA degrading metallopeptase of *proteus mirabilis* is a virulence factor expressed specifically in swarmer cells, *Mol Microbiol*, 1999, Vol 32 n°4, pp 852-36.

WARREN, J. W. The catheter and urinary tract infection. *Med. Clin. N. Am*, 1991, Vol 75, pp 481–493.

WASSIF C, CHEEK D. Molecular analysis of a metallopeptase from *Proteus mirabilis*, *J bacteriol*, 1995, Vol 43, pp 84-176.

WELCH R. Identification of two different hemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates, *Infect immune*, 1987, Vol 55 n°9, pp 90-213.

WENNER J, RETTGER L. A systematic study of the *Proteus* group of bacteria. *J Bacteriol*, 1919, Vol 4, pp 331–353.

WILLIAMS E, HAWKEY P, PENNER J, SENIOR B, BARTON L. Serious nosocomial infection caused by *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis* in a cardiac surgery unit, Clin Microbiol, 1983, Vol 18, pp 5–9.

WILSON C, THAKORE A, ISENBERG D, EBRINGER A. Correlation between anti-*Proteus* antibodies and isolation rates of *Proteus mirabilis* in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int, 1997, Vol 16, pp 187–189.

WOLFF M, JOLY-GUILLOU M-L ET PAJOT O. Le point sur les carbapénèmes, Réanimation 2008, Vol 17, pp 242-250.

Y

YALA D, MERAD A, MOHAMEDI D ET OUAR KORICH M. Classification et mode d'action des antibiotiques, Médecine du Maghreb n°91, 2001.

Z

ZHAO H, JOHNESON D, BLOMFIELD I .In vivo phase variation fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract, Mol Microbiol, 1997, Vol 23 n°5, pp19-1009.

ZAREI M, AMINZADEH S, ZOLGHARNEIN H, SAFAHIEH A, GHOROGHI A, DALIRI M, *Serratia marcescens* B4A chitinase product optimization using Taguchi approach. Journal of biotechnology, 2010, Vol 8 n°4, pp 252-262.

Annexe

Annexe

Annexe 01 : Composition des différents milieux.

- Hecktoéne :

Milieu sélectif pour l'isolement des bactéries à Gram négatif

Composition (grammes/litre)

Peptone.....	12
Extrait de levure.....	3
NaCl.....	5
Sels biliaires.....	9
Thiosulfate de sodium.....	5
Citrate de fer ammoniacal.....	1,5
Lactose.....	12
Salicine.....	2
Saccharose.....	12
BBT.....	0,002
Fuchsine acide.....	0,1
Agar.....	14

pH final = 7,5

- Muller Hinton :

Milieu relativement riche, mais qui reste un milieu de base qui permet la culture des bactéries non exigeantes.

Composition (grammes/litre)

Infusion de viande de bœuf...300 mL

Peptone de caséine.....17,5

Annexe

Amidon de maïs.....1,5

Agar.....17 g

pH final = 7,4

- Gélose nutritive :

Extrait de viande.....01g.

Extrait de levure.....02g.

Peptone.....05g.

Chlorure de sodium.....05g.

Agar.....15g.

pH = 7,4

- Citrate de Simmons :

Composition (grammes/litre)

Sulfate de Mg.....0,2

Phosphate monoammoniaqué.....1

Phosphate bipotassique.....1

Citrate de sodium.....2

NaCl.....5

BBT.....0,08

Agar.....15

pH=6,8

- TSI :

Composition (grammes/litre)

Peptone.....15,0 g

Annexe

Extrait de viande.....	3,0 g
Extrait de levure.....	3,0 g
Peptone pepsique de viande.....	5,0 g
Glucose.....	1,0 g
Lactose.....	10,0 g
Saccharos.....	10,0 g
Rouge de phénol.....	0,024 g
Chlorure de sodium.....	5, 0 g
Sulfate de fer II (Pasteur).....	0,2 g
Thiosulfate de sodium.....	0,3 g
Agar.....	11,0 g

pH = 7,5

- Mannitol mobilité :

Composition (grammes/litre)

Peptone trypsique de viande.....	20
Mannitol.....	2
RP 1%.....	4mL
Nitrate K.....	1
Agar.....	4

PH = 7, 6 -7, 8

- Urée indole :

Composition (grammes/litre)

Tryptophane.....	3
------------------	---

Annexe

Urée.....	20
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NaCl.....	5
Alcool à 95°	10 mL
Rouge de phénol.....	2,5 mL

- Milieu Clark-Lubs :

Peptone tripsique de viande	5g
Phosphate bipotassique pur en poudre.....	5g
D (+) glucose	6g
Eau distillée	1l ml
PH = 7.5	

- LDC

Extrait de levure.....	03g.
L-lysine (monochlorhydrate).....	05g.
Glucose.....	01g.
Bromocrésol pourpre.....	0,16mg.
Éthanol.....	01ml.
Chlorure de sodium.....	05g.
pH = 6,8	

- ODC

Extrait de levure.....	03g.
L-ornithine (monochlorhydrate).....	05g.

