REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE DR. YAHIA FARES DE MEDEA FACULTE DES SCIENCES

Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention de diplôme de Master en sciences biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Isolement des souches probiotiques de la flore vaginale à MEDEA

Présenté par :

- **LAIDI Amira**
- **MENASRI Loubna**
- **OUALHA Bahia**

Soutenu publiquement le : 20 Septembre 2020

Devant le jury composé de :

-M^me^ K.CHAOUATI	M.A.A	Univ. Médéa	Présidente
- M^me^ A.HOCEINI	M.C.B	Univ. Médéa	Examinatrice 1
-M^me^ A.ZERGOUG	M.C.B	Univ. Médéa	Examinatrice 2
-M^me^ I.BELKACEM	M.C.B	Univ.Médéa	Promotrice
-M^me^ M.SLIFI	Doctorante	Univ.Bouira	Co promotrice

2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, nous remercions ALLAH le tout puissant de nous avoir accordé la force d'accomplir ce modeste travail

Nous exprimons nos sincères remerciements à notre promotrice madame BELKACEM.I pour avoir accepté l'encadrement de ce travail, sa patience et ses précieux conseils.

Nos vifs remerciements vont également à notre Co-promotrice madame SLIFI.M pour sa disponibilité, son encouragement et ses orientations durant toute la période de travail

Nous tenons à remercier aussi les membres de jury :

M^me^ CHAOUATI.K, M^me^ ZERGOUG.A et M^me^ HOCEINI.A

pour l'intérêt qu'ils ont portés à notre recherche en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions

Enfin, nous tenons également à remercier toutes les personnes qui ont participés de près ou de loin à la réalisation de ce travail

Dédicaces

Je dédie ce travail

À mes très chers parents, toutes les lettres ne sauraient trouver les mots qu'il faut, et tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect à ceux qui me sont les plus chers. Puisse Dieu vous procurer bonheur, santé, langue vie et vous gardé à moi

À mes chers petits frères : Anis, Wassim et Mohammed Noufel que dieu vous garde pour moi

À mon fiancé, Mohammed Riad, merci beaucoup pour votre soutien et aide

À toutes mes amies, spécialement Hadjer

À toutes ma famille

Et

Tous ceux que j'aime et qui m'aiment

Loubna

Dédicaces

Je dédie ce mémoire

À mes chers parents ma mère et mon père

Pour leur patience, leur soutien et leur encouragement

Tout au long de ma carrière d'étude

À mes frères et mes sœurs

À mes chers camarades

Amira

Dédicaces

J'ai le grand plaisir de dédier ce travail aux deux bougies qui ont éclairé ma vie.

À la plus tendre et la plus caressante mère dans le monde, à maman.

À celui qui m'a toujours encouragé à mon père

À mes chères sœurs Fatma Zohra, Mahira et Fouzia

À mes frères Mohammed et Nouar

À mes neveux Seif eddine, Salsabil, Asmaa, Chaimaa, Abd elhai, Abd elbasset, Siradj, Abd elfattah et Younes je vous adore

Je dédie ainsi ce travail :

À mes chères amies Khadîdja, Semia, Nadia, Souhila, Imane et Sihem

À toute personne que j'aime et qui m'aime.

À tous ceux qui vivent pour la recherche et le savoir

Et au final, À tous ceux qui auront l'occasion de lire ce travail

Bahia

Liste des figures

Figure 01 : Structure de l'appareil génitale féminin 03

Figure 02 : Effets des lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase..... 10

Figure 03 : Mécanismes impliqués dans le phénomène d'adhésion..... 11

Figure04 : Flore vaginale normale (à droite) et cellules épithéliales (clue cell) recouvertes des bactéries (à gauche)..... 14

Figure 05 : Schéma représente A:flore normale B: flore intermédiaire C: vaginose bactérienne..... 15

Figure 06 : Image d'une vaginose près du col..... 16

Figure 07 : Trichomonas vaginalis sous le microscope optique 19

Figure 08 : Caractéristiques des souches probiotiques..... 21

Figure 09 : Photo présente la technique de prélèvement vaginale..... 26

Figure 10 : Photo présente un écouvillon..... 27

Figure 11 : La cellule de Malassez..... 28

Figure 12 : Schéma présentatif de technique d'ensemencement en strie..... 29

Figure 13 : Galerie d'identification API 20 E 34

Figure 14 : lactobacillus sur gélose MRS..... 37

Figure 15 : A/ *S. aureus* sur gélose Chapman B/*Proteus* sur gélose nutritive, C/*S.epidermidis* sur gélose Chapman, D/ Entérobactérie sur gélose hecktoen..... 37

Figure 16 : l'aspect morphologique des colonies : A / *S. aureus*, B/ *lactobacillus*..... 38

Figure 17 : A : bactéries gram positive (*S. aureus*) et (*lactobacillus),* B : bactéries gram négative (*Pseudomonas).*..... 39

Figure18 : Test catalase…… 40

Figure 19 : Test coagulase…….. 40

Figure 20 : A/Test d'indole, B/Test d'urease…….. 41

Figure 21 : A : pseudofilamentation plus chlamydospores *C. Albicans* B : Absence pseudomycelium : non *C albicans* 41
Figure 22 : Observation microscopique présente *C. Albicans* après test de blastèse..... 42

Liste des tableaux

Tableau 01 : Espèces des lactobacilles isolés de prélèvement vaginal..... 05
Tableau 02 : Composition de la flore vaginale avant la puberté, pendant la grossesse et après la ménopause..... 07
Tableau 03 : Les principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence..... 15
Tableau 04 : Score bactériologique dans la vaginose bactérienne..... 17
Tableau 05 : Facteurs incriminés dans la genèse des candidoses vulvovaginites..... 18
Tableau 06 : Les principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques..... 22
Tableau 07 : présente le comptage de leucocyte, hématies et cellules épithéliale par la Malassez..... 27
Tableau 08 : Aspect de leucorrhée avec les infections suspectes et ses espèces..... 35
Tableau 09 : les mesures de pH des prélèvements vaginales des patientes..... 35
Tableau 10 : les résultats de dénombrements en utilisant la Malassez..... 36
Tableau 11 : L'aspect de colonies des souches isolées 38
Tableau 12 : L'aspect des cellules après une étude microscopique à l'état frais et l'état fixé..... 39

Liste d'abréviations

API : application programing interface

C : candida

CVV : vulvo-vaginite condidosiques

CVVR : vulvovaginite condidosiques récidivante

E. *coli : Escherichia coli*

G*. Vaginalis : Gardenerella vaginalis*

HSV : herpès simplex virus

H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène

IST : infections sexuellement transmissibles

KOH : hydroxyde de potassium

Lb : *lactobacillus*

MIP : maladies Infectuieuse pelvienne

Na Cl : chlorure de sodium

S*. cerevisiae: saccharomyces cerevisiae*

pH : potentiel d'hydrogène

Sp : species

Spp : sub species, species pluralis

UFC : unité formant colonie

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VB : vaginose bactérienne

Résumé :

La flore vaginale grâce à sa dimension, sa diversité, son évolution joue un rôle majeur dans la protection de la muqueuse vis-à-vis de l'infection et l'équilibre physiologique de l'appareil génital féminin.

Notre étude a été effectuée sur 06 femmes de différents tranches d'âge (20-50 ans), au niveau de l'EPSP de Bouziane à Médéa du 25 février jusqu'à 12 mars. Les objectifs visés dans un premier temps étaient d'isoler des souches pathogènes responsables d'infections vaginales afin de connaitre la diversité de cette dernière, en réalisant des cultures, suivies par une coloration de Gram et des tests d'identification spécifiques pour chaque isolat et plus particulièrement les *lactobacillus* et leur caractérisation nous a permis de voir leur effet probiotique comme une mesure de prévention contre les infections vaginales. Dans un deuxième temps nous avons détaillé les syndromes et les complications de la maladie vaginale ainsi que les caractères de résistance ou de sensibilité aux antibiotiques pour approprier un traitement efficace.

Mots clés : flore vaginale, pathogène, caractérisation, probiotiques, *Lactobacillus*.

Summary :

The vaginal flora, due to its size, diversity and evolution, plays a major role in the protection of the mucosa against infection and the physiological balance of the female genital system.

Our study was carried out on 06 women of different age groups (20-50 years), at the EPSP of Bouziane in Médéa from February 25 until March 12. The aimes objectives were to isolate pathogenic strains responsible for vaginal infections in order to know the diversity of the latter, by carrying out cultures, followed by a Gram stain and specific identification tests for each isolate and more particularly *lactobacillus* and their characterization allows us to see their probiotic effect as a preventive measure against vaginal infections. Secondly, we have detailed the syndromes and complications of vaginal disease as well as the characteristics of resistance or sensitivity to antibiotics to appropriate an effective treatment.

Key words: vaginal flora, pathogen, characterization, probiotics, *Lactobacillus.*

ملخص :

تلعب الفلورا المهبلية ، بفضل حجمها وتنوعها وتطورها ، دورًا رئيسيًا في حماية الغشاء المخاطي من العدوى والتوازن الفسيولوجي للجهاز التناسلي الأنثوي.

أجريت دراستنا على 06 نساء من مختلف الفئات العمرية(50-20 سنة) في المركز الجواري الصحي ببوزيان ، بالمدية من 25 فبراير حتى 12 مارس. كانت الأهداف في البداية هي عزل السلالات المسببة للأمراض المسؤولة عن الالتهابات المهبلية من أجل معرفة تنوع الأخيرة، من خلال اجراء الاستنبات، متبوعًا بصبغة جرام واختبارات تحديد محددة لكل عزلة و بشكل أكثر تحديدًا *Lactobacillus* و توصيفها يسمح لنا برؤية تأثير الكائنات الحية المجهرية كإجراء وقائي ضد الالتهابات المهبلية. ثانيًا ، قمنا بتفصيل متلازمات ومضاعفات المرض المهبلي بالإضافة إلى خصائص المقاومة أو الحساسية للمضادات الحيوية لتناسب العلاج الفعال.

الكلمات المفتاحية:

الفلورا المهبلية ، المسببة للأمراض ، التوصيف ،البروبيوتيك ، *Lactobacillus*

TABLE DE MATIERES

Table des matières

Liste des tableaux
Liste des figures
Listes d'abréviations
Résumé
Table de matières
Introduction générale..... 01
Synthèse bibliographique…….. 03

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur la flore vaginale

I.1.La flore vaginale normale 03
I.1.1. L'appareil génitale féminin..... 03
I.1.2. Les principales espèces de la flore vaginale..... 04
I.2. L'évolution de la flore vaginale. 05
I.2.1. Avant la puberté..... 06
I.2.2. Au moment de la puberté..... 06
I.2.3. Chez la femme adulte. 06
I.2.4. Chez la femme enceinte 06
I.2.5. Après la ménopause..... 07
I.3. Le rôle protecteur de la flore de Doderlein..... 08
I.3.1. Inhibition de l'adhésion de pathogène..... 08
I.3.1.1. Production d'acide organique. 08
I.3.1.2. Production de peroxyde d'hydrogène. 08
I.3.1.3. Production de bactériocine et bactériocine-like..... 08
I.3.1.4. Production d'arginine désaminase..... 09
I.3.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène..... 10
I.3.2.1. Adhésion aux cellules vaginales. 10
I.3.2.2. Adhésion à la fibronectine..... 10
I.3.2.3. Production du biosurfactants..... 11
I.3.3. Inhibition de l'expansion du pathogène : Co agrégation..... 12
I.4 Déséquilibre de la flore vaginale..... 12

I.4.1. Les principales infections vaginales. 13
I.4.1.1. La vaginose bactérienne. 13
I.4.1.2. La vulvovaginite candidosique. 17
I.4.1.3. La vaginite bactérienne ou parasitaire. 18
I.4.2. Traitement des infections vaginales. 19
I.4.2.1. Traitement de la vaginose bactérienne. 19
I.4.2.2. Traitement de vulvovaginite candidosique. 19
I.5. Les probiotiques..... 20
I.5.1. Définition des probiotiques..... 20
I.5.2. Caractérisation des probiotiques..... 20
I.5.3. Classification des probiotiques..... 21
I.5.4. Formulation et voie d'administration..... 22
I.5.5. Les lactobacilles en tant que des probiotiques. 23
I.5.6. Probiotiques et infection vaginale..... 23
I.5.6.1. Probiotique et vulvovaginite candidosique..... 23
I.5.6.2. Probiotique et vaginose bactérienne..... 24

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1.Objectif..... 25
II.2.Type d'étude..... 25
II.3.Fiche technique de renseignement..... 25
II.4. Démarche de diagnostique..... 25
II.4.1. Prélèvement. 25
II.4.1.1. Origine de prélèvement..... 25
II.4.1.2. Méthode de prélèvement..... 26
II.5.Analyse microbiologique. 27
II.5.1. L'étude de l'aspect de leucorrhée..... 27
II.5.2. Mesure de pH..... 27
II.5.3. Dénombrement sur une cellule de Malassez..... 27
II.5.4. Le teste de potasse (Snif test) 28
II.5.5. Isolement des souches..... 29
II.5.5.1. Isolement des lactobacilles..... 29
II.5.5.2. Isolement des souches pathogènes..... 29

II.5.6. Identification des souches..... 29
II.5.6.1. Caractérisation morphologique..... 30
II.5.6.1.1. L'aspect de colonies..... 30
II.5.6.1.2. L'aspect de cellules..... 30
a-L'état frais..... 30
b-Coloration de Gram 30
II.5.6.2. Caractérisation biochimique. 30
II.5.6.2.1. *Staphylococcus aureus*..... 30
a-Test de la catalase 30
b-Test de la coagulase 31
II.5.6.2.2. *Escherichia coli*..... 31
a-Fermentation des sucres..... 31
b-La recherche de l'action uréase. 31
c-La recherche de la production d'indole..... 31
II.5.6.2.3.*Candida albicans*..... 32
a-Test de filamentation (test de blastèse) 32
b-Test de chlamydosporulation..... 32
II.5.6.2.4. *Streptocoques*..... 32
a-Test d'agglutination. 32
II.5.6.2.5. Les entérobactéries..... 32
a-Test d'oxydase..... 32
b-Utilisation des galeries API..... 33
II.6. L'activité hémolytique..... 34
II.7. La résistance aux antibiotiques..... 34

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Etude de l'aspect de leucorrhée..... 35
III.2. Mesure de pH..... 35
III.3. Dénombrement sur une cellule de Malassez..... 36
III.4. Isolement des souches 37
III.4.1. Isolement des lactobacilles..... 37
III.4.2. Isolement des souches pathogènes..... 37
III.5. Identification des souches..... 38

III.5.1. Caractérisation morphologique..... 38
III.5.1.1. L'aspect de colonies..... 38
III.5.1.2. L'aspect de cellules..... 39
III.5.2. Caractérisation biochimique..... 40
III.5.2.1. *Staphylococcus aureus*..... 40
III.5.2.2. *Escherichia coli*..... 41
III.5.2.3. *Candida albicans*..... 41
Discussion..... 43
Conclusion 44
Références bibliographiques
Annexes

Références bibliographiques
Annexes

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le corps humain abrite un grand nombre de microorganismes qui se trouvent dans les surfaces et les cavités. Chaque zone du corps a une collection unique de microorganismes, les genres et les espèces des bactéries détectées dépendent des conditions physiologiques présentes dans cette région particulière. Ces microbes sont collectivement appelés la « microflore normale » **(Redondo-Lopez et *al.*, 1990).** Parmi ces flores, se trouve la flore vaginale qui est particulièrement importante par sa dimension, sa diversité, son évolution selon l'âge (la réduction avant la puberté et après la ménopause, au cours de cycle avant et après règles), et son rôle. Ses variations sont sous la dépendance de l'imprégnation oestrogénique de la flore vaginale. Elle joue un rôle majeur dans la protection de la muqueuse vis-à-vis de l'infection et l'équilibre physiologique de l'appareil génital féminin (**Bergogne-Bérézin,2007 ; Belgy,2015).**

Généralement, les lactobacilles présentent la flore dominante, qui colonisent le vagin et assurent leur maintien écologique normale**(Belgy,2015).** Les mécanismes par lesquels elles stabilisent le microbiote vaginal sont la production de composés antimicrobiens (peroxyde d'hydrogène, acide lactique, substances semblables à la bactériocine) et la capacité d'adhérer la paroi vaginale **(Borges et *al*.,2013)** et par contrôle du pH vaginal entre 3,8 et 4,5. Ces mécanismes inhibent la multiplication d'autre bactérie dont la présence est possible à l'état normal **(Menard et Bretelle,2008).**

Les maladies génitales féminines sont fréquentes et multiples grâce à la variété des agents microbiens en cause (**Bergogne-Bérézin,2007).** La perturbation de cette flore peut parfois entraîner ou prédisposer à l'infection qui est la principale étiologie. Dans ces étiologies, on distingue les infections exogènes (essentiellement représentées par les infections sexuellement transmissibles) et les infections endogènes (mycoses, vaginoses, vaginite…) liées à des modifications locales de l'écosystème vaginale **(Bohbot, 2008).**

Le traitement usuel pour ces infections est l'utilisation des antibiotiques, ces derniers puissent être efficaces pour l'éradication de ces infections et la prévention contre leurs complications, mais ils ont de nombreux effets secondaires, le développement des micro-organisme résistants à ces ATB, résulte l'inefficacité du traitement **(Gardiner et *al*.,2002).**

Cela conduit à utiliser de plus en plus souvent des produits correcteurs de la flore vaginale tels que les probiotiques, capables de suppléer la flore défaillante par une flore de remplacement **(Faure et *al*.,2013**). Donc, Quel est l'intérêt des probiotiques dans la prise en charge des infections vaginales ?

