



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

OUADAH YAMINA

ZAIDI FOUZIA

Pour l'obtention du diplôme de

Master en biologie

Spécialité: Nutrition et Santé

Thème

**Etude du l'effet antimicrobien sur
*CANDIDA albicans***

Soutenue publiquement le 21/06/2017

Devant le Jury

Président	CHAALEL Abdelmalek	M.C.BU. Mostaganem
Encadreur	BENBOUZIANE Bouasria	M.C.B U. Mostaganem
Examineurs	HENNI Nassiba	M.A.AU. Mostaganem

Thème réalisé au Laboratoire de Microbiologie N°03 Site III. Univ-Mosta

Résumé

Notre étude consiste à tester l'antagonisme pour la souche *Lb rhamnosus* vis-à-vis *Candida albicans*. Elle a conduit à tester le pouvoir antimicrobien cette souche afin de l'utiliser comme une alternative prometteuse par rapport aux antibiotiques en thérapie urogénitale et l'a comparé aussi avec d'autre produit comme le peroxyde d'hydrogène, thiosulfate, surnageant et surnageant neutralisé a fin de mieux connaitre la nature de la substance inhibitrice en utilisant la méthode des puits, les résultats sont les suivants : Notre souche *Lb rhamnosus* a démontré un effet inhibiteur représenté par une zone d'inhibition de 20 mm vis-à-vis sur la souche pathogène *Candida albicans*. L'effet antagonismes est dû principalement à la diminution du pH provoqué par la production de l'acide lactique L'utilisation de Thiosulfate de sodium en association avec une souche de *Lb rhamnosus* donne des zones d'inhibitions de 15 mm pour *Lb rhamnosus*, 10 mm pour le Thiosulfate et un plus de 20 mm sur l'effet jumelé qui confirme leur potentialisation de notre souche. Le Peroxyde d'hydrogène a donné une zone d'inhibition de 30 mm. L'activité antagoniste exercé par *Lb Rhamnosus*, dévoilent des résultats positifs de surnageant non neutralisés sont identiques aux résultats obtenues d'antagonismes de *Lb Rhamnosus* (culot + surnageant).le surnageant neutraliser a donner des resultats negative mais n'exclue pas le fait qu'il existe des substances antibactériennes.

Mots clés : *Lb Rhamnosus*, *Candida albicans*, Peroxyde d'hydrogène, Thiosulfate, effet antimicrobienne, infection urogénitale.

Dédicaces

Je dédie ce modeste 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

Je dédie ainsi ce travail à :

Mes chères sœurs Hanaa Israa Marwa

Asma et Khadidja

À toute ma famille.

À tous mes amis (es)

Et surtout Fatiha Kaouter et Fouzia

A tous mes enseignants de primaire à l'université

OUADAH YAMINA

Je dédie ce Modeste travail

A mes parents en témoignage de ma profonde affection

A tous mes sœurs

A mes frères

A Mes grands pères

A ma famille ZAIDI

A tous qui nous ont enseigné au primaire au moyen et au lycée

A tous mes amis sans exception

Un salut amical à tous les amis de Science Infirmière et Nutrition et Santé

ZAIDI FOUZIA

REMERCIEMENTS

*Nos profonds remerciements vont à notre promoteur au Docteur **B. BENBOUZIANE** Maitre de conférences à l'université de Mostaganem pour la proposition de ce thème ainsi que pour sa compréhension et pour l'aide qu'il nous a prodigué et on remercie également les membres du laboratoire des Microorganismes Bénéfiques, des Aliments Fonctionnels et de la Santé (LMBAFS) de l'Université Abdelhamid Ibn Badis Mostaganem.*

*On exprime notre profonde gratitude au Docteur **Chaalel Abdelmalek Maitre de conférences a l'iniversité de Mostaganem** et Madame **HENNI Nassiba** Maitre Assistante a l'université de Mostaganem qui Nous on fait l'honneur de juger ce travail.*

*On tient également à remercier vivement le professeur A. **RIAZI de** nous avoir accueillis dans son Parcours.*

*Grand merci à Melle **Siham Otsmane Haou** doctorante a l'université de Mostaganem et **Djahira Hamed** qui sont contribué a ce travail.*

*J'adresse également nos sincères remerciements à Mr **Benbouziane Djillali** responsable du laboratoire de Microbiologie qui a collaboré sans hésitations dans ce travail en donnant généreusement ces conseils et ces orientations.*