Annexe

Glucose.....01g.

Bromocrésol pourpre.....0,16mg.

Éthanol.....01ml.

Chlorure de sodium.....05g.

pH = 6,8

- ADH

Extrait de levure.....03g.

L-arginine (monochlorhydrate).....05g.

Glucose.....01g.

Bromocrésol pourpre.....0,16mg.

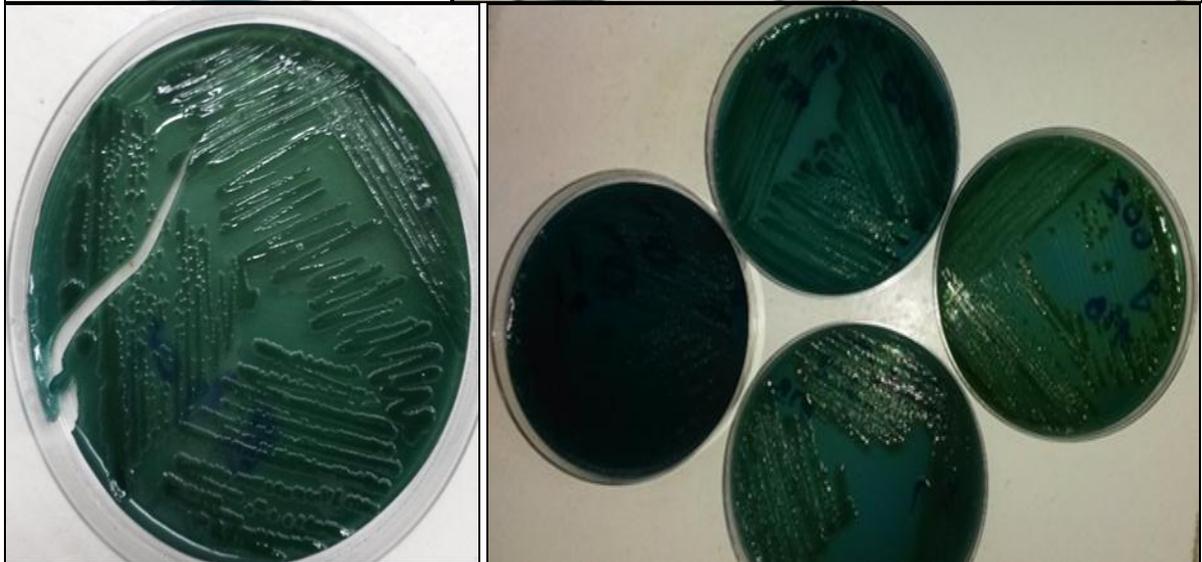
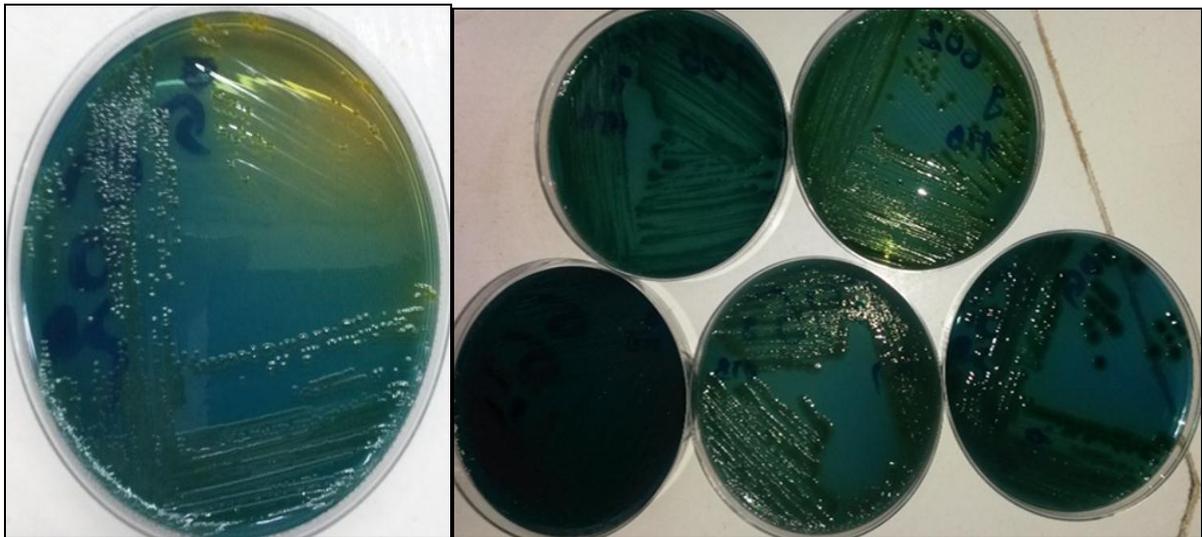
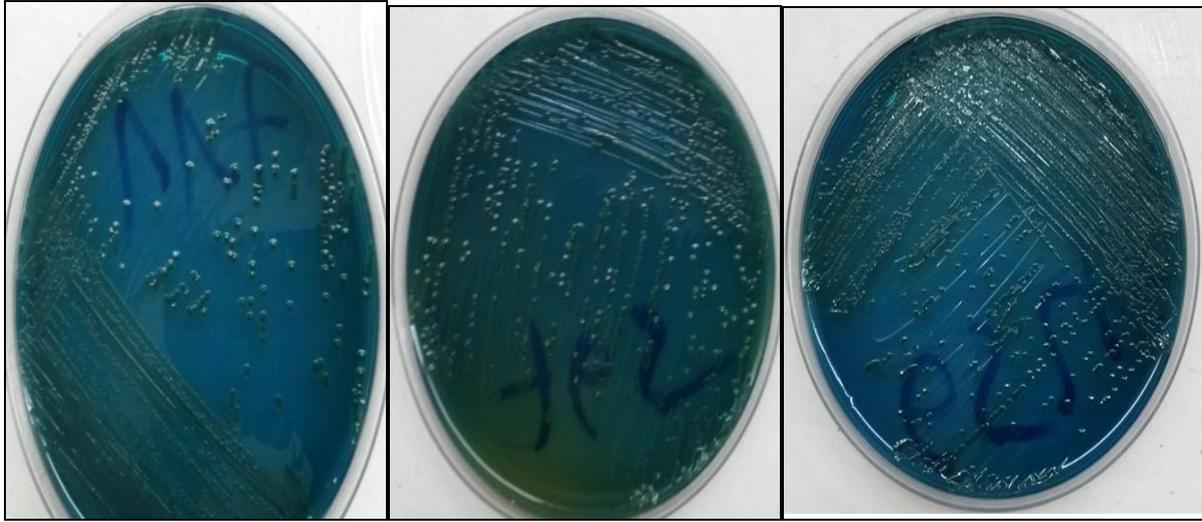
Éthanol.....01ml.