Due à la pandémie actuelle de Corona virus (Covid19) qui a touché le monde entier, et l'Algérie en particulier depuis le mois de Février 2020, nous n'avons pas pu finaliser notre étude à cause de la fermeture de toutes les infrastructures universitaires suite aux dispositifs de confinement exigés par l'état Algérien, pour cela notre manuscrit est constitué de deux parties :

Une synthèse bibliographique qui fait l'objet de la première partie de ce travail, elle présente l'écosystème vaginal avec un état des connaissances sur la microflore vaginale, son évolution et son déséquilibre. Dans un second temps, nous étudierons plus particulièrement les pathologies touchant les femmes et le traitement approprie. En outre, l'utilisation des probiotiques et leur efficacité sur l'écosystème vaginale.

La deuxième partie expérimentale décrit le matériel utilisé, les méthodes suivies dans le but d'isoler et identifier les différents germes vaginaux rencontres au cours de l'infection vaginale

PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I :

Synthèse bibliographique sur la flore vaginale

Chapitre I : Synthèse bibliographique sur la flore vaginale

I.1. La flore vaginale normale

I.1.1. L'appareil génitale féminin

L'appareil génitale féminin est beaucoup plus complexe que celui de l'homme, il est à la fois le lieu de reproduction des gamètes femelles, de la fécondation et du développement de l'embryon « étape précoce de développement de déroulant de la fécondation jusqu'à la 8 eme semaine de gestation », puis du fœtus « étape de développement entre la 9eme semaine de gestation et de la naissance » **(Langois et Lepresil, 2001).**

Le tractus génital féminin est constitué par une succession de cavités (trompe de Fallope, cavité utérine, vagin qui communique avec l'extérieur par la fente vulvaire).

Cette structure permet l'évacuation de menstruation et le passage du fœtus à l'accouchement. Elle permet également les rapports sexuels et aussi l'entré des micro-organismes potentiellement pathogènes **(Linhares,2010).**

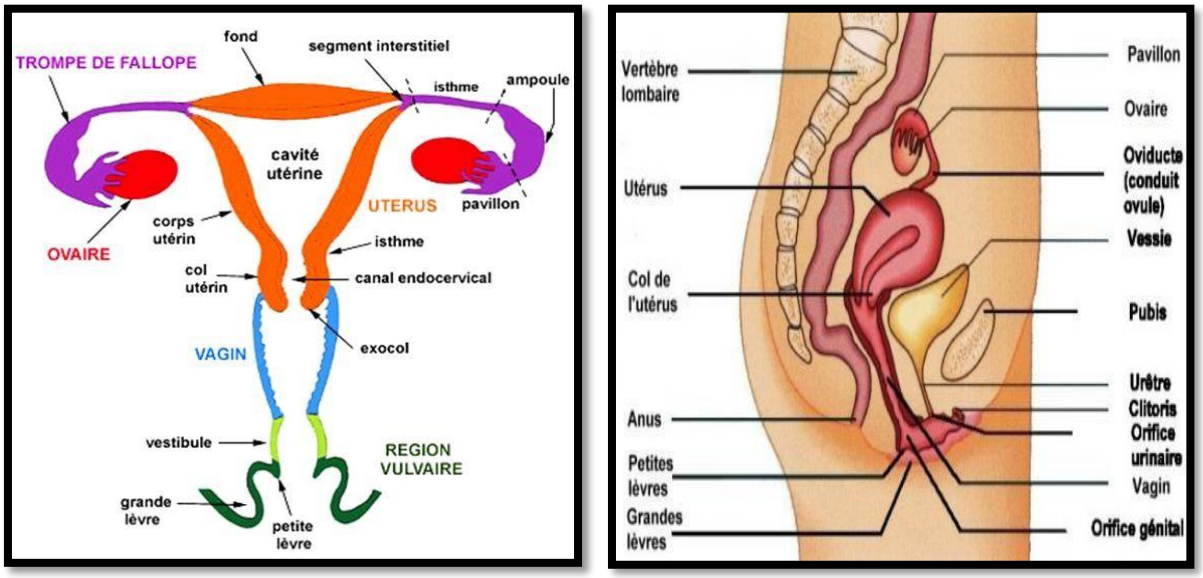


Figure 01 : Structure de l'appareil génitale féminin **:**

(https://www.pinterest.fr/pin/396879785912214775/

https://www.pinterest.fr/pin/566327721869573845/)

Le vagin est l'organe de la copulation qui a une structure tubulaire fibromusculaire de longueur de 6 à 12 cm étendue entre la vulve et le col de l'utérus **(Graziottin et Gambini, 2015)**. Il est formé d'un épithélium stratifié, non kératinisé, en multicouche, les cellules de couche superficielle et moyenne contiennent du glycogène et l'épithélium entier prolifère et épaissit en association avec le cycle menstruelle **(Mcgroarty, 1993).**

Il est constitué d'élément biotique (cellules vaginales exfoliées, leucocytes et bactéries dont la concentration varie de 10^6 à 10^{12} bactéries par gramme de secrétions vaginales) et éléments abiotiques (sécrétions vaginales riches en eau et en substances d'origine plasmatique complétée par les composants de la glaire cervicale présente dans une interdépendance au sein d'un biotique) **(Lefèvre, 2002 ; Quentin, 2006)**.

1.1.2. Les principales espèces de la flore vaginale

A l'état physiologique, il existe dans le vagin une grande diversité d'espèces, on peut les classer en trois populations bactériennes distinctes en fonction de leur origine écologique.

Groupe 1 : flore bactérienne de portage normale spécifiquement adapté à la cavité vaginale avec accessoirement de streptocoques alpha hémolytique et des corynébactéries.

Groupe 2 : flore bactérienne de portage fréquent où se retrouvent les hôtes usuels de la flore digestive *(Streptococcus agalactiae, Entérococcus, Escherichia coli,* Entérobactéries, staphylocoques, bactéries anaérobies, *Gardnerella vaginalis)*

Groupe 3 : flore bactérienne de portage exceptionnel composée d'hôtes usuels de la flore oropharyngée (*Haemophilus influenzae et Para-influenzae, Streptococcus pyogenes*) **(Balaka et *al*., 2005).**

La flore vaginale est représentée essentiellement par la flore de Doderlein.La première description de cette flore remonte à 1892 par A. Doderlein. Chez une femme adulte non ménopause on retrouve 10^7 lactobacilles / ml de secrétions vaginales sur une flore composée au total de 10^8 à 10^9 de germes / ml. En raison des variations naturelles toutes les femmes n'hébergent pas les mêmes lactobacilles et parmi les lactobacilles les fréquemment retrouve sont : *Lactobacillus crispatus ; Lactobacillus jensenii ; Lactobacillus gasseri ; Lactobacillus Iners* **(Bohbot, 2008).**

Tableau 01 : Espèces des lactobacilles isolés de prélèvement vaginale **(Lepargneur et Rousseau, 2002)**

	Antonio,1999 (étude sur 302 femmes)	**Song,1999** (étude sur 91 femmes)	**Boskey,1999** (données bibliographiques)
Lb.cripatus	32%	52,7%	Present
Lb.jensenii	23%	-	Present
Lb.1086V	15%	-	-
Lb.gasseri	5%	20,8%	Present
Lb.fermentum	0,3%	5,5%	Present
Lb.oris	0,3%	-	-
Lb.ruminis	0,3%	-	-
Lb.reuteri	0,3%	-	-
Lb.vaginalis	0,3%	8,8%	-
Lb.plantarum	-	3,3%	-
Lb.salivarius. ssp. Salicinius	-	1,1%	-
Lb.salivarius. ssp .salivarius	-	1,1%	-
Lb.acidophilus	-	-	Présent
Lb.cellobiosus	-	-	Présent
Non identifies	-	6,6%	-
Autre bactéries que lactobacilles	23,5%	-	-

I.2. L'évolution de la flore vaginale

La flore vaginale est un système bactérien dynamique et mouvant qui évolue en fonction des différents stades de la vie génitale. Ce système subit des variations suivant l'imprégnation hormonale (œstrogènes), l'âge, la contraception, l'hygiène et l'activité sexuelle de la femme **(Faure et *al.*, 2013).**

I.2.1. Avant la puberté

Au cours des premières semaines de la vie, le vagin de nouveau-né est sous l'influence des œstrogènes maternels avec la présence de bactéries issues des fèces et des mains de la mère ou de personnel soignant mais cette flore est quantitativement pauvre. Elle est formée essentiellement de bactéries cutanées et fécales (*E. coli, staphylocoque*) **(Bergogne-Bérézin, 2007 ; Lefèvre, 2002).**

A partir de la quatrième semaine et jusqu'à la puberté, les parois vaginales sont fines, le contenu en glycogène des cellules épithéliales est faible, le pH est élevé et la dominance de la flore par des germes anaérobies (**Bergogne-Bérézin, 2007).**

I.2.2. Au moment de la puberté

Avec les niveaux croissants d'œstrogène et la maturation concomitante de l'épithélium qui devient riche en glycogène pendant la puberté, la flore bactérienne se change à prédominance lactobacillaire. Ces lactobacilles produisent l'acide lactique qui est largement responsable du maintien du pH physiologique entre 4.5 et 5 (**Mylonas et Bergauer, 2011** ; **Lefèvre, 2002).**

Des variations transitoires de la flore peuvent être observé au cours du cycle menstruel ; elles surviennent essentiellement dans la première partie du cycle ; suggérant encore ici une influence hormonale **(Lefèvre, 2002).**

I.2.3. Chez l'adulte

Cette évolution se confirme mais va subir des variations liées aux différentes étapes de la vie génitale de la femme. L'écosystème vaginal est fragilisé après les menstruations, l'accouchement et les rapports sexuels, et l'équilibre vaginal sera rompu par un nombre élevé de partenaires sexuels, par la présence d'un stérilet ou d'autres facteurs tels que l'usage de la douche vaginale **(Bergogne-Bérézin, 2007).**

I.2.4. Chez la femme enceinte

Au cours de la grossesse ; la quantité du glycogène augmente dans les cellules épithéliales vaginale ce qui entraine la diminution du pH vaginale ; la multiplication des lactobacilles et raréfaction des bactéries anaérobies. Les espèces bactériennes le plus souvent

isolées dans la flore vaginale normale chez la femme enceinte sont présentes dans le **tableau2** comparativement à celle isolées avant la puberté et après la ménopause **(Lefèvre, 2002).**

Le post-partum constitue aussi l'un des facteurs de variation des flores vaginales et peuvent s'accompagner de risque infectieux. Particulièrement à surveiller après une hystérectomie en phase postopératoire au cours de laquelle est bouleversé l'équilibre bactérien génital **(Bergogne-Bérézin, 2007).**

I.2.5. Après la ménopause

Après la ménopause ; en absence de traitement hormonale ; l'épithélium vaginale redevient très fin ; le glycogène est absent ou en quantité réduite ; les lactobacilles sont plus rares et les bactéries anaérobies strictes redeviennent dominantes **(Lefèvre, 2002).**

Ces conditions causent une diminution quantitative des secrétions naturelles pouvant conduit à une sécheresse vaginale inconfortable ; non seulement lors de relation sexuelle mais également dans la vie quotidienne. Cependant l'adjonction d'une oestrogenotherapie vaginale supplémentaire est parfois nécessaire **(Bohbot, 2008).**

Tableau 02: Composition de la flore vaginale avant la puberté, pendant la grossesse et après la ménopause **(Lefèvre, 2002)**

Espèce bactérienne	**Pourcentage de femmes positives (UFC/ml)**		
	Prépuberté*	**Grossesse****	**Post-ménopause****
Lactobacillus. sp	11($<10^5$)	92(10^7)	49($10^{5)}$
Staphylocoques	68	86	59
Corynébactéries	42	78	58
Streptocoques α-hymolytiques	42	59	74
Gardnerella vaginalis	0	58	27
Bacilles anaérobies à gram négatifs	89(10^7)	90(10^4)	89(10^4)
Peptostreptococcus. sp	89(10^7)	92(10^5)	88(10^5)
Mycoplasma hominis	0	23	0
Ureaplasma urealyticum	20	82	13

I.3. Le rôle protecteur de la flore de Doderlein

La flore de Doderlein joue un rôle important de défense contre l'invasion des pathogènes. Les lactobacilles assurent cette protection par certains nombres de propriétés **(Bohbot ,2008).**

I.3.1. Inhibition de la croissance du pathogènes

I.3.1.1. Production d'acide organique

La principale molécule responsable de l'acidification du milieu vaginale est l'acide lactique. Elle est synthétisée essentiellement via la fermentation du glycogène présent dans le fluide par les lactobacilles pour maintenir un pH vaginale voisin de 4 (**Boskey et *al*., 2001)**.

Le glycogène peut être aussi dégradé en acide lactique par les cellules de l'épithélium. Une étude a montré que plus de 50 % de l'acide lactique est de la forme isométrique D dont les cellules humaines ne peuvent synthétiser que la forme L alors que les bactéries produisent les formes D, L ou DL en mélange **(Lepargneur et Rousseau, 2002).**

I.3.1.2. Production de peroxyde d'hydrogène

Les lactobacilles présents dans le vagin sont censés réguler la croissance d'autres flores vaginales. Ces bactéries manquent d'hème, n'utilisent pas le système cytochrome (qui réduit l'O_2 à H_2O_2) pour l'oxydation terminale, mais elles utilisent des flavoprotéines qui convertissent l'O2 en H_2O_2. Ce mécanisme conjugué à l'absence de la protéine hème catalase, entraîne généralement la formation de H_2O_2 en quantités supérieures à la capacité de l'organisme à le dégrader **(Eschenbach et *al*., 1989).** La toxicité de peroxyde d'hydrogène est due à un effet oxydatif exercé par la molécule elle-même ou par ses métabolites. Ces produits induisent la mort cellulaire d'une façon non spécifique par leurs actions sur les acides nucléiques, les protéines et d'autres molécules biologiques **(Lepargneur et Rousseau, 2002).**

Le H_2O_2 est susceptible, à concentrations élevés, d'inhiber le VIH. Tous les lactobacilles isolés dans le vagin ne sont pas dotés de la même capacité de production de H_2O_2 **(Bohbot, 2008).**

I.3.1.3. Production de bactériocines et bactériocine-like

Les bactériocines sont des substances protéiques bactéricides qui ont un spectre d'activité étroit inhibant les souches de la même espèce ou étroitement apparentées, par contre

les bactériocines like ont un spectre d'activité plus large inhibant des bactéries gram positive, gram négative et champignons **(Mcgroarty ,1993).** Ces composés agissent en créant des pores au niveau de la membrane induisant la lyse cellulaire **(Lecompte, 1999).**

Un certain nombre d'investigateurs ont isolés des peptides antimicrobiens des souches de lactobacilles, il s'agit de : la lactoline, l'acidoline, la lactocidine, la lactobacilline et l'acidophilline de *Lb.acidophilus,* la lactobrevine de *Lb.brevis,* la bulgaricane de *L. bulgaricus.* Aussi, *lb casei GR*-1 qui a un effet inhibiteur sur certains souches d'*E coli*, elle peut réduire leur nombre de 86% à 97 %en 4 heure dans les urines (**Mcgroarty et ried, 1988).**

I.3.1.4. Production d'Arginine désaminase

L'activité de l'arginine désaminase serait une voie métabolique permet de transformer l'arginine en citruline et ammoniaque pour déclencher l'apoptose des agents pathogènes par la privation d'arginine, aussi une source essentielle de charbon, l'azote et l'énergie pour les bactéries. En cas d'une vaginose bactérienne, les bactéries pathogènes peuvent générer la puterxine à partir de l'arginine en utilisant l'arginine décarboxylase, tout ça provoque l'alcanisation du milieu, l'inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire capable de contrecarrer la croissance anormale de micro-organisme anaérobie **(Famularo et *al.*, 2001) Figure 02.**