Nos remerciements s'adressent enfin à tous nos collègues et toute personne ayant participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Liste des tableaux et des figures

Liste des tableaux

Tableaux	page
Tableau 1 : Flore vaginale normale (<i>BERREBI A. et all, 1999</i>)	05
Tableau 2: classification des uropathogènes (Belin et Bontemps, 2012),	14
Tableau 3: Classification du <i>C. albicans</i> d'après Kwon Chung et Bennet (1992)	18
Tableau 4_: la nature et l'origine de la souche lactique utilisée (fait par l'étudiante)	21
Tableau 5_: Les souches pathogènes (fait par l'étudiante)	21

Liste de figures

_Figure 1 : effets des lactobacilles vaginaux sur les souches à potentiel pathogène. (Landay .2013)	29
Figure 2 : Aspect macroscopique des bactéries sur milieu liquide (a) : <i>Lactobacillus rhamnosus</i> sur milieu MRS; (b) : <i>Candida albicans</i> sur milieu Sabouraud; (c) : <i>Saccharomyces boulardii</i> sur milieu Sabouraud.	29
Figure 3 : Aspect microscopique de <i>candida albicans</i>	30
Figure 4 : Aspect microscopique de <i>candida albicans</i> colorées par la fuschine	. 30
Figure 5: Effet antagoniste de <i>Lb Rhamnosus</i> vis-à-vis <i>candida albicans</i> par méthode des puits.	31
Figure 6 : Effet antagoniste de <i>Lb rhamnosus</i> et le <i>Thiosulfate de sodium</i> , et du Peroxyde de l'hydrogène, vis-à-vis <i>Candida albicans</i> selon la méthode des puits	.3
Figure 7_: Effet antagoniste de peroxyde de l'hydrogène, vis-à-vis <i>Candida albicans</i> parméthode ADT	33
Figure 8: Effet de surnageant non neutralisé de <i>Lb rhamnosus</i> sur <i>Candida albicans</i> selon la méthode des puits	34

Liste des abréviations

- **ADT** : Agar well Diffusion Test
- **CVV** : Candidose vulvo –vaginale
- **GRAS** Generally Recognized As Safe
- **LBr** : *Lactobacillus rhamnosus*
- **MRS** :De Man Rogosa Sharp
- **QSP** : QualifiedPresumption of Safety
- **Spp** : Streptocoques

Sommaire

Résumé

Dédicaces

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des tableaux et des figures

Introduction

Partie bibliographique

Chapitre I : La flore urogénitale physiopathologie 2

I.1. Historique 2

I.2. La flore commensale vaginale 3

I.2.1. Les facteurs favorisant de la flore vaginale 4

a) Facteurs physiologiques 4

b) Facteurs pathologiques 5

c) Facteurs thérapeutiques 5

I.2.2 Rôle protecteur de la flore urogénitale 6

I.2.3. Rapports entre la flore et le glycogène vaginal 6

I.3. Activité anti microbienne des lactobacilles	7
I.3.1. Inhibition de la croissance du pathogène	7
a) Production d'acides organiques	7
b) Le peroxyde d'hydrogène	7
c) Les bactériocines.	8
d) Compétition vis-à-vis des nutriments	8
I.3.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène	8
I.3.3. Inhibition de l'expansion du pathogène (co-agrégation)	9
I.4. Les pathologies de l'appareil urogénital	10
I.4.1. Les infections de l'appareil urinaire	10
I.4.1.1. Physiopathologie des infections urinaires	10
I.4.2. Pathologies de l'appareil génital	12
I.4.2.1. La vaginose bactérienne non spécifique	12
I.4.2.2. La vaginite à Candida	13
Chapitre II : les probiotiques	
II.1. Définitions	15
II.2. Relation probiotiques, prébiotiques, synbiotiques	15
II.2.1. Probiotiques et prébiotiques	15
II.2.2 Probiotiques et synbiotiques	16
II.3. Critères de sécurité	16
II.3.1. Identification de la souche	16
II.3.2. Innocuité	17
II.3.3. Critères fonctionnels	17
II.3.4 Critères technologiques	17
II.4. mécanisme d'action et effets bénéfiques des probiotiques	17

II.5. Applications thérapeutiques	18
II.5.1. Les infections vaginales	18
II.5.2. Les candidoses vulvo-vaginales	19
II.5.3. Les infections urinaires	20