Chlorure de sodium.....05g.

pH = 6,8 .

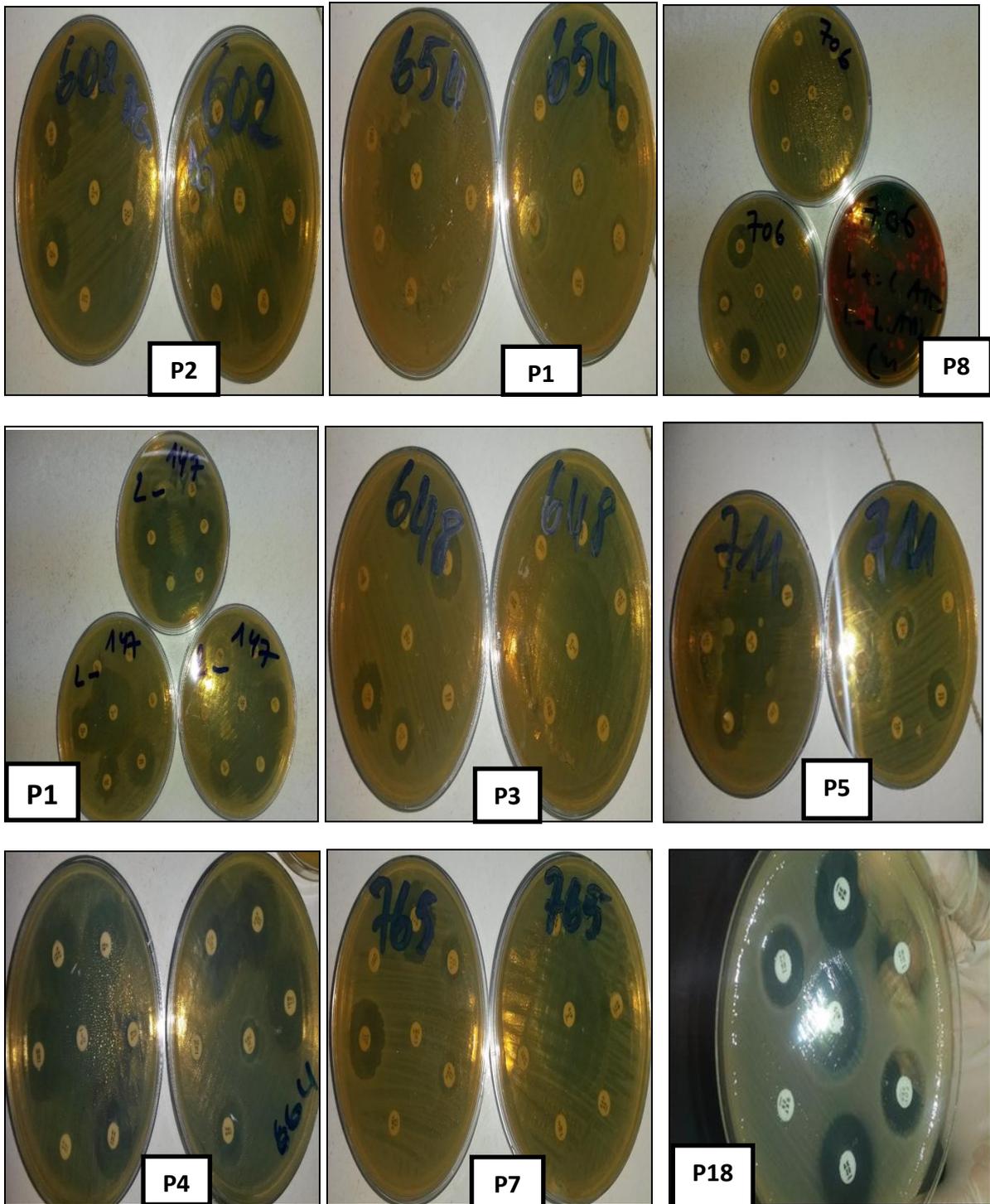
Annexe

Annexe 02 : Photographies des résultats de repiquage des souches sur héктоón

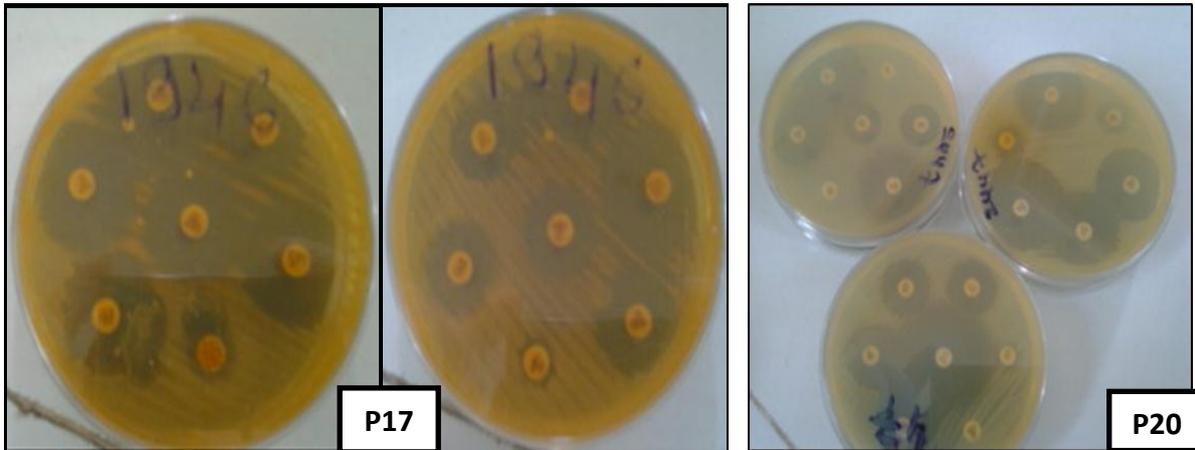
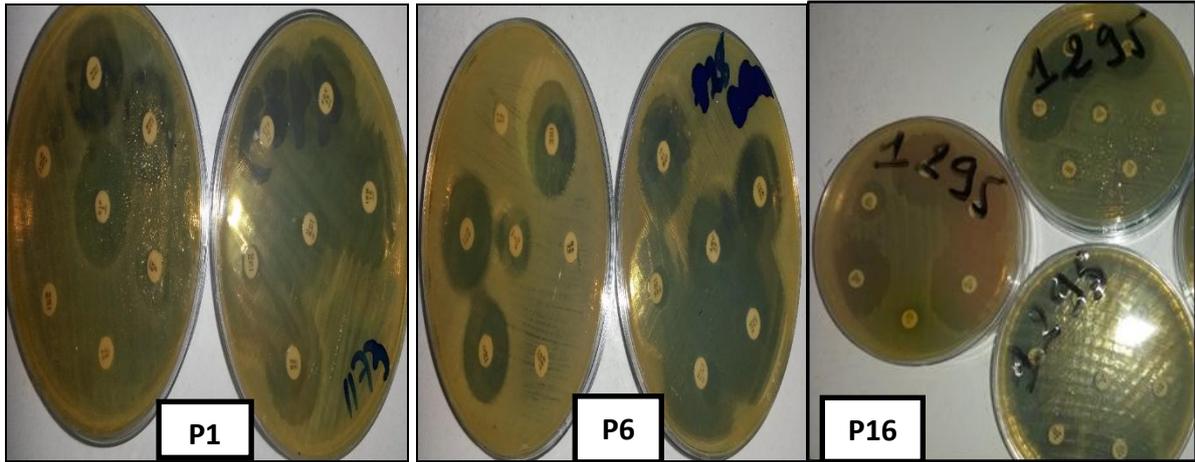


Annexe