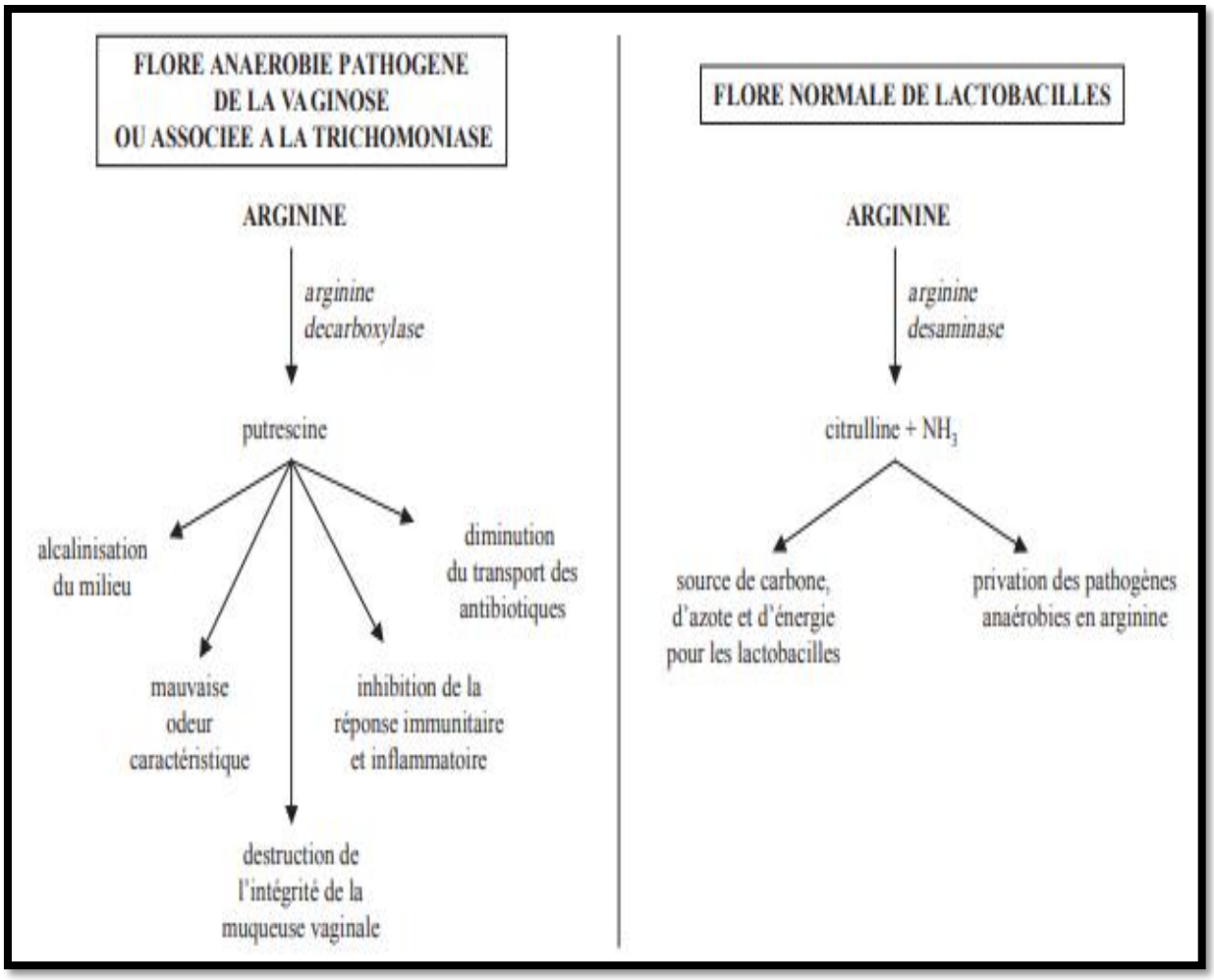


Figure 02: Effets des lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase **(Lepargneur et Rousseau, 2002)**

I.3.2. Inhibition de l'adhésion du pathogènes

I.3.2.1. Adhésion aux cellules vaginale

Spécifique par la fixation sur des récepteurs cellulaires à l'intermédiaire d'adhésines sécrétées par les lactobacilles, ou par un processus non spécifiques (actions physicochimiques :forces de Van der Waals, forces électrostatiques...). Cette adhérence aboutit à la création d'un biofilm, véritable barrière protectrice vis-à-vis de la muqueuse vaginale **(Bohbot, 2008).**

I.3.2.2. Adhésion à la fibronectine

Les lactobacilles sont également capables d'adhérer à la fibronectine, protéine favorisant la fixation de microorganismes (dont certains pathogènes) aux cellules vaginales. Cette liaison fibronectine-lactobacilles limite ainsi la capacité pathogène d'autres micro-organismes **(Bohbot, 2008).**

I.3.2.3. Production des biosurfactants

Les biosurfactants sont des molécules amphipatiques qui contient à la fois des domaines hydrophobes et hydrophiles, ces composées peuvent être des protéines, glucides ou glycoprotéines **(Spurbeck et Arvidson, 2011).** Ils présentent une activité antibiotique, antifongique et antivirale contre divers microbes**(Bohbot,2008)** et ils peuvent être impliquer dans l'adhésion microbienne(*lactobacillus spp* étaient capable de déplacer les souches *d'Entérococcus faecalis* uropathogènes,*Lb acidophilus* synthèse la surlactine qui a un effet inhibiteur sur l'adhésion *d'Ecoli,staphylococcus epidermidis* et *candida albicans*) ,en outre la quantité d'un biosurfactant qui est nessecaire pour exercer un effet majeur est extrêmement faible. Par conséquent, le rôle de ces composés dans les phénomènes d'adhérence peut avoir été précédemment sous-estimé **(Boris et Barbès, 2000) Figure 03.**

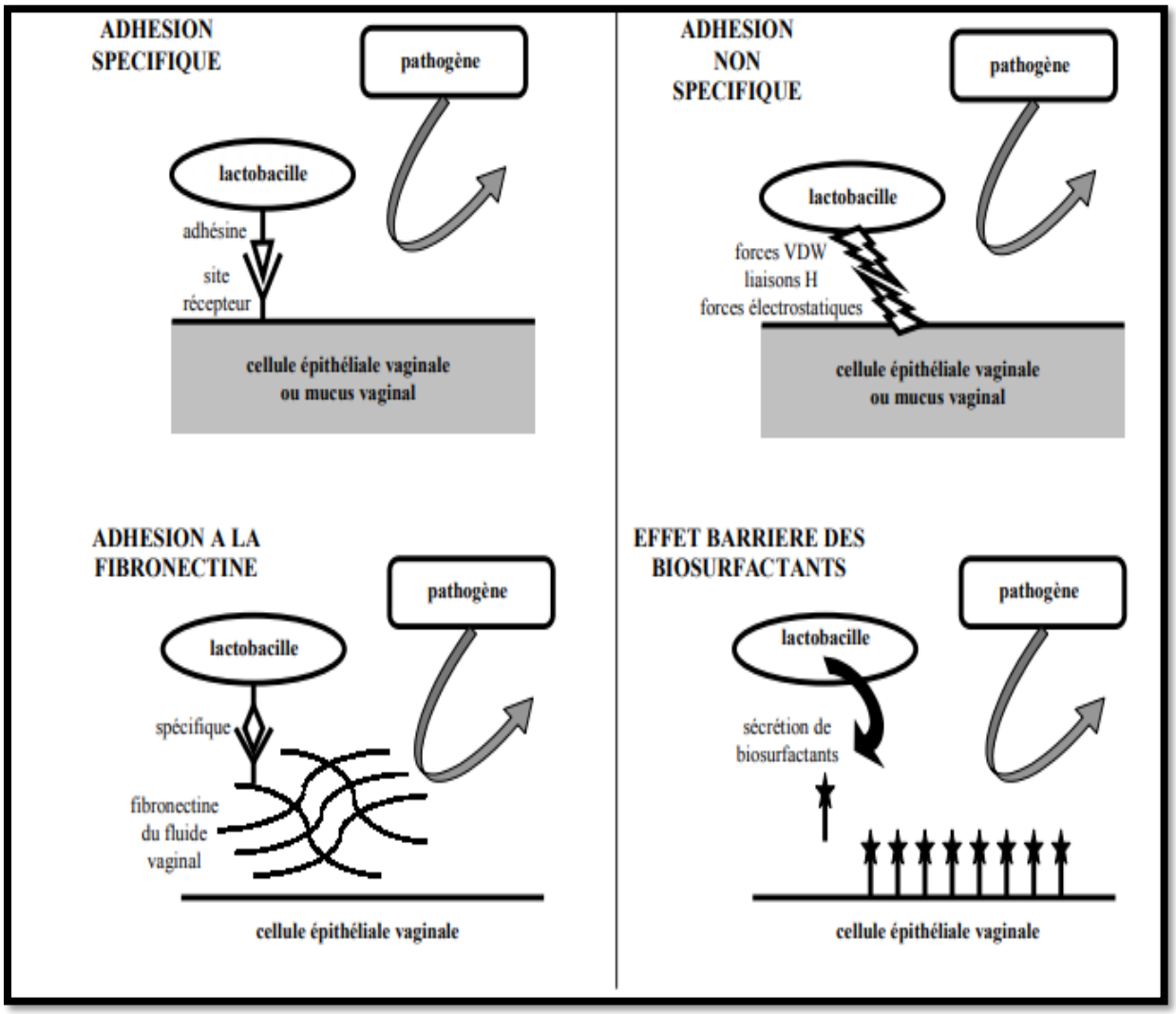


Figure 03:Mécanismes impliqués dans le phénomène d'adhésion **(Lepargneur et Rousseau, 2002)**

I.3.3. Inhibition de l'expansion des agents pathogènes : la co-agrégation

Les lactobacilles peuvent également protéger le tractus vaginal contre l'infection en agrégeant avec l'agent pathogène, séquestrant ainsi le pathogène de sorte qu'il est empêché d'adhérer à l'épithélium hôte. Cela permet de l'enlever plus efficacement par le liquide vaginal ou par les produits antimicrobiens sécrétés par les lactobacilles **(spurbeck et arvidson, 2011).**

I.4. Déséquilibre de la flore vaginale

Dès que le nombre de lactobacilles diminue, la flore vaginale très sensible se déséquilibre et perd ses caractéristiques protectrices des infections. Quand une infection génitale a lieu, celle-ci peut être due à une contamination exogène (c'est ce qui se passe lors d'infections sexuellement transmissibles), ou due à un déséquilibre de la flore commensale avec une diminution voire disparition des lactobacilles et une prolifération anormale de micro-organismes normalement présents en faible quantité **(Berrebie et Ayoubi, 1999).**

Les facteurs pouvant déséquilibrer la flore sont multiples, tels que :

-Les rapports sexuels : La persistance de composés spermatiques chez des femmes ayant des rapports sexuels fréquents modifie durablement le pH cervicovaginal qui se rapproche alors de la neutralité, ce qui favoriserait la survie génitale de VIH (**Bélec.L ,2002**).

-Les troubles hormonaux :

-Au cours du cycle menstruel : De nombreux changements de la flore vaginale surviennent dans la première partie du cycle, on observe à cette occasion une diminution de la concentration lactobacillaire lors des premiers jours des règles et une augmentation du pH dû à la présence de sang et de son effet tampon.

-Chez la femme ménopausée : La ménopause est accompagnée d'une diminution de la sécrétion d'œstrogènes et d'une atrophie du vagin. Il apparait donc un appauvrissement de la sécrétion de glycogène ce qui engendre une augmentation du pH vaginal et une diminution des *Lactobacillus* **(Turovskiy et *al*.,2011).**

-Traitement antibiotique : Les lactobacilles de la flore vaginale sont très sensibles aux antibiotiques, en particulier aux macrolides et aux tétracyclines souvent prescrits dans les infections gynécologiques, mais aussi à la plupart des grandes familles de molécules. Ceci

entraîne directement le déséquilibre de l'écosystème vaginal dès la mise en œuvre de la moindre antibiothérapie. Seuls le métronidazole et les quinolones semblent peu actifs sur la flore de Doderlein **(Lepargneur et rousseau,2002).**

- **Le stress** : à ce jour, une seule étude publiée a examiné la relation entre le stress et la vaginose bactérienne. Dans cette étude transversale des femmes enceintes, le rapport de sujet d'un niveau de stress modéré à élevé a été associé à 2,2 à 2,3 plus grandes chances de vaginose bactérienne. Donc un stress psychosocial accru est associé à une plus grande prévalence et incidence de la vaginose bactérienne indépendante des autres facteurs de risque **(Nansel et *al*.,2006**).

-**Autres** : la douche vaginale**,** états d'immunodéficience, corps étrangers, dispositifs intra-utérins, bain moussant, antiseptiques locaux**(Lefèvre,2002).**

I.4.1. Les principales infections vaginales

Un changement de la composition du microbiote vaginal peut être associé à une vaginose bactérienne , ce qui signifie une modification profonde de la flore commensale avec une quasi-disparition des lactobacilles et un développement anormal d'une flore vaginale pluri microbienne comprenant d'autres bactéries principalement anaérobies stricts à savoir : (*Gardnerella vaginalis, Bacteroides* species, *Peptostreptococcus, Prevotella, Mobilincus, Porphyromonas, Atopobium*) et d'*Ureaplasma urealyticum, Mycoplasma hominis*. Ces bactéries deviennent majoritaires dans le vagin, elles alcanilisent la cavité vaginale et rendent le pH supérieur à 4.5 **(Berrebi et Ayoubi, 1999).**

Gardnerella vaginalis est la bactérie dominante chez plus de 80% des femmes présentant une vaginose bactérienne avec 10^{7} à 10^{9} CFU/mL d'exsudat **(Sedallian et *al.,* 1995).**

De plus *Gardnerella vaginalis* est présent en petite quantité chez beaucoup de femmes ne présentant aucun signe d'infection, cependant, la concentration de ce germe chez les femmes ayant une vaginose est supérieure de 2 à 3 log à celle retrouvée chez les femmes normales. **(Sedallian et *al.,* 1995).**

I.4.1.1. La vaginose bactérienne

Des syndromes et des tableaux microbiologiques comparables à ce que l'on appelle « **vaginose bactérienne** » ont été publiés dès la fin du XIXème siècle et au début du XXème

siècle. Il s'agit de perturbation de l'écologie microbienne polymorphe de bactéries usuellement présentes dans le vagin. On estime que la prévalence de la vaginose bactérienne (VB) en France est de 15 à 20 %. La vaginose bactérienne représente l'infection vaginale la plus fréquente. **(Bohbot, 2006).**

Dans le monde industrialisé, on observe deux fois plus de vaginose bactérienne que de candidose. Et cinq à dix fois plus de vaginose bactérienne par rapport aux infections par *Trichomonas vaginalis* **(Bohbot, 2006).**

La vaginose bactérienne est une infection courante, non inflammatoire du vagin qu'il se caractérise par une flore microbienne comprenant *G. Vaginalis,* avec des bactéries anaérobies (surtout *provetella spp, Peptostreptococccus, Mobilunums*) qui remplace les lactobacilles normalement prédominantes **(McGroarty, 1992)**.