Partie expérimentale

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Matériels	21
I.1.1 L'objectif	21
I.1.2. Présentation du lieu de l'étude expérimental	21
I.1.3. Matériels expérimentales	21
I.1.3.1. Les souches bactériennes	21
I.1.3.1.1. Souche lactique	21
I.1.3.1.2. Les souches pathogènes	21
I.1.4. Les milieux de culture	22
I.1.5. Appareillage	22
I.1.6. Réactifs et solutions	23
I.1.7. Verrerie et petit matériel	23
I.2. Méthodologie utilisée	23
I.2.1. La technique de réactivation des souches	23
I.2.2.1.1. Caractérisation morphologique	23
I.2.2.1.1.1. Examen macroscopique	23
I.2.2.1.1.2. Examen microscopique	23
I.2.2.2. Technique de préparation des frottis	24
I.2.3. Conservation des souches	25
I.2.4 Préparation de l'inoculum	26
I.2.5 Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)	26

CHAPITRE II : Résultats et Discussion

II.1. L'aspect macroscopique des souches sur milieu liquide	29
II.2. Aspect microscopique de <i>candida albicans</i>	30
II.3. Recherche d'antagoniste	31
II.3.1. Méthode des puits ADT (Agar Well Diffusion Test) (Surnageant non neutralisé)	31
Conclusion	32
Référence bibliographique	33

Introduction

Nous entendons de plus en plus fréquemment parler de probiotiques que ce soit dans l'industrie alimentaire ou dans d'autres domaines comme la cosmétique ou le médical. Mais si le terme est connu, la véritable nature de ces « gentilles bactéries » et leur réelle influence sur notre santé restent bien souvent plus obscurs.

Les bactéries lactiques c'est bienfait sur la santé humain. En effet, les pathologies urogénitales font partie des premiers motifs de consultation en médecine générale ou directement au comptoir du pharmacien officinal et induisent une morbidité et un coût élevé pour notre système de santé. Cependant à un moment de leur vie, trois femmes sur 4 selon la majorité des auteurs seront exposées à des agents endogènes ou exogènes qui viendront perturber l'équilibre de leur flore urogénitale. En dehors des multiples infections, la perturbation de la flore urogénitale physiologique peut avoir des conséquences sur le domaine de la reproduction comme la fertilité mais également le déroulement de la grossesse.

D'autre part si les antibiotiques restent encore efficaces à ce jour, le développement des résistances pourrait être un problème dans le futur. L'utilisation des probiotiques en préventif comme en curatif pourrait alors se révéler être une piste valable dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutique

Donc notre travail consiste à évaluer l'intérêt de probiotiques (*Lactobacillus rhamnosus*) sur une infection urogénitale causé par l'agent pathogène *Candida albicans*. Il est formé de trois chapitre le premier parle de la flore urogénitale le deuxième les probiotiques et étude expérimentale en troisième chapitre. La partie pratique est réalisée au niveau de laboratoire de microbiologie de l'université de Mostaganem.

Chapitre I : La flore urogénitale physiopathologie

I.1. Historique

La découverte de l'existence des microorganismes composant notre flore date de 1683 par l'inventeur du microscope [Antonie Van Leeuwenhoek](#) quand il a observé l'existence de petits animaux mobiles dans un prélèvement de sa propre plaque dentaire mélangé à une phase liquide ([Gordon et Klaenhammer, 2011](#)).

Concernant la flore urogénitale et son lien avec notre santé, il faudra attendre la fin du 19^{ème} siècle avec les interrogations des praticiens obstétriques de l'époque concernant l'origine des sepsis puerpéraux chez les femmes enceintes ([Rampersaud et al, 2012](#)). En 1887, deux hypothèses se font alors concurrence. La contamination nosocomiale par les manipulations des médecins et sages-femmes sera la conclusion atteinte par Gönner. Il observe en effet la présence de flore pyogène (*streptocoques* et *staphylocoques*) au niveau des sécrétions vaginales ainsi que d'une multitude d'autres organismes mais sans parvenir à les mettre en culture ([Crutchet, 2016](#)).

L'auto-contamination est l'hypothèse défendue par Döderlein. Tout comme son confrère, il constate la présence des mêmes éléments pyogènes dans les sécrétions vaginales mais il note en plus la stérilité de prélèvements utérins incohérente avec une contamination survenue pendant l'accouchement. Cette investigation conduira ce dernier à la description et à la publication en 1892 d'une monographie dans laquelle il décrira le bacille de Döderlein renommé en 1928 *Lactobacillus acidophilus*. Il sera le premier à évoquer le lien entre la présence de ces bacilles, leur production acide et l'absence de pathogènes au niveau vaginal ([Crutchet, 2016](#)).