Annexe 03 : Résultats de l'antibiogramme des souches étudiées.



Annexe



Annexe

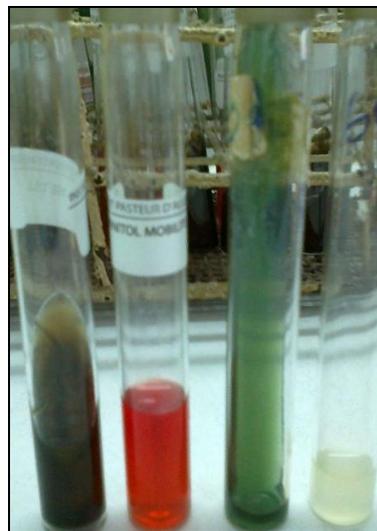
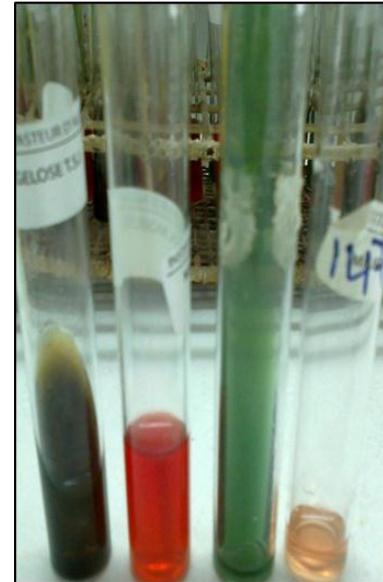
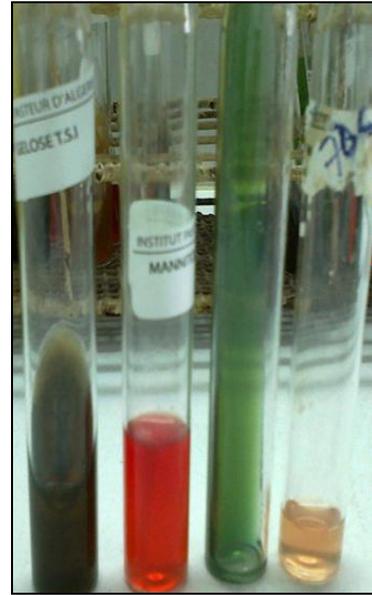
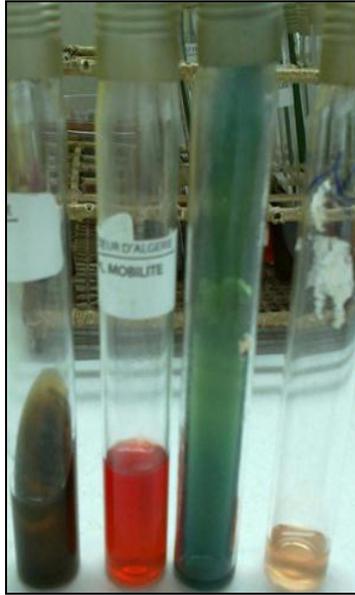
Annexe 04 : Référence pour la lecture de l'antibiogramme.