G. vaginalis serait la bactérie la plus virulente. En effet, à elle seule, elle est à la fois capable d'adhérer aux cellules de l'épithélium vaginal, de former un biofilm et de posséder une forte activité cytotoxique. La VB se manifeste essentiellement par la présence de clue-celles à l'examen directe **(Bohbot et Lepargneur, 2012). Figure 04**

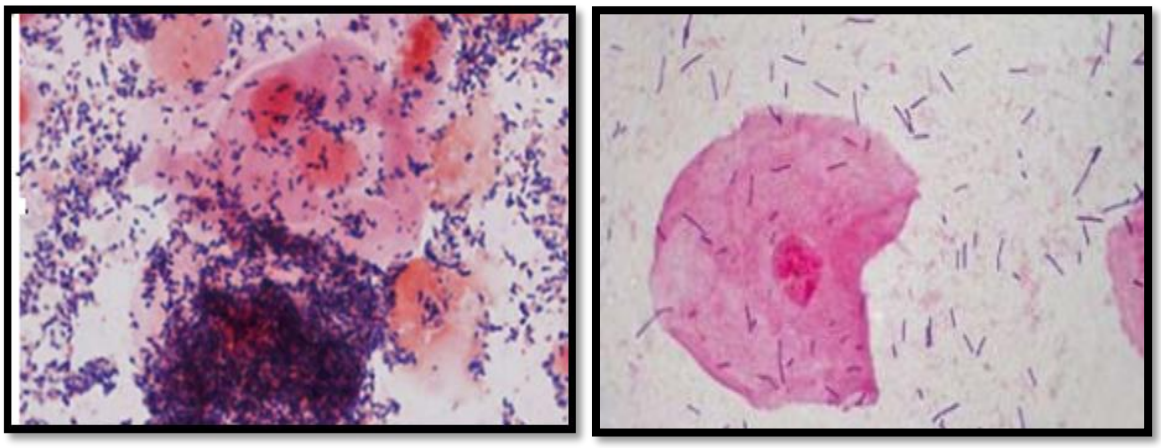


Figure 04 : Flore vaginale normale (à droite) et cellules épithéliales (clue cell) recouvertes des bactéries (à gauche) **(Menard et Bretelle, 2008)**

La vaginose n'est pas une infection au sens stricte, mais elle rend le vagin plus fragile aux Microbes dangereux **(Hay ,2000).** Elle est le problème majeur de la prématurité, de chorioamniotite et de l'avortement. Ainsi, elle favorise l'acquisition d'IST comme les infections à *Nisseria gonorrhoeae* et a *chlamydia trac*e *homatis* et du VIH. De même, la VB facilite la réplication et l'excrétion d'HSV et donc sa transmission **(Bohbot et Lepargneur, 2012).**

Dans les vaginoses, *Gardnerella vaginalis* est retrouvé de manière quasi constante soit dans 82% des cas, *Prevotella sp* dans 44%, *Fusobacterium sp* dans 11% et *Mobiluncus* dans 25%, Seulement 5% des vaginoses bactériennes sont caractérisées uniquement par des concentrations élevées de germes anaérobies et de mycoplasme, sans prolifération de Gardnerella. **(Spiegel, 1991).**

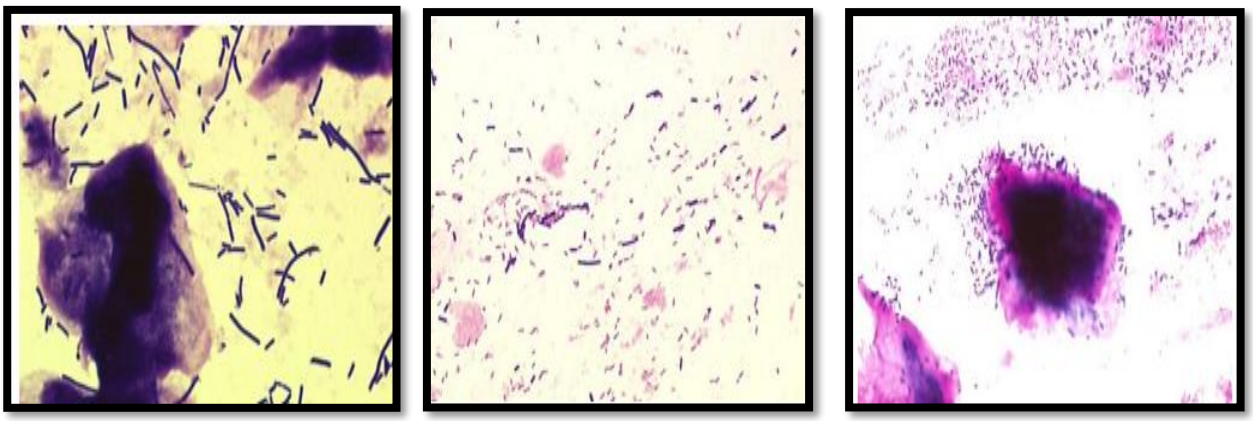


Figure 05. Schéma représente **A** : la flore normale **B** : la flore intermédiaire **C** : la vaginose bactérienne **(Brabant, 2016).**

Tableau 03 : Les principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence **(Spiegel, 1991).**

Bactéries	Flore normale	Vaginose
Prevotella	40 %	91 %
Peptostreptococcus	60 %	80 %
G.vaginalis	11-69 %	90 %
Mo.curtisii et mulieris	<6%	14-96 %
My.hominis	0-22 %	24-75 %
U.urealyticum	50 %	50 %
My.genitalium	10 %	<10 %
Atopobium vaginae	0-8 %	40-70 %

Dans ce tableau en retrouve les principales bactéries de la flore vaginale normale retrouvées en grande quantité dans les tableaux de vaginose bactérienne et prévalence **(Spiegel, 1991).** Mais aussi *: Streptococcus acidominus, S.intermedius, S. mobillorum, Atopobium rimae, Bifidobacterium urinalis, Leptotrichia amnionii, Sneathia sanguinegens, etc…*

Concernant le diagnostic clinique de la vaginose bactérienne, il est nécessaire que les critères **AMSEL** soient présents : **(Amsel et al, 1983).**

- Leucorrhées grisâtres malodorantes
- pH vaginale > 4,5
- Amine test ou Sniff test ou test à la potasse positif

Le diagnostic basé sur ces critères est caractérisé par le score de Nugent ≥ 7 (score basé sur l'observation par coloration Gram de la morphologie bien caractéristique des bactéries issues de prélèvements vaginaux) :

- score de 0 à 3 : flore normale dominée par des lactobacilles,
- score de 4 à 6 : population intermédiaire avec présence de Gram négatif ou Gram variable
-score de 7 à 10 : vaginose avec forte diminution de lactobacilles **(Nugent et *al*., 1991).**

Le Sniff test est réalisable en salle de consultations, il consiste à laisser tomber une goutte de solution de potasse à 10% sur les leucorrhées prélevées sur une lame de verre. Ce mélange va libérer immédiatement une odeur caractéristique désagréable de poisson avarié « sniff test » due aux amines libérées par les bactéries anaérobies. Ce test olfactif est très sensible et très spécifique avec des valeurs prédictives positives et négatives supérieures à 93% (**Eschenbach et Hillier., 1996**).

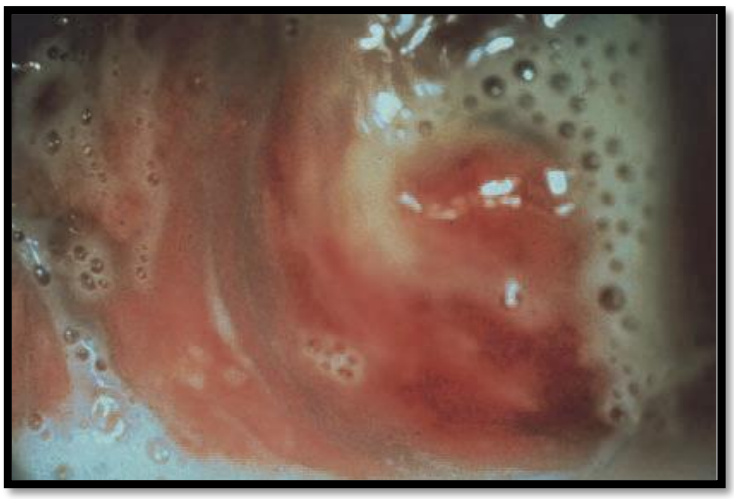


Figure 06 : Image d'une vaginose près du col **(Delcroix, 1994).**

Plusieurs auteurs ont proposé des classifications de la flore vaginale permettant le diagnostic de vaginose par l'examen d'un frottis de sécrétion vaginale après coloration de Gram.

Deux on fait leur preuve. Celle de Spiegel et al en 1983, qui permet de classer la flore vaginale en trois grades, et celle de Nugent et al qui est dérivés de celle de Spiegel et *al*.

Ci-dessous le tableau explicatif du calcul du score ainsi que la classification en trois groupes :

Tableau 04 : Score bactériologique dans la vaginose bactérienne (http://www.labolecerf.fr/pro/prevag.htm, Prélèvement vaginal-Vaginite, vaginose-Laboratoires de Biologie médicale Selarl Lecerf et Associés)

Score	*Lactobacillus spp*	*Gardnerella*	*Mobiluncus*
0	++++	0	0
1	+++	+	+/++
2	++	++	+++/+++
3	+	+++	
4	0	++++	

Beaucoup se basent essentiellement sur les critères cliniques de la méthode d'Amsel alors que celle-ci est limite dans la mesure où une forte proportion de femmes porteuses de vaginoses bactériennes sont asymptomatiques **(Amsel et *al*., 1983).**

I.4.1.2. Vulvo-vaginite condidosiques

Vulvo-vaginite condidosiques est une atteinte infectieuse de la vulve et du vagin par des levures du genre candida *(c. albicans, c. glabrata* et d'autre espèces qui sont responsables d'une très faible minorité des cas comme *: C. tropicalis, C. parapsillosis et c. krusei*) C'est une infection mycosique caractérisée par de leucorrhées blanchâtres caillebottées **(Anane et *al*.,2010 ; Amouri et *al*.,2010)**, la patiente se plaint aussi de prurit, de brulures en fin de miction et de dyspareunie **(Leblanc, 2009).**

La grossesse, l'hygiène fréquente, la multiparité, le diabète ancien, sont les principaux facteurs des risques de la CVV **(Anane et *al*., 2010) Tableau 05.**

Tableau 05: Facteurs incriminés dans la genèse des candidoses vulvovaginites **(Anane et *al*., 2010)**

Facteur favorisants	Nombre des patientes	Nombre des cultures positives	P
Grossesss Oui Non	 288 1127	 153(53,1) 362(32,1)	 <0,001
Hygiène fréquant Oui Non	 723 692	 283(39,1) 232(33,5)	 0,031
Multiparité ≤2 >2	 965 450	 320(33,1) 195(43,3)	 0,0002
Avortements multiples ≤2 >2	 1314 101	 468(35,6) 47(46,5)	 0,028
Diabète Oui Non	 90 1325	 40(44,4) 475(35,8)	 0 ,113
Ancien diabète ≤3 >3	 25 42	 8(32) 28(66,6)	 0,02

I.4.1.3. Vaginite bactérienne ou parasitaire

Les vaginites sont de plus mauvais pronostic que les vaginoses dont les complications peuvent porter atteinte à la fertilité de la patiente. Elles se définies par la prolifération d'un seul agent infectieux. Les entérobactéries, les streptocoques B, *E.coli* (type K1), staphylocoques, sont les principaux germes bactériennes, *Trichomonas Vaginalis* représente le plus parasite incrimine en vaginite parasitaire qui est à contamination vénérienne. Les vaginites sont caractérisées par de brulure vulvo-vaginale, de leucorrhées jaunâtres, purulentes et d'un érythème muqueux **(Leblanc, 2009).**

L'examen direct au microscope optique permet de mettre en évidence le parasite dont la culture n'a pas d'intérêt. **Figure 07.**

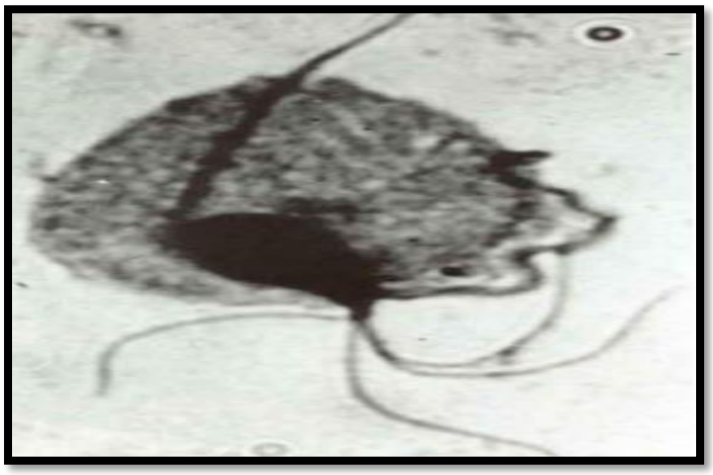


Figure 07 : *Trichomonas vaginalis* sous le microscope optique **(CNGOF ,2011).**

I.4.2. Traitement des infections vaginales

Dans la majorité des cas les manifestations génitales à caractères infectieux, le recours d'un traitement anti-infectieux par voie systémique n'est pas préconisé **(Bergogne-Bérézin, 2007).**

I.4.2.1. Traitement de vaginose bactérienne

En cas d'une VB, le traitement a deux objectifs :

- Le premier est pour la correction des signes fonctionnels (odeur, pertes abondantes) par un retour à une flore normale ; le traitement s'adresse alors à la vaginose bactérienne symptomatique.
- Le second implique un dépistage de la VB asymptomatique durant la grossesse pour prévenir les complications obstétricales **(Menard et Bretelle, 2008).**

Le traitement repose sur différents médicaments : le métronidazole per os à la dose 500 mg deux fois par jour pendant 7 J, ou par voie locale, un ovule par jour pendant une semaine et la clindamycine 300 mg par voie orale deux fois par jour pendant 7 J. L'efficacité de ces traitements sur les symptômes de VB est bien démontrée et se situe entre 70 % à90 % **(Bohbot et lepargneur, 2012).**

I.4.2.2. Traitement de vulvo-vaginites condidosiques

Pour une meilleure prise en charge diagnostique et thérapeutique on distingue :

Les CVV simples, non compliquées caractérisées par des signes cliniques modérés et une prévalence de *C. albicans*, par ailleurs Les CVV compliquées regroupent une CVVR,

symptomatologie sévère et prévalence des espèces non *albicans*. Donc les CVV simples sont traités en utilisant soit un traitement par voie générale de courte durée, soit des antifongiques locaux pendant 7J. En cas des CVVR, compliquées, les antifongiques azolés topiques sont utilisées pendant 7à14j ou du fluconazole par voie générale en 3 doses séquentielles chaque 3j (1, 4,7) **(Amouri et al, 2010).**

En cas d'isolement des *C.non albicans* comme *C. glabrata* un traitement avec l'acide borique ou du flucytosine seul ou en combinaison avec l'amphotericine B **(Jack et Sobel, 2006).**

La vaginite bactérienne nécessite des produits locaux : polygynax, amphycycline, Colposeptine en ovule avec une base de métronidazole avec des différentes doses**. (CNGOF ,2011).**

I.5. Les probiotiques

I.5.1. Définition

Le développement des probiotiques au cours de la dernière décennie a marqué une avancée importante dans le transfert de l'industrie alimentaire vers le développement d'aliments fonctionnels. Le terme probiotique, popularisé par R. Fuller en 1989, a été défini récemment par un comité d'experts comme « micro-organismes vivants qui, lors de l'ingestion en certains nombres, exercent des bienfaits pour la santé au-delà de la nutrition générale inhérente ». Cette définition cependant, fixe les exigences que les micro-organismes doivent être vivant, non pasteurise ou autrement inactives **(Ouwehand et *al*., 2002).**

I.5.2. Caractéristiques

Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en général l'intestin et, d'autre part, agir. Par ailleurs, leur ingestion doit être sans risque pour l'hôte **(Figure 8).**

La souche doit être : parfaitement identifiée (phénotypiquement et génotypiquement), d'origine humaine, stable au cours du procédé de fabrication et de sa conservation avant utilisation. Elle doit résister aux stress physiologiques rencontrés lors de son ingestion (pH acide de l'environnement gastrique, résistance aux sels biliaires), et doit adhérer afin d'assurer un contact maximum avec la muqueuse intestinale. Par ailleurs, les probiotiques doivent être

dénués de pathogénicité. Enfin, cette souche doit avoir des effets bénéfiques prouvés chez l'hôte. **(Butel, 2014).**

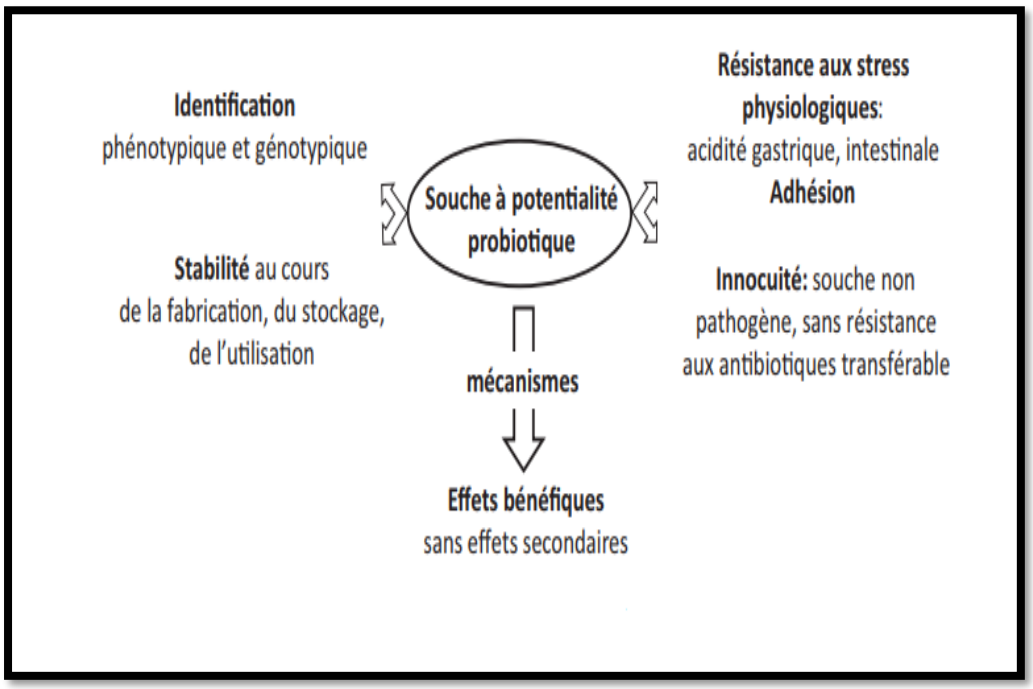


Figure 08 : Caractéristiques des souches probiotiques **(Butel, 2014)**

I.5.3. Classification des probiotiques

Les probiotiques sont constituées de bactéries ou de levures **(Tableau 06)** ; on distingue :