Le développement des techniques de cultures et d'analyses biologiques permettra de déterminer au cours du 20^{ème} siècle que la flore de Döderlein présente à la surface de la muqueuse vaginale est en fait composée de différentes espèces de microorganismes tels que différentes souches de lactobacilles, d'autres bactéries GRAM positives, des streptocoques et

staphylocoques (pathogènes et non pathogènes) ainsi que des bactéries GRAM négatives. (Crutchet, 2016).

I.2. La flore commensale vaginale

Elle est constituée de nombreux germes (3×10^7 à 10^{10} /gramme de sécrétions) qui constituent un véritable écosystème (Berrebi et Ayoubi, 1999). La flore endogène est dominée par le *Lactobacillus acidophilus* (Bacille de Doderlein) qui joue un rôle dans l'homéostasie de l'écosystème vaginal et dans la prévention de la colonisation par des microorganismes pathogènes. Les autres germes rencontrés dans le vagin normal sont des aérobies (*Lactobacillus sp*) et anaérobies (*Bfidobactérium*) présents en quantité minoritaire. Le tableau ci-dessous montre la fréquence des bactéries isolées du vagin chez les femmes indemnes d'infections.

Tableau 01 : Flore vaginale normale (Berrebi et al., 1999)

<u>Groupe I:</u> espèces microbiennes dont le portage est habituel : 98 à 100 % des flores normales :
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Lactobacillus sp</i> (Bacille de Doderlein) • <i>Corynebactérie</i> • <i>Streptocoques</i> et germes hémolytiques non groupable
<u>Groupe II:</u> espèces microbiennes dont le portage est fréquent: 2 à 40 % des flores normales :
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptocoques</i> du groupe B et D. • <i>Entérobactéries</i> (<i>Escherichia coli</i>,...) • Anaérobies (<i>Clostridium sp</i>, <i>Bacteroides</i>) • <i>Gardnerella vaginalis</i> et certaines corynebacteries • <i>Candida sp</i> • <i>Mycoplasmes</i> (<i>Mycoplasme hominis</i>,...)
<u>Groupe III:</u> espèces microbiennes dont le portage est exceptionnel : 0,2 à 2 % des flores normales :
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pneumocoques</i> et <i>Haemophilussp</i> • <i>Streptocoques</i> du groupe A

I.2.1. Les facteurs favorisant de la flore vaginale

a) Facteurs physiologiques

➤ Grossesse

Au cours de la grossesse, la CVV est due d'une part à une richesse en glycogène de l'épithélium vaginal qui se transforme en acide lactique par le bacille de Doderlein créant ainsi un milieu favorable à la prolifération de la flore lactique (caractère dominant de la flore vaginale de la femme enceinte). L'acide lactique généré entraîne une acidité vaginale très nettement favorable aux *Candida*. D'autre part, la grossesse entraîne des modifications complexes du système immunitaire maternel, qui se traduisent par une diminution des défenses immunitaires, phénomène désigné par [Weinberg en 1984](#) sous le nom de «Syndrome d'immunodéficience lié à la grossesse» ([Fart, 1995](#)).

➤ Cycle menstruel

Il a été constaté que chez certaines femmes, les épisodes mycosiques survenaient toujours au même moment dans le cycle et plus particulièrement, en deuxième moitié de cycle, lorsque la progestérone domine. En effet, un excès de progestérone favoriserait l'invasion candidosique d'une part par une amplification de l'expression des récepteurs membranaires lors de l'adhésion de *C. albicans* à la cellule hôte et d'autre part, en réduisant l'immunité locale (par une inhibition monocytair). En ce qui concerne l'oestrogène, son rôle est discuté selon les auteurs. Cependant, il a été démontré qu'une hyperoestrogénie agit en augmentant, dans la muqueuse vaginale, le taux des groupes disulfures (S-S), le glycogène et en fixant *C. albicans*, et en favorisant la formation des tubes germinatifs ([Mallie, 1998](#) ; [Diddle, 1969](#)).

➤ Le stress

Qu'il s'agisse d'un stress physique (fatigue, surmenage ...) ou psychique (surmenage intellectuel, soucis..), il peut entraîner une augmentation de la sécrétion de bêta-endorphine (surtout en période d'ovulation) qui aggrave les désordres immunitaires locaux et favorise la filamentation de *C. albicans* ([Bernard, 2005](#)).

b) Facteurs pathologiques

➤ **Maladies endocriniennes**

Le diabète ou l'hypothyroïdie non traité ou mal équilibré sont souvent cités comme prédisposant à la CVV [Bernard. \(2005\)](#). En effet, le diabète favorise le développement des infections à Candida par des mécanismes: une hyperglycémie, une diminution de l'activité phagocytaire des polynucléaires ([Read, 1992](#)).