Table de lecture 1^{*} : Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition et des CMI pour *Entérobactéries*.

Antibiotiques testés	Charge des Disques	Diamètres critiques (mm)			CMI critiques (µg/ml)			Commentaires
		R	I	S	R	I	S	
Ampicilline	10µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17	≥ 32	16	≤ 8	La réponse à l'ampicilline est valable pour l'amoxicilline
Amoxicilline +Ac. clavulanique	20/10µg	≤ 13	14 – 17	≥ 18	≥ 32/16	16/8	≤ 8/4	Les breakpoints des céphalosporines et de l'aztréonam ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. Ainsi, l'application de ces breakpoints dépend du respect de posologies précises : céfazoline (2g toutes les 8h), céfoxitine (2g toutes les 6h), céfotaxime (1g toutes les 8h).
Céfazoline	30µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 8	4	≤ 2	Suite à la révision des breakpoints des céphalosporines, la lecture interprétative anciennement basée sur la détection ou non d'une BLSE, n'est plus nécessaire. La réponse R, I ou S se fait en se référant aux seuls diamètres mesurés.
Céfalexine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	A souligner cependant que la détection phénotypique de la BLSE garde tout son intérêt dans les études épidémiologiques et en hygiène hospitalière. (voir chapitre recherches complémentaires).
Cefoxitine	30µg	≤ 14	15 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	
Céfotaxime	30µg	≤ 22	23 – 25	≥ 26	≥ 4	2	≤ 1	Pour prédire les résultats des céphalosporines orales quand elles sont utilisées pour le traitement des infections non compliquées du tractus urinaire, le test de la céfazoline est préféré à celui de la céphalotine.
Céfazoline (Infections non compliquées du tractus urinaire)	30µg	≤ 14	---	≥ 15	≥ 32	---	≤ 16	Les résultats de la céfazoline permettent de prédire les résultats pour les céphalosporines orales : céfador, céfdinir, céfpodoxime, céfprozil, céfuroxime axétil, céphalexine et loracarbef quand elles sont utilisées pour le traitement des infections non compliquées du tractus urinaire dues à <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> et <i>P. mirabilis</i> . Céfpodoxime, céfdinir et céfuroxime axétil peuvent être testés individuellement car certaines souches peuvent être sensibles à ces antibiotiques alors qu'elles sont résistantes à la céfazoline.
Céftazidime	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4	Les critères d'interprétation sont basés sur la posologie de 1 g toutes les 8h.
Aztréonam	30µg	≤ 17	18 – 20	≥ 21	≥ 16	8	≤ 4	Les critères d'interprétation sont basés sur la posologie de 1g toutes les 6h.
Imipénème	10µg	≤ 19	20 – 22	≥ 23	≥ 4	2	≤ 1	Les breakpoints des carbapénèmes ont été révisés en fonction des propriétés PK-PD et des données cliniques. L'application de ces breakpoints dépend du respect des posologies suivantes : Imipénème : 500 mg toutes les 6h ou 1 g toutes les 8h, Ertapénème : 1g toutes les 24h.
Ertapénème	10µg	≤ 18	19 – 21	≥ 22	≥ 2	1	≤ 0,5	La détection phénotypique d'une carbapénémase par le test MHT est réservée aux études épidémiologiques (voir chapitre recherches complémentaires).
Amikacine	30µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 64	32	≤ 16	
Gentamicine	10µg	≤ 12	13 – 14	≥ 15	≥ 16	8	≤ 4	
Acide nalidixique	30µg	≤ 13	14 – 18	≥ 19	≥ 32	---	≤ 16	La sensibilité diminuée aux fluoroquinolones est détectée chez les salmonelles isolées d'infections extra-intestinales en testant l'acide nalidixique à l'antibiogramme.
Ciprofloxacine	5µg	≤ 15	16 – 20	≥ 21	≥ 4	2	≤ 1	Valable pour entérobactéries autres que <i>Salmonella</i> Typhi et <i>Salmonella</i> spp. extra-intestinales.
Chloramphénicol	30µg	≤ 12	13 – 17	≥ 18	≥ 32	16	≤ 8	Ne pas reporter en routine pour les souches isolées d'ITU sauf pour les salmonelles. Valable pour <i>S. Typhi</i> et <i>Salmonella</i> spp. extra-intestinales.
Colistine**	CMI	---	---	---	>2	---	≤ 2	
Furanes	300µg	≤ 14	15 – 16	≥ 17	≥ 128	64	≤ 32	
Fosfomycine	200µg	≤ 12	13 – 15	≥ 16	≥ 256	128	≤ 64	Indiqué uniquement pour les souches d' <i>E. coli</i> isolées d'infections urinaires. Le disque de 200µg contient 50µg de glucose-6-phosphate. La CMI est déterminée par la technique de dilution en gélose supplémentée de 25µg/ml de glucose 6-phosphate.
Triméthoprime+ Sulfaméthoxazole	1.25/ 23.75µg	≤ 10	11 – 15	≥ 16	≥ 4/76	---	≤ 2/38	