- les bactéries lactiques (lactobacilles et coques), les plus représentées, qui fermentent les glucides pour induire la production d'acide lactique.
- les bifidobactéries, qui dégradent le glucose en acide lactique et acétique.
- les levures, qui proviennent de la souche *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* et d'autres souches

Les probiotiques peuvent être retrouvés dans l'alimentation (yaourts), les compléments alimentaires ou dans des médicaments. Les produits contenant ces micro-organismes vivants doivent fournir une dose appropriée de bactéries probiotiques afin d'exercer les effets recherchés **(Faure et *al*., 2013).**

Tableau 06 : Les principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques (**Faure et *al*.,2013)**

Genre	Espece
Lactobacillus	*Lb. Rhamnosus* *Lb. acidophilus* *Lb. casei* *Lb. bulgaricus* *Lb. gasseri* *Lb. reuterii* *Lb. plantarum* *Lb. sporogenes*
Bifidobactérium	*B. longum* *B. breve* *B. infantis* *B. bifidum* *B. adolescentis*
Lactococcus	*L. cremoris* *L. lactis*
Streptococcus	*S. thermophiles*
Entérococcus	*E. faecium*
Pediococcus	*P. acidilactici*
Bacillus	*B. cereus* *B. subtilis* *B. licheniformis* *B. megaterium* *B. clausii* *B. laterosporus* *B. pumilus*
Saccharomyces	*S. cerevisiae* *S. cerevisiae var boulardii*

I.5.4 Formulation et voie d'administration

Les probiotiques vaginales ont été principalement développées sous forme de comprimés vaginaux, capsules ou suppositoires. Ces formes de dosage sont caractérisées par une faible teneur en humidité qui est une exigence importante pour l'entretien de la viabilité Lb tout le long du stockage **(Palmeira et *al*., 2015).**

Les voie d'administration les plus connues sont : orale, vaginale et par l'insertion de lb par l'intermédiaire d'une capsule qui est un moyen efficace pour stimuler le contenue de la flore et réduire la capacité des certain pathogènes à dominer. Ried et ses collègues ont constatés que la combinaison de souches lb réduire la fois les levures et les agents pathogènes dans le vagin même lorsqu'ils sont pris par voie orale **(Santosh et *al*., 2011)**

I.5.5 Les lactobacilles en tant que probiotiques

Parmi les espèces utilisés en tant que des probiotiques, on trouve des souches de *bifidobacterium, bacillus* ou en levures comme *S. cerevisiae et lactobacillus* (**Allaert et Pillon, 2011).**

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Les cellules à coloration de Gram positive, non sporulées et généralement non mobiles, peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes. La plupart de lactobacilles se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches thermophiles restent viables à 55°C **(Tailliez, 2004).**

Les lactobacilles peuvent être utilisé par voie orale ou vaginale pour coloniser le vagin et prévenir des récidives. Les acidifiants (acide ascorbique et acide lactique) sont également utilisés **(Menard et Bretelle, 2008).**

I.5.6 Probiotiques et infections vaginales

Malgré le traitement approprié pour diminuer le risque des infections, les taux des récidives sont très importants. Cela conduit à utiliser de plus en plus souvent des produits correcteurs de la flore vaginale tels que les probiotiques, capable de suppléer la flore défaillante par une flore de remplacement **(Faure et *al*.,2013).**

I.5.6.1. Probiotiques et vulvovaginite condidosiques

Certaines souches probiotiques telles que *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus crispatus* et *Lactobacillus jensenii* ont une activité anti-Candida. La recolonisation vaginale par les *Lactobacillus acidophilus* permet de restaurer le pH vaginal et d'activer la croissance normale de la flore bactérienne. Cette méthode nécessite une administration intra vaginale de *Lactobacillus* en capsule avec ou sans probiotiques orale trois fois par semaine. Il a été démontré que l'ingestion de 125 g de yoghourt, contenant des *Lactobacillus*, chaque jour constitue aussi un moyen de prophylaxie contre la colonisation de Candida. Cependant, le

bénéfice de l'utilisation des probiotiques dans la prévention des CVVR est discuté **(Amouri et *al*., 2010).**

Des études in vitro ont montré que les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de *C. albicans* et/ou son adhérence à l'épithélium vaginal. Les résultats de certains essais cliniques supportent l'efficacité de certaines souches de lactobacilles telles que *Lb. rhamnosus GR-1* et *Lb. fermentum RC-14* administrés soit oralement, soit par voie vaginale. Ces derniers permettraient une colonisation du vagin et la prévention de la colonisation et de l'infection par *C. albicans* **(Faure et *al*., 2013).**

I.5.6.2. Probiotiques et vaginose bactérienne

Des souches exogènes de lactobacilles ont été suggérées comme moyen d'établir ou de rétablir une flore vaginale normale. Les souches probiotiques de *Lb. fermentum et de Lb. rhamnosus* ont été utilisées avec des résultats médiocres dans l'infection vaginale, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elles ne sont pas normalement présentes dans le vagin. Par contraste, *Lb. crispatus* pourrait être un meilleur choix car il domine numériquement dans le vagin sain et 95% des souches produisent H_2O_2. Les lactobacilles producteurs de H_2O_2 activent l'immunité innée, ce qui se traduit par une stimulation de la sécrétion, par les cellules épithéliales vaginales, de peptides antimicrobiens (lactoferrine et muramidase) **(lepargneur, 2016).**

De même, *Lb. crispatus* peut avoir une capacité supérieure à persister dans le vagin et il a été démontré que les souches de probiotique *Lb. crispatus* adhéraient aux cellules épithéliales vaginales in vitro et que la colonisation vaginale était établie chez 7 femmes sur 9 lors l'administration par voie vaginal (**Lamont et *al*., 2011).**

PARTIE EXPERIMENTALE

CHAPITRE II:

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : Matériel et méthodes

II.1. Objectif

L'objectif de notre travail est d'étudier la diversité de la flore vaginale, et plus particulièrement le dénombrement et la recherche des lactobacilles à caractères probiotiques chez des femmes atteintes de diverses infections consultant au niveau du laboratoire de microbiologie du pôle urbain de Médéa au cours de 15 jours.

II.2. Type d'étude

Notre étude rétrospective s'est étalée entre 25 février jusqu'à 12 mars, portant sur 6 prélèvements vaginaux reçus des patients sains ou suspectés de maladie vaginale de différentes tranches d'âge à consultation externe à l'établissement public de santé de proximité de Bouziane à Médéa pour un prélèvement et un diagnostic vaginal.

II.3. Fiche technique de renseignement

Une fiche d'exploitation a été remplie, elle comporte les données basiques de la patiente (Age, nombre de prélèvement, motif de consultation, grossesse, la présence des signes fonctionnels (leucorrhées, prurit, brulure…) le traitement en cours) **(voir Annexe 1)**

II.4. Démarche de diagnostic

La démarche diagnostic d'un frotti vaginal comporte les étapes successives suivantes :

1 – le prélèvement

2 – l'examen direct

3 – la mise en culture

4 – identification.

II.4.1. Prélèvements

II.4.1.1. Origine des prélèvements

Les prélèvements sont effectués sur des femmes de différents âges entre (20-50 ans) ayant consultés au niveau d'EPSP de Bouziane à la wilaya de Médéa.

Le prélèvement se fait de préférence en dehors de période menstruelle et avant tous antibiothérapie, et sans avoir procéder à une toilette intime récente (gel, crème, ovule

injection) dans les 24 heures qui précèdent, et ainsi que tout rapport sexuelle le jour précédant l'examen. Ce prélèvement ne peut être fait qu'au laboratoire ou en clinique.

II.4.1.2. Méthode de prélèvement

Le prélèvement vaginal est réalisé par le gynécologue, à l'aide de deux ou trois écouvillons stériles et après de poser d'un spéculum au niveau de col de l'utérus ; un écouvillon est introduit dans le vagin (exocol, endocol ou cul de sac) et en lui imprimant un mouvement rotatif et on ramène la plus grande quantité possible de secrétions vaginales puis on replace les écouvillons dans leur étui sans toucher l'ouverture.

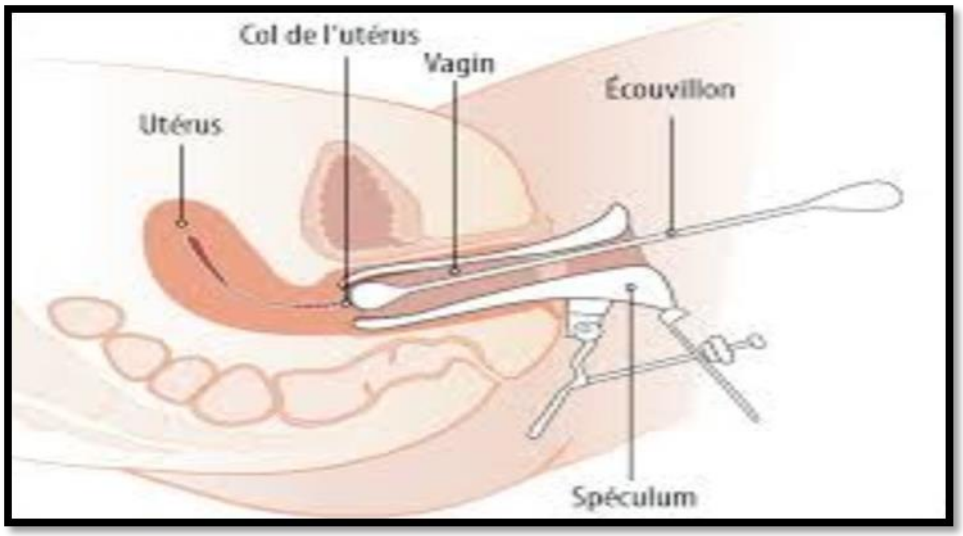


Figure 09 : Technique de prélèvement vaginale (http://www.corevih-auvergne-loire.org)

L'auto prélèvement peut être proposé à la patiente si elle n'accepte pas de poser un speculum, dans ce cas des explications claires doivent lui être données pour que le prélèvement effectué soit de qualité. Un écouvillon est alors remis à la patiente qui réalise elle-même le prélèvement en suivant les étapes suivantes :

- se laver les mains tous d'abord
- ouvrir le sachet contenant l'écouvillon sans toucher le couton ou ne le laisser pas tomber
- tenir l'écouvillon en plaçant le pouce et l'index au milieu de la tige
- introduire doucement l'écouvillon dans le vagin sur distance de 2 à 3 cm et le tourner pendant 10 à 30 secondes, en prend en considération qu'il touche la paroi du vagin
- retirer l'écouvillon sans toucher la peau et le placer du milieu de transport

L'ensemble des écouvillons sont transportés rapidement au laboratoire (maximum de 2 heures).

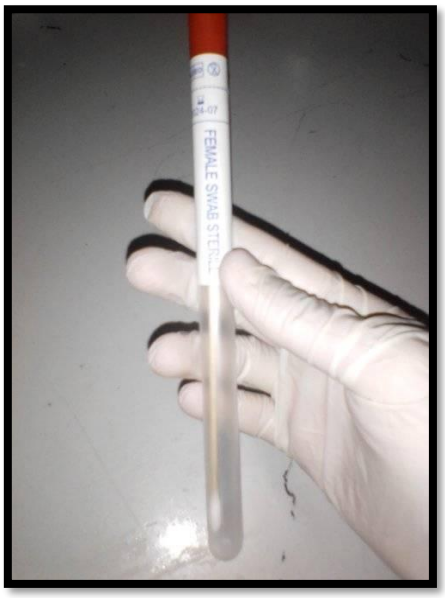


Figure 10 : Ecouvillon **(Originale, 2020)**

II.5. Analyses microbiologiques

II.5.1. Etude de l'aspect de leucorrhées

Les leucorrhées sont des écoulements vaginaux non sanglants, elles peuvent être physiologiques dues aux sécrétions de la glaire cervicale, les glandes annexes et la desquamation vaginales, ou pathologique témoignant une infection (un motif de consultation).

II.5.2. Mesure de pH

Le pH a été mesuré en déposant l'écouvillon sur un papier indicateur du pH.

II.5.3. Dénombrement sur une cellule de Malassez

La cellule de **Malassez (Figure 11)** est un hématimètre qui permet de compter le nombre de différentes cellules en suspension dans une solution. Elle s'agit d'une lame de verre épaisse creusée de 2 rigoles délimitant un plancher au centre duquel est tracé un quadrillage. Les 2 plateaux surélevés servent de support à la lamelle. Les rectangles quadrillés, formés de 20 carreaux constituent les zones de comptage. Pour réaliser le remplissage de la cellule :

Humecter la Malassez puis faire adhérer une lamelle parfaitement aux plateaux latéraux. A l'aide d'une pipette pasteur, remplir la chambre de comptage par capillarite (Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide

dans les rigoles) puis Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer au dénombrement de :

- cellules épithéliales, leucocytes et hématies.

-Préciser si la flore est variée ou s'il y a une dominance d'un type morphologique.

-Essayer de rechercher des Trichomonas ou de clue cell.



Figure 11: Cellule de Malassez **(Originale ,2020)**

Tableau 07 : Tableau de présente le comptage de leucocyte, hématies et cellules épithéliale par la Malassez **(Originale ,2020)**

Rectangles	**1**	**2**	**3**	**La somme**
Nombre des leucocytes				
Nombre des hématies				
Nombre des Cellules épithéliales				

II.5.4. Test de potasse (Sniff test)

Ce test permet de la mise en évidence d'amines et de préciser l'étiologie de certaines Infections vaginales.

Il consiste à ajouter sur le prélèvement qui a été étalé sur lame, une goutte de potasse (KOH) à 10% **(Annexe 2).**

Le test est positif si on a un dégagement d'une odeur de poisson, cela indique la présence de *Gardenerella vaginalis* signant une vaginose bactérienne. Et parfois *Trichomonas vaginalis* **(CNGOF,2011).**

II.5.5. Isolement des souches

II.5.5.1. Isolement des lactobacilles

Pour chaque prélèvement, les souches de lactobacilles ont été isolées sur le milieu **MRS** (Man, Rogosa, Sharpe) utilisé pour la culture des *Lactobacillus*. La sélectivité du milieu est uniquement assurée par son pH. Le milieu acidifié à pH 5,4). L'isolement a été fait par des ensemencements en stries, puis, une incubation de 48 heures à 37°C dans des conditions d'anaérobiose.

II.5.5.2. Isolement des souches pathogènes

Des ensemencements en stries ont été effectués sur géloses spécifiques à partir de chaque prélèvement :

- le milieu Chapman pour la recherche de *staphylococcus aureus.*
- le milieu Hecktoen pour la recherche des entérobactéries.
- le milieu Sabouraud à le chloramphénicol pour la recherche de *candida albicans.*
- le milieu VRBG pour la sélection de *Proteus*.
- Gélose nutritive, un milieu d'isolement non sélectif. **(Voir Annexe 2)**

L'ensemble des géloses sont incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures.