➤ **Le sida**

Un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 200 par mm et une forte charge virale de VIH sont associés à une candidose vulvo-vaginale ([Fener et Criton, 2007](#)).

➤ **Troubles nutritionnels**

Les carences vitaminiques peuvent être à l'origine d'une immunodépression responsable de mycoses. Il peut s'agir ([Euzeby, 1994](#)):

- D'une carence en vitamine A, C et vitamines du groupe B.
- D'un excès de glucides dans l'alimentation et surtout une suralimentation glucidique digestive et parentérale.
- Une carence en fer.

c) Facteurs thérapeutiques

➤ **Antibiotiques**

Qu'ils soient actifs sur les germes aérobies (large spectre: tétracycline ou ampicilline), ou sur les germes anaérobies (clindamycine, céphalosporine de troisième génération), les antibiotiques favorisent la prolifération du Candida. En effet, ces antibiotiques éliminent une grande partie de la flore bactérienne intestinale saprophyte et suppriment de ce fait l'inhibition relative qu'elle exerce sur le développement du Candida ([Euzeby, 1994](#)).

Les antibiotiques par voie orale, ou même parentérale, favorisent la prolifération du champignon par une action indirecte s'exerçant par les modifications de la flore intestinale, avec une considérable réduction de celle-ci avec pour conséquence (Euzéby, 1994):

- Disparition d'organismes vivants concurrents.
- Manque de sécrétion par certaines bactéries de substances inhibitrices de la multiplication des Candida.
- Carences provoquées en vitamines du groupe B, notamment B1, B2 et B6, à la synthèse desquelles participe la flore du tractus digestif et dont la carence favorise le développement du Candida.

➤ **Les contraceptifs oraux**

Les pilules oestro-progestatifs favoriseraient les mycoses, par un excès de progestérone et une hyperoestrogénie. Chimiothérapie anticancéreuse, corticoïdes et immunosuppresseurs. Les corticoïdes favorisent la fixation des Candida. Les immunosuppresseurs (ex. le méthotrexate et la ciclosporine) favorisent les candidoses vaginales par une dépression de l'immunité cellulaire (Senet et Robert, 1995).

I.2.2. Rôle protecteur de la flore urogénitale

Les lactobacilles sont partie intégrante de l'équilibre du microbiote vaginal et les variations qualitatives et quantitatives dans leur population ont des répercussions sur la stabilité et l'homéostasie du milieu. Ils sont la première ligne de défense urogénitale et exercent leur activité protectrice en coopération avec leur environnement par la production de substances et par leurs rapports avec les autres espèces microbiennes présentes (Crutchet, 2016).

I.2.3. Rapports entre la flore et le glycogène vaginal

Les lactobacilles sont présents sur la surface de l'épithélium vaginal maintenu hydraté par un mélange de transudats provenant de ce dernier et de sécrétions provenant de glandes sécrétrices situées dans le tractus génital supérieur (endomètre et trompes de Fallope) et de la muqueuse cervicale. Au final, les sécrétions vaginales sont un mélange en proportions variables d'ions, de peptides, de glycoprotéines, d'acides lactique et acétique, de glycérol, d'urée et de glycogène. Elles contiennent également des cellules exfoliées dont celles

provenant de la couche superficielle de l'épithélium vaginal en période de stimulation oestrogénique (Boubli, 1998). Au cours de la dégradation de ces dernières, le glycogène contenu dans leur cytoplasme est libéré et rendu accessible pour sa métabolisation. Cependant, un grand nombre de lactobacilles ne sont pas capables de métaboliser directement ce substrat (Mckee *et al.*, 1996).