Annexe

Annexe 06 : Résultats de la galerie biochimique des souches étudiées.



Annexe

Annexe 05: Résultats obtenus de l'antibiogramme pour les 20 souches de *Proteus mirabilis* étudiées.

	A MP	AM C	TIC	CZ	FOX	CTX	IMP	GN	AK	N A	CIP	SXT	CS	C
P1	22 S	24 S	28 S	24 S	24 S	30 S	24 S	22 S	22 S	22 S	30 S	26 S	<6 R	6 R
P2	nd	23 S	29 S	nd	25 S	30 S	19 S	20 S	22 S	R	9 S	R	Nd	20 S
P3	nd	R	S	nd	11 S	14 S	17 S	R	R	20 S	35 S	R	Nd	R
P4	Nd	9 S	R	nd	20 S	27 S	22 S	7 S	20 S	20 S	31 S	20 S	Nd	20 S
P5	<6 R	<6 R	<6 R	R	17 S	11 S	20 S	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	<6 R	R	R
P6	S	23 S	30 S	S	23 S	25 S	23 S	22 S	21 S	R	12 S	R	R	17 S
P7	nd	8 S	18 S	R	12 S	15 S	17 S	R	R	19 S	40 S	R	nd	R
P8	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S
P9	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R
P10	R	R	R	R	S	S	S	18 S	19 S	19 S	27 S	23 S	R	nd

Annexe

P11	R	24 S	24 S	23 S	26 S	30 S	26 S	20 S	22 S	R	I	R	R	R
P12	R	R	R	R	28 S	30 S	30 S	23 S	26 S	20 S	30 S	19 S	R	19 S
P13	R	R	R	I	26 S	30 S	28 S	23 S	24 S	25 S	30 S	30 S	R	nd
P14	R	R	R	R	28 S	30 S	26 S	22 S	22 S	24 S	30 S	26 S	R	nd

R : résistante , **S** : sensible .

I : Intermédiaire , **nd** : non identifié .

Annexe

Matériel utilisés

- Etuve, Hôte.
- Autoclave, Bain marie.
- Bec benzène, Anse de platine.
- Distributeurs d'antibiotiques
- Agitateur, pH mètre, Vortex.
- L'eau distillée, L'eau oxygénée
- Ethanol, NAOH, Alcool.
- Violet de Gentiane, La Fushine, Lugol.
- L'huile a immersion.
- Disques d'ATB, Disques d'oxydase, Disques ONPG.

ملخص

Proteus mirabilis هي بكتيريا معوية تتسبب في الالتهابات البولية، وتعتبر من أهم الكائنات الدقيقة التي تنتقل عن طريق عدوى المستشفيات والأمراض المعدية الانتهازية .
خلال فترة التربص الذي قمنا به على مستوى المستشفى الجامعي ابن باديس قسنطينة ما بين شهر مارس و شهر مايو 2016 ، قمنا بدراسة 20 سلالة من *Proteus mirabilis*، وجدنا أن % 60 من السلالات تم عزلها من البول .
تهدف هذه الدراسة إلى معرفة الخصائص المورفولوجية و البيوكيميائية ل *Proteus mirabilis* و حساسيتها لمختلف المضادات الحيوية التالية : بيتا لاكتامين ، أمينوزيد، فلوروكينولون، أمينوغليكوزيد، سولفاميد، عن طريق أقرص المضادات الحيوية . وحسب النتائج المتحصل عليها وجدنا أن *Proteus mirabilis* تقاوم أغلبية المضادات الحيوية.
إن إحداث طفرات بالأشعة فوق البنفسجية يؤدي إلى حساسية السلالات ومنه تراجع معدل نموها، مع تغير بعض خصائصها البيوكيميائية.