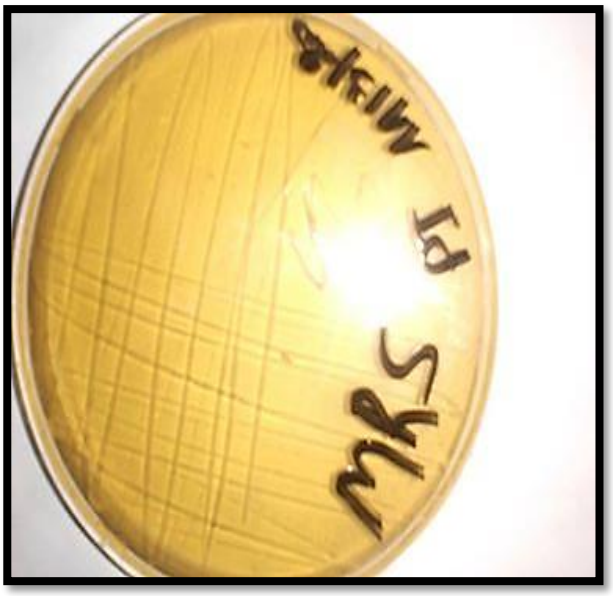


Figure 12 : Schéma représentatif de technique d'ensemencement en strie **(Originale, 2020)**

II.5.6. Identification des souches

L'identification des souches a été basée sur :

II.5.6.1. Caractérisation morphologique

II.5.6.1.1. L'aspect de colonies

Par une étude macroscopique consiste à une observation à l'œil nu des colonies bactériennes présentes afin de décrire ses caractéristiques :

- **Forme :** ronde, irrégulière, étoile, envahissante.
- **Taille :** petite, moyenne ou grosse colonies.
- **Relief :** bombé, platée ou en vague concentrique.
- **Couleur :** Celle-ci peut être naturelle (pigments) ou du a un colorant ou un indicateur de pH présent dans le milieu.
- **Surface** : lisse ou rugueuse.
- **Contour :** régulier ou irrégulier.

II.5.6.1.2. L'aspect de cellules

L'étude de la morphologie des cellules a été réalisée par :

a. Observation à l'état frais

Cette méthode permet d'observer les bactéries vivantes pour déterminer leur forme, leur mode de groupement et leur mobilité.

Afin de réaliser cette étude, une goutte d'eau stérile a été déposée sur lame. Une fraction de colonies a été prélevée et étalée sur la lame pour réaliser une suspension homogène, puis recouverte par une lamelle en évitant de former des bulles d'air. L'ensemble a été observé par microscope optique à l'objectif x40.

b.Coloration de Gram

La coloration de Gram permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et de distinguer entre les deux groupes : bactéries à Gram positive de couleur violette et bactéries à Gram négative de couleur rose. **(Voir Annexe 2).**

II.5.6.2. Caractérisation biochimique

II.5.6.2.1. *Staphylococcus aureus*

a.Test de la catalase

La catalase a pour but de la différenciation entre les staphylocoques et streptocoques, Elle permet la dégradation de l'eau oxygéné (H_2O_2).

Une goutte d'H_2O_2 a été déposée sur lame qui contient une colonie prélevée à partir de gélose de propagation, la décomposition de l'H_2O_2 a été traduite par un dégagement gazeux sous forme de mousses et bulles**(Dickey,1988).**

b.Test de la coagulase

Ce test a pour but de déterminer la pathogénicité du staphylocoque.

A partir d'un milieu sélectif pour staphylocoques, une colonie a été prélevée et mise dans un bouillon nutritif. L'incubation a été faite à 37 °C pendant 24 heures. Puis dans un tube à hémolyse, un volume de 0.5ml de bouillon a été ajouté à 0.5ml de plasma de lapin et. Ce mélange a été agité et porté au bain marie à 37°C pendant 3 heures. Un témoin positif a été préparé dans les mêmes conditions.

La coagulation du plasma indique la présence d'une staphylocoagulase identique au témoin.

II.5.6.2.2. *Escherichia coli*

a. Fermentation des sucres

Dans un bouillon contenant 1% d'un sucre (lactose, glucose, etc.) et une cloche de Durham, un ensemencement de suspension bactérienne a été fait (Il est important de placer l'anse de platine à l'intérieur du liquide en prenant bien soin de ne pas toucher la cloche) puis les bouillons ont été incubés à 37 °C pendant 48 heures (sans agitation).

L'apparition de bulle dans la cloche indique que la bactérie peut fermenter le sucre à l'intérieur du bouillon il est possible d'avoir un indicateur qui changera de couleur lors de la fermentation en raison du changement de ph. Ainsi un changement de couleur était également un signe d'une fermentation positive.

b. La recherche de l'action uréase

A l'aide d'une anse de platine, une colonie a été prélevée et ensemencée dans un milieu Urée-Indole. L'incubation a été faite à 37°C pendant 06 heures à 18 heures.

Une réaction positive se traduit par un virage du couleur du milieu du jaune au rouge.

c.La recherche de la production d'indole

Une culture jeune a été prélevée et ensemencée sur milieu urée-indole. L'incubation à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Après l'incubation quelques gouttes de réactif de Kowacs-Ehrliche ont été ajoutées.

La Formation d'un anneau rouge en surface indique la présence d'indole**.**

II.5.6.2.3. *Candida albicans*

a.Test de filamentation en sérum (Test de blastèse)

D'après **Menan et *al.,*(2008),** le test de blastèse a été réalisé en ajoutant une goutte de suspension bactérienne (Levure) dans1 ml de sérum humain frais.

La préparation a été incubée à 37°C pendant 3h puis une observation microscopique a été réalisée.

b.Test de chlamydosporulation

La présence de chlamydospores spécifiques de l'espèce albicans permet de confirmer le test de blastèse.

D'après **Menan et *al.*,2008**, les souches ont été repiquées sur le milieu pomme de terre, carotte, bile (PCB) et incubées à 27°C pendant 24 à 48h.

A l'examen microscopique, l'observation d'un pseudo filaments et des chlamydospores s'agit de l'espèce de *C. albicans*. Par contre, l'observation du pseudo mycélium seul s'agit d'un Candida non albicans.

II.5.6.2.4. *Streptocoques*

a.Test d'agglutination

Ce test utilise la réponse immunitaire antigène –anticorps, il permet l'identification des streptocoques des groupes A (*S. pyogens*), B (*S. agalactiae*), C (S. equisimilis), D(S.faecalis) F(S.anginosus) par une réaction d'agglutination des antigènes des streptocoques avec des particules de latex sensibilisées par immunoglobulines de lapin spécifiques de chaque groupe.

Les résultats positifs se traduisent par l'apparition d'une agglutination**.**

II.5.6.2.5. Les entérobactéries

a.Le test d'oxydase

Ce test a été utilisé pour la différenciation entre *Pseudomonas* et autre entérobactérie. Il a été réalisé en utilisant des disques d'oxydase. Le disque a été placé sur lame, sur celui-ci la colonie bactérienne a été déposée.

L'absence de coloration violette due à l'absence de l'enzyme recherché (entérobactéries).

L'apparition de la couleur violette indique que le germe c'est *Pseudomonas* **(Prescott et *al*.,2003).**

b.Utilisation des galeries API

La galerie API 20E est une version miniaturisée et standardisée des techniques biochimiques conventionnelles pour l'identification des bactéries à Gram négatif dont les entérobactéries.

Elles se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières.

Faire une suspension bactérienne d'opacité 0.5 sur l'échelle de macfarlane. Dans une ampoule de suspension medium a Na Cl, ajouter quelques colonies bien isolées prélevées sur un milieu gélosé. La suspension bactérienne préparée a été introduit à chaque microtubes a l'aide d'une micropipette ou la pointe de l'embout est appuyée sur le côté intérieur pour éviter la formation des bulles. Les microtubes des tests VP (pyruvate de sodium), CIT(citrate) et GEL(gélatine) ont été remplis par l'inoculum jusqu'à la cupule alors que les microtubes correspond aux tests ADH (arginine déshydrolase), LDC (lysine déshydrolase), ODC (ornithine décarboxylase), H2S (sulfure d'hydrogène) et UREE(urease) ont été remplis par la suspension bactérienne et recouvert par une couche de l'huile vaseline pour assurer l'anaérobiose.

Après une période d'incubation de 24 h à une température de 30° C, la lecture des résultats peut se faire. Il est convenu de regarder si la réaction est positive ou négative séparément pour chacun des tests. La révélation est permise par la présence d'indicateurs généralement que le test est positif, la couleur obtenue, est comparée avec le tableau de lecture **(Annexe 2).** Pour chaque cupule le résultat est inscrit sur la fiche de résultats, pour déterminer le code de 7 chiffres. À l'aide du catalogue d'identification, déterminer le microorganisme qui correspond à ce code.

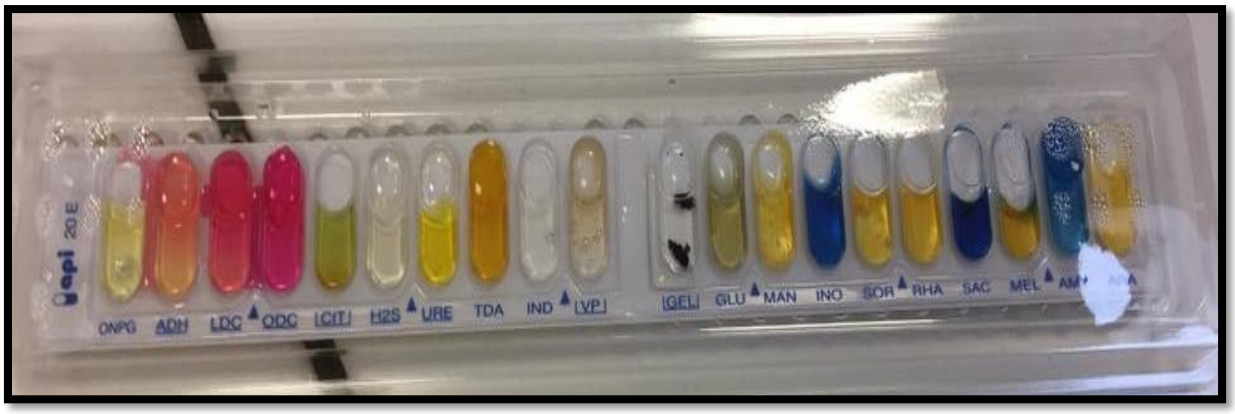


Figure 13 : Galerie d'identification API 20E **(Originale, 2020)**

II.6. L'activité hémolytique

D'après **Maragkoudakis et *al.*, (2006).** L'activité hémolytique a été déterminée à partir des cultures de la nuit qui ont été ensemencées en stries sur des boites de gélose Columbia contenant 5% (P/V) de sang humain et incubées pendant 48 h à 37°C.

Après incubation, les boites ont été examinées pour des signes de β-hémolyse (zones claires autour des colonies), α-hémolyse (zones avec reflets verdâtres autour des colonies).

II.7. La résistance aux antibiotiques

Un antibiogramme a été réalisé afin de tester la sensibilité ou la résistance d'isolat. Le principe consiste à placer plusieurs pastilles imbibées sur la culture bactérienne de la souche à tester préalablement.

L'ensemencement a été effectué par des stries extrêmement serrés à l'aide d'une anse de platine stérile sur la surface du milieu Mueller-Hinton en boite de Pétri. Enfin les disques d'antibiotiques ont été appliqués sur la gélose en pressant chaque disque à l'aide d'une pince bactériologique stérile pour assurer de leur application.

Après une incubation de 24 h à 30° C, la lecture des résultats consiste à mesurer le diamètre de la zone d'inhibition de croissance provoquée par l'antibiotique **(Boulssen et *al.*,2016).**

Chapitre III

Résultats et Discussion

Chapitre III : Résultats et Discussion

III.1. Etude de l'aspect de leucorrhée

Les leucorrhées sont un des motifs de consultation les plus fréquents en gynécologie. Les modifications des leucorrhées portent sur l'abondance mais aussi la couleur, la consistance et l'odeur. Selon le cas, on peut trouver :

Tableau 08 : Aspect de leucorrhée avec les infections suspectes **(Originale, 2020).**

Aspect de leucorrhée	L'infection suspecte	L'espèce suspecte
Grisâtre, adhérente, peu abondante, malodorant	Vaginose bactérienne	*Gardenerella vaginalis*
Blanchâtre caillebotte, granuleuse,	CVV	*Candida albicans*
Verdâtre mousseuse, spumeuse, abondante et nauséabonde	Vaginite parasitaire	*Trichomonas vaginalis*

III.2. Mesure de pH

Les résultats de des pH des prélèvements vaginaux sont mentionnés dans le tableau 8.

Tableau 9 : les mesures de pH des prélèvements vaginales des patientes

La patiente	P1	P2	P3	P4	P5	P6
pH	5,5	6	3	3,5	4,2	3,9

III.3. Dénombrement sur une cellule de Malassez

L'examen en cellule de Malassez permet de dénombrer les éléments figurés contenus dans un volume donné d'échantillon à étudier.

Les résultats du dénombrement sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 10 : les résultats de dénombrements en utilisant la Malassez

	Cul de sac	**Endocol**	**Exocol**
P1	Nombreuse cellules épithéliales + quelque germes	Quelques cellules épithéliale	Nombreuse cellules épithéliales
P2	Quelques globules rouges Présence de cellules épithéliales Globules blancs : 40 Quelque germes	Quelques globules rouges Présence de cellules épithéliales 10 globules blancs	Nombreuses globules rouges Présence de cellules épithéliales
P3	Très nombreuses cellules épithéliales Présence de germes 70 globules blancs	Présence de germes+ cellules épithéliales	Présence de germes 40 globules blancs
P4	Présence de cellules épithéliales 20 globules blancs Quelques germes	Présence de germes 10 globules blancs	Nombreuses cellules épithéliales Quelques germes
P5	/	/	/
P6	/	/	/

III.4. Isolement des souches

III.4.1. Isolement des lactobacilles

L'isolement des bactéries sur milieu MRS gélosé a conduit à obtenir des souches des lactobacilles comme elle est présentes dans la figure



Figure 14 : lactobacillus sur gélose MRS**(Originale,2020)**

III.4.2. Isolement des souches pathogènes

Les résultats des ensemencements sur les différentes géloses spécifiques sont présentés dans la figure

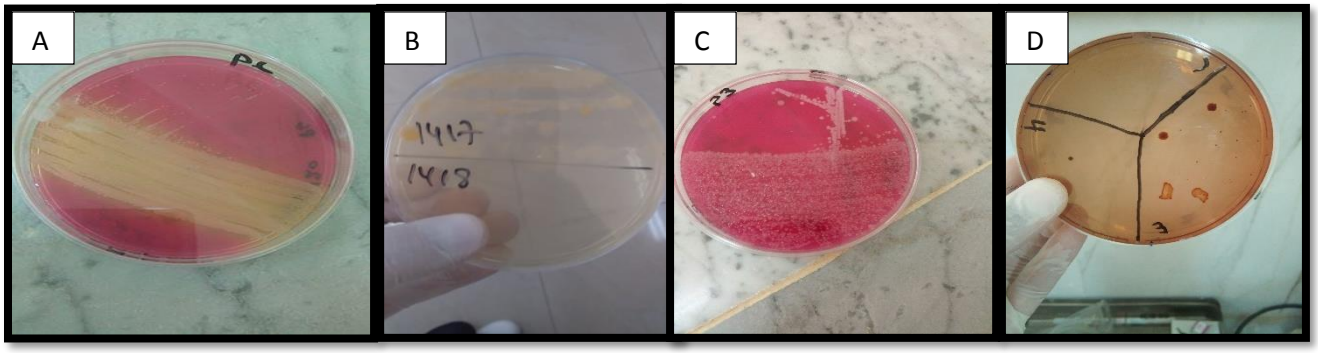


Figure 15 : A/ *S. aureus* sur gélose Chapman B/*Proteus* sur gélose nutritive, C/*S.epidermidis* sur gélose Chapman, D/ Entérobactérie sur gélose hecktoen(**Originale,2020).**

III.5. Identification des souches

III.5.1. Caractérisation morphologique

III.5.1.1. L'aspect de colonies

L'observation macroscopique des colonies, obtenues sur géloses spécifiques, a révélé plusieurs types de colonies avec des différentes formes et couleurs.

Tableau 11 : L'aspect de colonies des souches isolées

Espèces	Aspect de colonies
Lactobacillus	Petits colonies ,arrondies, bombé, blanchâtres ou jaunâtres ,lisses, de contour régulier
Staphylococcus aureus	Petit colonies de 1à2mm,arrondies ,semi bombé, de couleur jaune d'or nuisant
Candida albicans	Blanchâtre, crémeuse, lisse, irrégulier

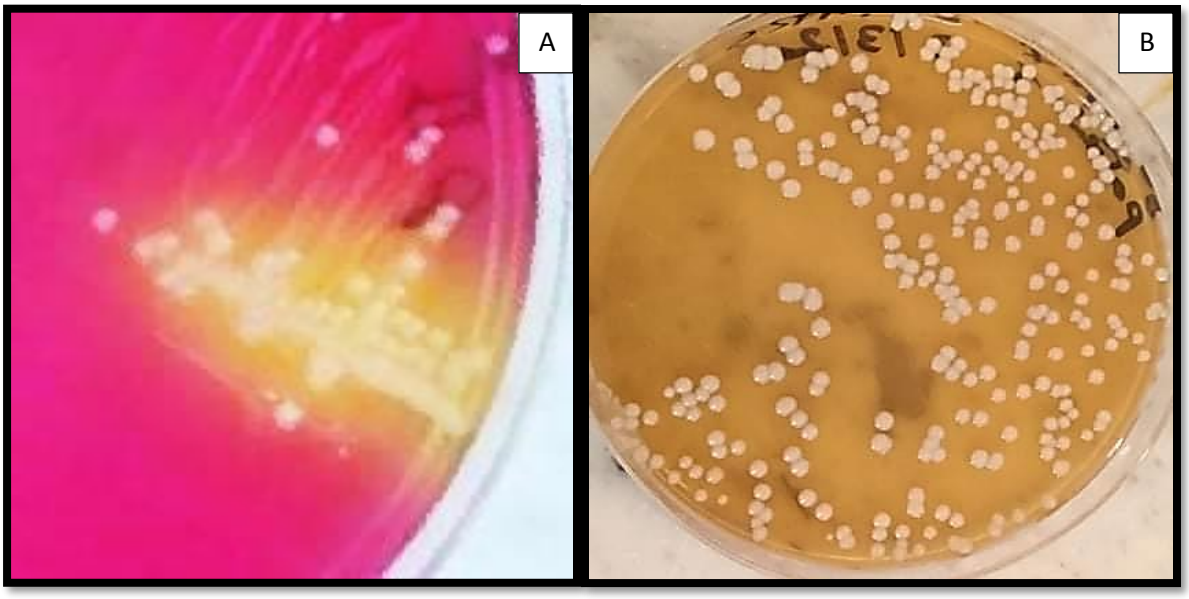


Figure 16 : l'aspect morphologique des colonies : A / *S. aureus*, B/ *lactobacillus***(Originale,2020)**

III.5.1.2. L'aspect de cellules

L'étude microscopique basée sur un frottis frais et un autre frottis fixé (coloration de Gram)

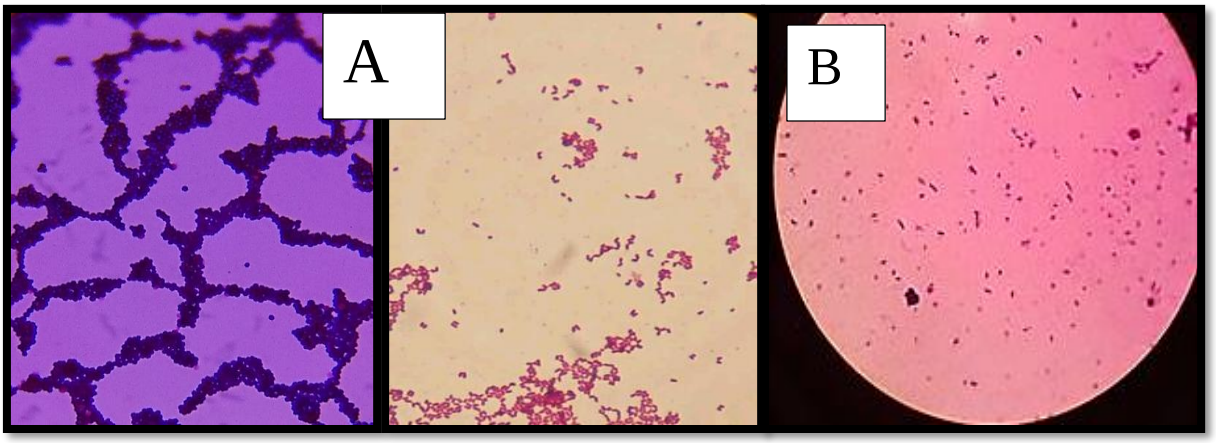


Figure 17 : A : bactéries gram positive (*S. aureus*) et (*lactobacillus),* B : bactéries gram négative (*Pseudomonas)* **(originale,2020).**

Tableau 12 : l'aspect des cellules après une étude microscopique à l'état frais et l'état fixé

Espèces	**Etat frais**	**Etat fixé (coloration de gram**
Lactobacillus	Bacilles isolés, Immobile, non flagellé, non sporogène	Gram positive
Staphylococcus aureus	Cocci, en grappe de raisin ou en amas régulier, immobile,	Gram positive
Entérobactéries	Bacilles, immobiles /mobiles,	Gram négative
Candida albicans	Bourgeonnante, présence d'un thalle ,production d'un vrai ou pseudomycelium	/

III.5.2. Caractérisation biochimique

III.5.2.1. *Staphylococcus aureus*

S. aureus possède une enzyme qui catalyse la dégradation d'H2O2 en H2O et dioxygène visible par la formation des bulles.

Les résultats obtenus montrent que nos souches (P2 et P3) se sont révélées catalase positive.



Figure 18 : Test catalase **(Originale, 2020)**

Le résultat de la recherche de la staphylocoagulase libre a donné une coagulation du plasma de lapin similaire que le témoin positif, donc la souche est bien équipée du point de vue enzymatique ce qui implique la pathogénicité de la souche.

On se basant sur l'ensemble des caractères morphologiques et culturaux étudiés, ainsi que les caractères biochimiques, on peut conclure, qu'il s'agit bien de l'espèce *Staphylococcus aureus*.

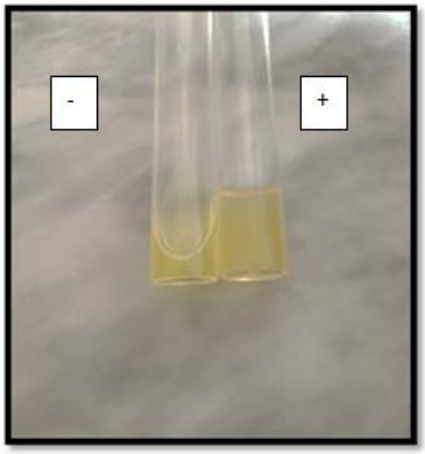


Figure 19 : test coagulase**(Originale,2020)**

III.5.2.2. *Escherichia coli*

Les tests d'orientation étaient indiqués que l'espèce est *E. coli* pour la culture P2, la présence d'un anneau rouge pour la recherche de l'indole et coloration qui reste jaune pour l'urease

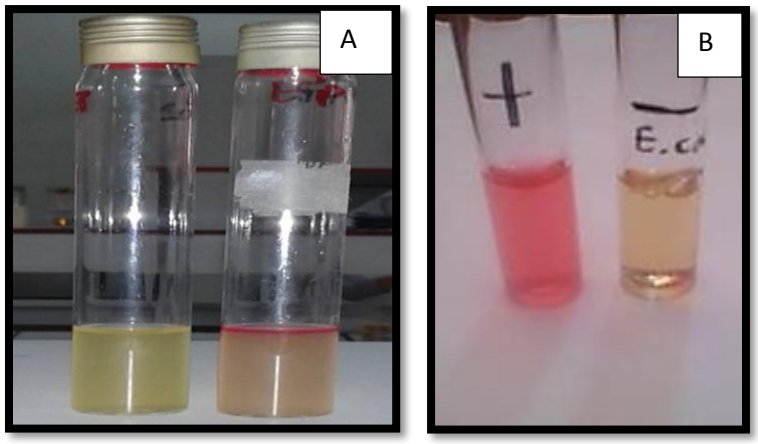


Figure 20: A/Test d'indole, B/Test d'urease**(Originale,2020)**

III.5.2.3. *Candida albicans*

Le test de blastèse a été positif pour les culture (P3/P4).

Le test de chlamydosporulation permet de confirmer les résultats de test de blastèse, les deux souches ont donné des chlamydospores avec l'observation d'un pseudomycelium

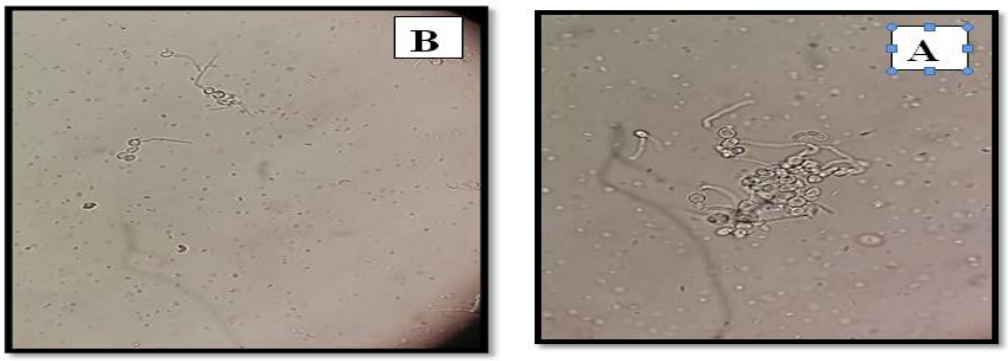


Figure 21 : A : pseudofilamentation plus chlamydospores *C. albicans*

B : pseudomycelium seul : non *C albicans***(Originale,2020)**



Figure 22 : Observation microscopique présente *C. albicans* après test de blastèse **(Originale ,2020)**

Discussion

Les secrétions vaginales peuvent être le signal d'une anomalie de la sphère génitale féminine. Les modifications des leucorrhées portent sur abondance mais aussi sur la couleur, la consistance ou l'existence de lésions permettent d'orienter le diagnostic et donnent une idée préliminaire sur le type de l'infection vaginale.il faut distinguer, d'une part, les leucorrhées physiologiques dont les variations sont liées à des modifications hormonales ou à des conditions particulières comme la grossesse ou la ménopause, et les leucorrhées pathologiques d'autre part**(Bohbot,2008).** Il n'en demeure pas moins que le diagnostic de certitude est biologique.

Le pH est un bon indicateur de l'équilibre ou déséquilibre de la flore vaginale. En absence d'une infection, le pH est acide voisin de 4(3,8 ;4,5) (P5 et P6), cette acidité est due à la présence d'acide lactique, produit par hydrolyse du glycogène contenu dans les cellules vaginales par la flore lactobacillaire, elle contribue à limiter la prolifération des pathogènes, elle a donc un effet préventif important contre les infections vaginales. En cas d'une vaginose bactérienne (P1 P2), il est supérieur à 4,5 et dans le cas des infections de vaginite à levure, le pH est inférieur à 4 (P3 et P4) **(Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Bohbot,2008).**

En cas des infections, la prolifération des agents pathogènes comme : *S. aureus, C. albicans,* cause un déséquilibre de la flore normale qui est traduit par la diminution ou l'absence des lactobacilles. Ce qui démontre leur rôle fondamental dans l'équilibre de la flore vaginale et dans la prévention des infections.

CONCLUSION

CONCLUSION

Au cours de ce travail nous avons pu constater que :

L'écosystème vaginal est un écosystème compliqué, à l'équilibre fragile. Un traitement par antibiotique, une modification hormonale ou physiologique peuvent provoquer une rupture de cet équilibre et entraîner l'apparition d'une vaginose bactérienne, d'une maladie inflammatoire pelvienne…etc

La santé de notre microbiote urogénital dépend principalement de l'équilibre de son écosystème qui est dominé par des lactobacilles (la flore de Doderlein). L'altération de ce dernier provoque l'apparition des plusieurs infections dont les causes sont multiples (endogènes et exogènes). Ce dysmicrobisme de la flore vaginale est traduit par le remplacement de la flore normale (*lactobacillus*) par une autre flore pathogène (*streptococcus aureus, candida albicans, Gardenerella vaginalis, ….).*

Ce dysmicrobisme de la flore vaginale dans lequel la flore lactobacillaire normale est remplacée par une flore polymorphe abondante affecterait tout de même près de trois millions de femmes chaque année dans le monde.

La conséquence la plus grave de la MIP chronique peut apparaître lors de l'ovulation, lorsqu'un œuf est libéré de l'ovaire d'une femme. Le tissu cicatriciel laissé par l'infection bactérienne peut entièrement boucher les trompes de Fallope de telle sorte que l'œuf ne peut pas passer dans l'utérus. Le résultat est soit une stérilité du fait que le sperme ne peut pas atteindre l'œuf, soit une grossesse extra-utérine,
Une urgence médicale, dans laquelle l'œuf est fertilisé et commence à grossir dans la trompe de Fallope.

Pour empêcher ces altérations, il existe sur le marché pharmaceutique de nombreux probiotiques à visée gynécologique sous diverses formes galéniques : capsule vaginale, gélules per os…, dont la colonisation par ces souches probiotiques permet de restaurer la flore vaginale et de retrouver une protection contre les micro-organismes pathogènes. Cependant, une nouvelle problématique se pose : **la flore artificielle crée par l'apport de ces probiotiques vaginaux, peut-elle avoir un effet néfaste sur la santé à long terme ?**

A la fin, quelques conseils et perspectives pour éviter la contamination vaginale :

- Évitez les douches vaginales et les irritants comme les savons forts et les déodorants intimes. Lavez-vous quotidiennement en utilisant un savon doux, au pH neutre, mais l'utilisation excessive pourra nuire.
- Ne prenez pas des antibiotiques sans prescription médicale. Ces médicaments peuvent détruire les bactéries protectrices du vagin. Leur abuse peut aussi, être à l'origine du développement de résistances bactériennes.
- Consommer des probiotiques. La consommation de probiotiques, sous forme de yogourts, pourrait être bénéfique. Par ailleurs, puisque la consommation régulière de ces derniers, contribue à conserver la santé de la flore intestinale, elle pourrait avoir le même effet sur la flore vaginale.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques

1. Abdelkarim K. (2015). Isolement et identification de bactéries antagonistes Contre Erwinia amylovora agent causal du feu bactérien des rosacées à pépins. Thèse du Master en Biotechnologie microbienne. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah, Fès 63p

2. Alain R, Sylvie T. (2007). Anatomie et physiologie,256-272.

3. Allaert F, Pillon F. **(2011).** Les lactobacilles, une nouvelle arme pour prévenir les infections. *Actualités pharmaceutiques*.511,41-42

4. Amouri I, Abbes S, Sellami H, Makni F, Sellami A, Ayadi A. **(2010).** La candidose vulvovaginale : revue. *Journal de mycologie médicale*. 20,108-115.

5. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen K, Eschenbach DA, Holmes KK.(1983). Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiological associations. Am J Med; 74: 14–22.

6.Anane S, Kaouech E, Zouari B, Belhadj S, Kallel K, Chaker E. **(2010).** Les candidoses vulvovaginites : Facteurs de risque et particularités cliniques et mycologique. *Journal de mycologie médicale*.20 ,36-41.

7. Balaka B, Agbère A, Dagnrar A, Baeta S, Kessie K, Assimadi K. **(2005).** Portage génital bactérien au dernier trimestre de la grossesse et infection néonatale précoce. *Archives de pédiatrie*. 12,514-519.

8.Bélec.L.(2002). Défenses non immunes, pré-immunes et immunes du tractus génital féminin contre les infections. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*. 31, sup. 6 :45-59.

9. Belgy Arcangeli .M.T. (2015). De la vaginose à la vaginite et parfois plus. *Les entretiens de bichat*.1-4

10. Bergogne-Bérézin E. **(2007).** Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic et thérapeutique. *Antibiotique,* 9,139-144.

11. Bohbot (**2006)**. La vaginose bactérienne en -RICAI

12. Bohbot J.-M. (2008). Les sécrétions vaginales. *Pelv Perineol.* 3,19-24.

13. Bohbot J-M et Lepargneur J-P. **(2012).** La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations Gynécologie obstétrique et Fertilité.40,31-36.

14. Borges S, Silva J, Teixeira P, (2013). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obst*. (DOI 10.1007/s00404-013-3064-9).

15. Boris S, Barbés C.(2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*. 2, 543−546

16. Boskey E, Cone R, Whaley K, and Moench T. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction* 16(9) :1809-1813.

17. Brabant G. **(2016).** Vaginose bactérienne et prématurité. *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction* .45, 1247-1260.

18.Brrebi A, Ayoubi JM. **(1999).** Le déséquilibre de la flore vaginale. Gynecol Obstet Endocrinol.44, 1-4.

19. Butel M-J. (2014). Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des anti-infectieux*. (https://doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010)

20. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF).(2011) Item88 : Infections génitales de la femme : Leucorrhées . Université Médicale Virtuelle Francophone.p9

21. Dickey, R.S, Zumoff. C.H. (1988). Emended Dexription et Enterobacter cancerogenus comb. nov. (Formerly Erwinia cancerogena). International journal of Systematic Bacteriology, vol.38 (n°4), p371-374

22. Delcroix M (1994).infection gynecologiques-Ed Masson; 90, 171-174,

23. Eschenbach DA, Hillier SL, Critchlow CW, Stevens C, DeRouen T, Holmes KK. (1988). Diagnosis and clinical manifestations of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*. 158: 819-828

24. Eschenbach DA, Hillier Sl (1990).Advances in Diagnostic Testing for vaginitis and Cervitis.- J. Reprod. Med., 162, 34; 8, 55-565.