الكلمات المفتاحية: *Proteus mirabilis*، خصائص مورفولوجية، خصائص بيوكيميائية، مضادات حيوية، إحداث طفرات.

Abstract

Proteus mirabilis is an enteric bacterium that is part of the urinary species. It is currently involved in nosocomial infections and opportunistic infectious diseases. *Proteus mirabilis* strains were isolated between March and May 2016 from different fields of CHU of Constantine. We gathered 20 more high strains.

This study was undertaken in the aim to identify *Proteus mirabilis* goals by morphological characterization and biochemical tests. The study of sensibility under different β -lactam antibiotics including aminoglycosides, fluoroquinolones, aminoglycosides, and a sulfamide by the method of discs of antibiotic (susceptibility). They are resistant to the majority of antibiotics. The mutagenesis by UV revealed the sensibility and the death of exposing strains in UV has a duration language. Biochemical characters of the mutated strains are nearly the same those strains before the mutagenesis.

Keywords: *Proteus mirabilis*, Identification, Morphological characters, Biochemical characteristics, Resistance, Antibiotics, Mutagenesis.

Résumé

Proteus mirabilis est une entérobactérie qui fait partie des espèces urinaires. Elle est actuellement impliquée dans les infections nosocomiales et dans les pathologies infectieuses opportunistes. Des Souches de *Proteus mirabilis* ont été isolées, entre Mars et Mai 2016, à partir des différents services au niveau du CHU de Constantine. Nous avons colligé 20 souches de *Proteus mirabilis* dont 60% au niveau des urines avec un taux le plus élevé.

Cette étude a pour objectifs l'identification de *Proteus mirabilis* par la caractérisation morphologiques, les tests biochimiques. Par l'étude des tests de sensibilité aux antibiotiques différents dont β -lactamines, aminosides , fluoroquinolones , aminoglycosides et un sulfamide par la méthode des disques d'antibiotiques (Antibiogramme) et par la mutagénèse. Elles sont résistantes à la majorité des antibiotiques utilisés.

La mutagénèse par UV a révélé la sensibilité et la mort des souches en exposant à l'UV à une longue durée. Les caractères biochimique des souches mutées sont presque les même ceux des souches avant la mutagénèse.

Mots clés : *Proteus mirabilis*, identification, caractères morphologiques, caractères biochimiques, résistance, antibiotiques, mutagénèse.

Année universitaire : 2015/2016

Présenté par : **HAMDOUCHE CHAIMA**
TABAI AMIRA

Thème : *Proteus mirabilis* au niveau de CHU constantine
Caractérisation biochimique, microbiologique
et la mutagénèse.

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Résumé

Proteus mirabilis est une entérobactérie qui fait partie des espèces urinaires. Elle est actuellement impliquée dans les infections nosocomiales et dans les pathologies infectieuses opportunistes. Des Souches de *Proteus mirabilis* ont été isolées, entre Mars et Mai 2016, à partir des différents services au niveau du CHU de Constantine. Nous avons colligé 20 souches de *Proteus mirabilis* dont 60% au niveau des urines avec un taux le plus élevé.

Cette étude a pour objectifs l'identification de *Proteus mirabilis* par la caractérisation morphologiques et les tests biochimiques .Les tests de sensibilité aux différents antibiotiques dont β -lactamines, aminosides , fluoroquinolones , aminoglycosides et un sulfamide par la méthode des disques d'antibiotiques (Antibiogramme). Ont montré une résistantes de ces bactéries.

La mutagenèse par UV a révélé la sensibilité et la mort des souches après exposition aux UV pendant une longue durée. Les caractères biochimiques des souches mutées sont presque les même que celles des souches avant la mutagènes.

Mots clés : *Proteus mirabilis*, identification, caractères morphologiques, caractères biochimiques, résistance, antibiotiques, mutagénèse

Jury d'évaluation :

Président du jury : Mme *SATTA S* Professeur- UFM Constantine 1.
Rapporteur : Mme *BECHKRI S* MAA- UFM Constantine 1.
Examineur : Mme *SAUDI M* MAA- UFM Constantine 1.

Date de soutenance : 21/06/2016