25. Famularo.G, Perluigi.M, Coccia.R, Mastroiacovo.P, De Simone.C.(2001). Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypotheses*.56(4), 421–430

26. FAURE S, PUBERT C, RABILLER J, TAILLEZ J, YVAIN A-L. **(2013).** Intérêt des probiotiques en préventif au niveau des différentes flores de l'organisme. *Actualités pharmaceutiques*.528,22-26.

27.FAURE S, PUBERT C, RABILLER J, TAILLEZ J, YVAIN A-L. **(2013).** Que savons-nous des probiotiques ?. *Actualités pharmaceutiques*.528,18-21.

28. Gardiner G.E, Heinemann C, Bruce A, Beuerman D, Reid G. (2002). Persistence of *Lactobacillus fermentum RC-14* and *Lactobacillus rhamnosus GR-1* but Not *L. rhamnosus GG* in the Human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* .9,92–96

29. Graziottin A, Gabini D. (2015).Anatomy and physiology of genital organs-women. *Handbook of Clinical Neurology*.vol 130.39-60.

30. Hay p. **(2000).** Recurrent bacterial vaginosis.*Current infectious disease reports*.2,506-512.

31. Jack D, Sobel MD.(2006). Management of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: Unresolved Issues. *Current Infectious Disease Reports*. 8:481–486

32. Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Romeroa R.(2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. . *BJOG*.118:533–549

33. LANGLOIS.I et LEPRESLE E.(2001) . Le corps humain étude, structure et fonction le rôle infirmier dans la pratique clinique,2eme Edition de Deboeck.

34. Leblanc Rose-Marie. **(2009).** Détecter des infections génitales basses chez la femme. *Option Biologie*. 424, 19-20.

35. Lecompte F.(1999). Les infections urinaires de la femme. John libbey eurotext.198 p

36. Lefèvre J.C. **(2002).** La vaginose bactérienne et ses conséquences en sante publique. La lettre du gynecologue.268,35-44.

37. Lepargneur J-P, Rousseau V. **(2002).** Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 31,485-494.

38. Lepargneur J-P.(2016). Lactobacillus crispatus, biomarqueur de l'écosystème vaginal sain. *Ann Biol Clin.* 74 (4) : 421-7

39. Linhares I, Girald P, Baracat E.C. **(2010).** New findings about vaginal bacterial flora. *Rev Assoc Med Bras*.56(3),370-374.

40. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C , Kalantzopoulos G , Pot B , Tsakalidou E.(2006). Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. *International Dairy Journal* 16, 189–199

41.McGroarty JA, Reid G (1988) Detection of a lactobacillus substance which inhibitsEscherichia coli. Can J Microbiol 34:974–978.

42. McGroarty JA, Tomeczek L, Reid G, Cuperus PL, van der Mei HC, Bruce AW, Khoury AE, Busscher HJ.(1992).Correlation between hydrophobicity and resistance to nonoxynol-9 and vancomycin for urogenital isolates of lactobacilli..FEMS Microbiol Lett. Jul 1;73(1-2):101-4. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05297.x.PMID: 1325935.

43. Mcgroarty Jacqueline A. **(1993)** Probiotic of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 6,251-264.

44. Menan H, Ekaza E, Messou E, Adoubryn K,Yavo W, Kiki-Barro P, Vanga H, Djohan V, Kassi Kondo F,Miano M, Kouassi BT,Valentin A,Kone M.(2008). Recherche de Candida dubliniensis chez des patients VIH+ à Abidjan (Côte d'Ivoire) Search for Candida dubliniensis in HIV+ patients in Abidjan (Ivory Coast). *Journal de Mycologie Médicale.*18, 228—233

45. Menard J-P, Bretelle F. **(2008).** Déséquilibre microbiologique de la flore vaginale chez la femme enceinte. Controverse sur le dépistage de la vaginose bactérienne asymptomatique. *La Lettre du Gynécologue* .334,17-20.

46. Mylonas I, Berguan F. **(2011).** Diagnosis of Vaginal Discharge by Wet Mount Microscopy: A Simple and Underrated Method.*Obsterical and gynecological survey*. vol 66,6,359-368.

47. Nansel TR, Riggs MA, Yu KF, Andrews WW, Schwebke JR, Klebanoff MA. (2006). The association of Psychosocial stress and bacterial vaginosis in a longitudinal Cohort. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Vol,194(2),381-6.

48. Nugent R., Krohn M and Hillier S. **(1991)** Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology* 29 :297-301

49. Ouwehand A C, Salminen S,Isolauti E.(2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 82, 279-289

50. Palmeira-de-Oliveira R, Palmeira-de-Oliveira A, Martinez-de-Oliveira J.(2015). New strategies for local treatment of vaginal infections. *Adv Drug Deliv Rev*. 22-105

51. Prescott. L. M, Harley. J. P, Klein. D. A.(2003). Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1164.

52. Quentin R. **(2006).**Ecologie bactérienne vaginale : nature, exploration et prise en charge des déséquilibres. Communication présentée aux 30 émes journées nationales du CNGOF, Nov, Paris, France.p.5-18.

53. Redondo-Lopez V, Cook L.R, Jack D.S. (1999). Emerging Role of Lactobacilli in the Control and Maintenance of the Vaginal Bacterial Microflora. *Reviews Of Infectious Diseases.*12(5),856-872

54. Santosh S, Waigankar.Patel V. (2011). Role of probiotics in urogenital healthcare. *e. J Mid-life Health*.2:5-10

55. Sedallian A, Antoniotti G, Bland St (1995).les germs responsables des vaginoses bactériennes-Med Mal infect, 25,791-5.

56. Spiegel CA. (1991). bactérial vaginosis-Clin Microbiol Rev,4 :485-502,

57. Spurbeck R. R., Arvidson CG. (2011). *Lactobacilli* at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiol.* 6 567–582. 10.2217/fmb.11.36

58. Tailliez P. (2004). Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. Antibiotiques ,6,35-41.

59.Turovskiy Y, Sutyak Noll K, Chikindas ML. (2011). The aetiology of bactérial vaginosis. *Journal of applied Microbiology*. vol 110(5), 1105-1128.

Webographie

-https://www.pinterest.fr/pin/396879785912214775/

-https://www.pinterest.fr/pin/566327721869573845/

-http://www.labolecerf.fr/pro/prevag.htm, Prélèvement vaginal-Vaginite, vaginose-Laboratoires de Biologie médicale Selarl Lecerf et Associés.

-(http://www.corevih-auvergne-loire.org)

ANNEXES

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 26/02/2020

Numéro de la patiente : 01

Age : 48 ans

Nombre de prélèvements : 03

Motif de consultation : PV

Grossesse : oui non√

Infection : oui √ non

- De quel type : /

Quels sont les signes présents ? Leucorrhée abondante, brulures

- L'aspect de leucorrhée : blanchâtre

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non√

- Quel ATB ? /
- Durée d'antibiothérapie ? /

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 26/02/2020

Numéro de la patiente : 02

Age : 50

Nombre de prélèvements : 03

Motif de consultation : PV

Grossesse : oui non√

Infection : oui √ non

- De quel type **:** /

Quels sont les signes présents ? Perte très abondantes, brulure + prurit

- L'aspect de leucorrhée : malodorant,

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non√

- Quel ATB ? /
- Durée d'antibiothérapie ? /

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 26/02/2020

Numéro de la patiente : 03

Age : 52

Nombre de prélèvements : 02

Motif de consultation : PV

Grossesse : oui non√

Infection : oui√ non

- De quel type **:** Suspect d'une CVV

Quels sont les signes présents ? Vulve+ vagin rouge, Prurit

- L'aspect de leucorrhée : blanchâtres caillebottées

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non√

- Quel ATB ? /
- Durée d'antibiothérapie ? /

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 01/03/2020

Numéro de la patiente : 04

Age : 40

Nombre de prélèvements : 02

Motif de consultation : PV + grossesse

Grossesse : oui √ non

Infection : oui √ non

- De quel type ? Suspect d'une mycose

Quels sont les signes présents ? Un œdème et une rougeur vulvaire

- L'aspect de leucorrhée : pertes blanches ayant l'aspect de lait caillé

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non √

- Quel ATB ?..... /.....
- Durée d'antibiothérapie ?...../.....

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 04/03/2020

Numéro de la patiente : 05
Age : 32
Nombre de prélèvements : 02

Motif de consultation : pv

Grossesse : oui non√

Infection : oui non√

- De quel type **:** **/**

Quels sont les signes présents ? **/**

- L'aspect de leucorrhée : Normale

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non√

- Quel ATB ? /
- Durée d'antibiothérapie ? /

Annexe 1

Fiche de renseignement

Date : 11/03/2020

Numéro de la patiente : 06

Age : 25

Nombre de prélèvements : 02

Motif de consultation : pv

Grossesse : oui non√

Infection : oui non√

- De quel type **:** **/**

Quels sont les signes présents ? **/**

- L'aspect de leucorrhée : Normale

La patiente suit-elle une antibiothérapie ? oui non√

- Quel ATB ? /
- Durée d'antibiothérapie ? /

Les compositions du milieu de culture et solutions

Pour chacun des milieux, les ingrédients sont pesés à l'aide d'une balance et déposés dans une fiole jaugée puis rajouter le volume d'eau distillée à raison de 1000 ml. Le pH est mesuré par un pH-mètre et ajusté par l'ajout du : KOH ou du HCl ensuite répartir dans des flacons de 250 ml et autoclavés à 121°C pendant 15 minutes.

1. Gélose MRS (Man, Rogosa, Sharpe) pH=5,4

Peptone	10 g
Acétate de sodium	5 g
Extrait de viande	8 g
Extrait de levure	4 g
Phosphate dépotassique	2 g
Tween80	1ml
Citrate d’ammonium	2 g
Sulfate de magnésium	2 g
Sulfate de manganèse	0,05 g
Dextrose	20 g
Agar	10 g

2. Gélose chapman (pH=7)

D-mannitol	10g
Chlorure de sodium	75g
Extrait de viande de bœuf	1g
Rouge de phénol	0,025
Agar	10g

3. Gélose nutritive (pH=7)

Peptone	5g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2,5g
Chlorure de sodium	5g

Agar	15g

4. Gélose Hecktoen

Peptone	12g
Extrait de levure	3g
Chlorure de sodium	5g
Thiosulfate de sodium	5g
Sels biliaires	9g
Citrate de fer ammoniac	1,5g
Salicine	2g
Lactose	12g
Saccharose	12g
Fuchsine acide	0,1
Bleu de bromothymol	0,065
Agar	14g

5. Milieu sabouraud au chloramphénicol

Peptone pepsique de viande	10g
Glucose	20g
Chloramphénicol	0,05g
Agar	15g

6. Gélose VRBG (Violet Red Bile Agar)

Digestion pancréatique de gélatine	7g
Extrait de levure	3g
Glucose	10g
Sels biliaires :	1,5g
Chlorure de sodium :	5 g
Rouge neutre :	0,03g
Cristal violet :	0,002 g
Agar	15g

7. Gélose PCB (pomme de terre-carotte-bile)

Carottes	20g
Pomme de terre	20g
Bile de bœuf	150ml
Agar	25g

8-Gélose Columbia au sang

Polypetone	17g
Peptone pancréatique de cœur	3g
Amidon de Maïs	1g
Chlorure de Sodium	5g
Extrait de levure	3g
Agar	13,5g
Sang	50ml

9. Gélose Muller Hinton

Peptone	17,5g
Extrait de viande	2g
Amidon	1,5g
Agar	17g

10.Uréé indole

Urée	20g
L-tryptophane	3g
Chlorure de sodium	5g
Ethanol	10ml
Rouge de phénol	25mg
Kh2po4	1g

11. Solution de la potasse à 10%

KOH	10g
Eau distillée	1L

12. La technique de la coloration de gram

La coloration de Gram a été réalisée selon la technique suivante :

- Déposer une goutte d'eau physiologique stérile sur une lame.
- Prélever un échantillon de colonie et mélanger avec la goutte d'eau
- sécher la lame par passage rapide sur la flamme d'un bec bunsen.
- Couvrir le frottis par du cristal violet pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes
- Ajouté du lugol pendant 60 secondes.
- Laver à l'eau distillée pendant 5 secondes.
- Décoloré avec l'alcool Pendant 15 secondes puis laver avec l'eau distillée
- Ajouter la fuschine et laisser pendant 60 secondes, Laver à l'eau
- Après séchage déposer une goutte d'huile à immersion sur le frottis et observer au microscope à au grossissement (×40).



Figure 1 : A/Gélose MRS, B/ Gélose Chapman **(Originale,2020)**

Annexe 02

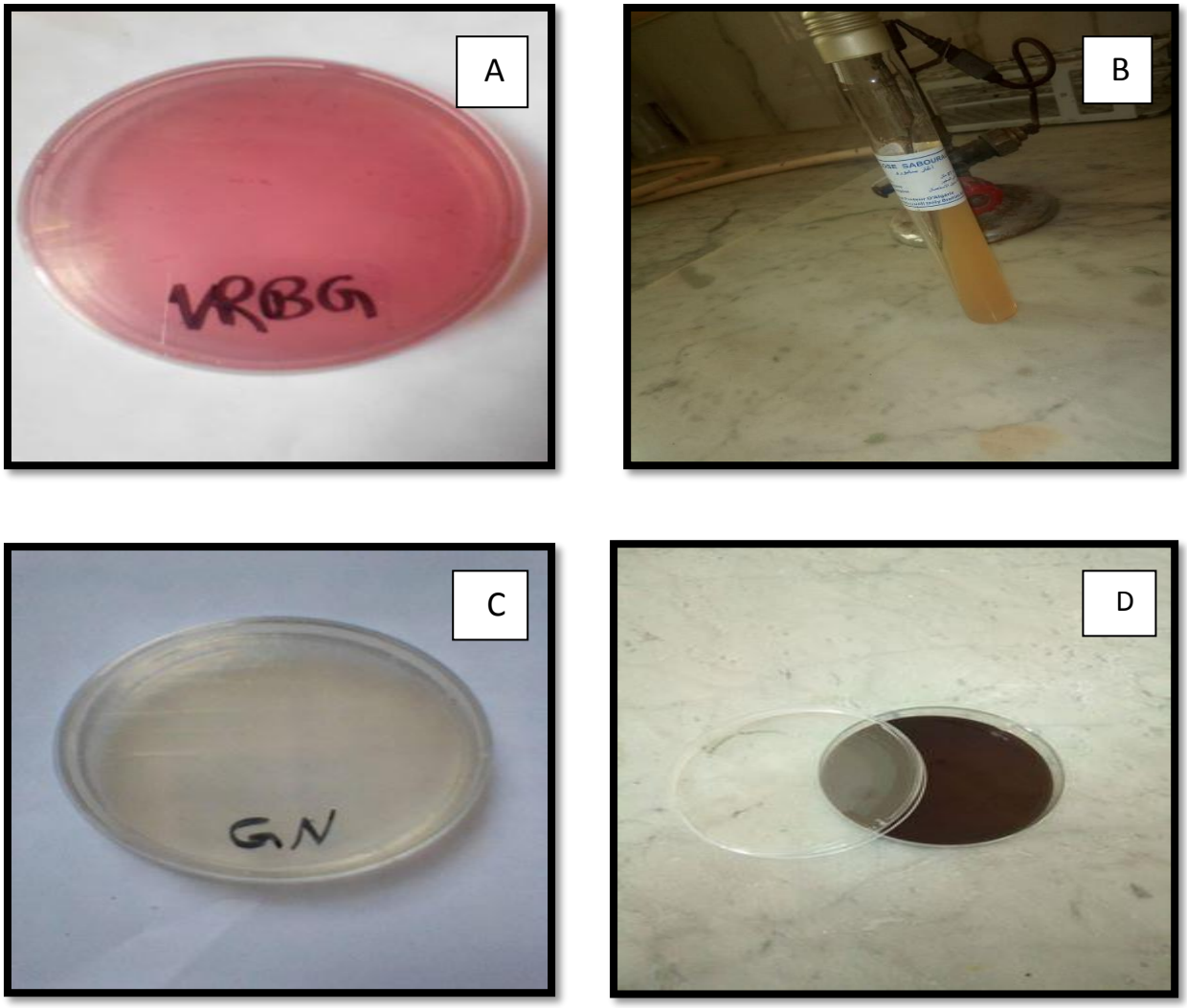


Figure 2 : A : Gélose VRBG B : Gélose Sabouraud à chloramphénicol C : Gélose nutritif D : gélose hecktoen (originale,2020).

Tableau 1 : tableau de lecture de la galerie API 20^{e} (Abdelkarim k,2015)

Microtube	Substrat	Caractère recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	β-galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H_2S	Thiosulfate de sodium	Production d'H2S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d'α-napthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO_2^- / N_2	Nitrates (NO3)	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		