I.3. Activité anti microbienne des lactobacilles

I.3.1. Inhibition de la croissance du pathogène

a) Production d'acides organiques

Le glucose issu de la dégradation du glycogène est absorbé par les lactobacilles et dégradé par glycolyse anaérobie. Les lactobacilles et autres organismes consommant ce substrat dans le milieu vaginal produisent des lactates au niveau de leur cytoplasme, avant d'être excrétés dans le milieu extérieur où ils prendront selon le pH leur forme active d'acide lactique (O'Hanlon, 2011 ; Rowland, 2014). Si les lactobacilles sont les principaux contributeurs de l'acidification vaginale, ils ne sont pas les seuls à pouvoir réaliser la production d'acide lactique : l'épithélium vaginal est aussi un producteur (Gorodeski, 2005 ; Moench, 2013). Dans son action, l'acide lactique augmente la perméabilité membranaire des bactéries Gram négatives, entraînant une acidification du cytoplasme conduisant à une inhibition du métabolisme bactérien. Un autre acide est aussi détectable dans le microbiote vaginal, il s'agit de l'acide acétique. Il est métabolisé à partir de l'acide lactique présent dans le milieu par certaines souches bactériennes mais aussi par des lactobacilles.

b) Le peroxyde d'hydrogène

Certaines souches de lactobacilles sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène. Cette production se fait en l'absence de cytochrome, par l'intermédiaire de flavoprotéines qui couplées à une NADH peroxydase permet la formation de H₂O₂. La toxicité de ce composé s'effectue par sa conversion en un composé radicalaire cytotoxique qui entraîne la mort cellulaire par interaction avec les structures biologiques. Si des études *in vitro* ont démontré l'efficacité des peroxydes contre les pathogènes urogénitaux habituels, la réalité *in vivo* semble contredire ces observations (O'Hanlon, 2011).

c) Les bactériocines

Ce sont des substances protéiques antimicrobiennes synthétisées par les bactéries, à spectre d'action restreint. Elles agissent en créant des pores au niveau de la membrane induisant la lyse de la cellule. Au niveau vaginal, elles sont produites chez certaines souches comme *L. acidophilus*, *brevis*, *salivarius* ou encore *casei* sp *rhamnosus* et peuvent avoir une action synergique avec l'acide lactique ou le peroxyde d'hydrogène (Lecomte, 1999).

d) Compétition vis-à-vis des nutriments

Il s'agit d'empêcher la formation de métabolites nocifs en métabolisant le substrat nutritif concerné avec une autre enzyme donnant des produits non agressifs. L'exemple le plus connu est la métabolisation de l'arginine par l'arginine décarboxylase au cours des bactérioses vaginales qui conduit à la production d'une polyamine, la putrescine qui dégage une odeur de poisson caractéristique. Certains lactobacilles synthétisent une autre enzyme, l'arginine désaminase active sur le même substrat mais dont le métabolite est la citruline qui est une source nutritive pour les lactobacilles. Cette compétition pour les substances nutritives entraîne une limitation du développement des souches potentiellement pathogènes et des désagréments occasionnés par leurs produits de dégradation (Crutchet, 2016).

I.3.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène

a) Adhésion aux cellules épithéliales vaginales

Les lactobacilles présents en surface de l'épithélium vaginal constituent un biofilm couvrant au moyen de liaisons qui peuvent être spécifiques (adhésines se fixant sur des récepteurs épithéliaux spécifiques) ou non (liaisons de Van Der Waals, électrostatiques ou hydrogènes). (Lepargneur, 2002) La nature des adhésines est variable (protéique, polysaccharidique, lipoteichoïque...) et leur récepteurs peuvent être fixés à l'épithélium ou contenus dans le mucus vaginal (Crutchet, 2016).

b) Adhésion à la fibronectine humaine

C'est une protéine de haut poids moléculaire soluble dans les fluides physiologiques ou bien sous forme fibrillaire dans la matrice extracellulaire des muqueuses. Elle permet la

modulation des interactions entre la matrice et les cellules par l'intermédiaire d'adhésines et d'intégrines cellulaires. Elle constitue aussi une structure de base pour la fixation des communautés microbiennes présentes à son contact. Son activité adhésive est stimulée par l'acidité du milieu (Crutchet, 2016).

I.3.3. Inhibition de l'expansion du pathogène (co-agrégation)

Il s'agit d'une agrégation intercellulaire entre micro-organismes de souches ou d'espèces différentes au moyen de promoteurs d'agrégation dont l'activité peut être modulée par le milieu. C'est un mécanisme spécifique de certaines populations comme par exemple *L.gasseri*, *L.acidophilus*, *L.jensenii* qui se co-agrègent avec *E.coli*, *C.albicans* et *G.vaginalis* mais pas avec *S.agalactiae*. Ainsi il empêche la fixation des pathogènes sur l'épithélium en les privant de l'accès aux récepteurs par encombrement stérique. (Landay, 2013)

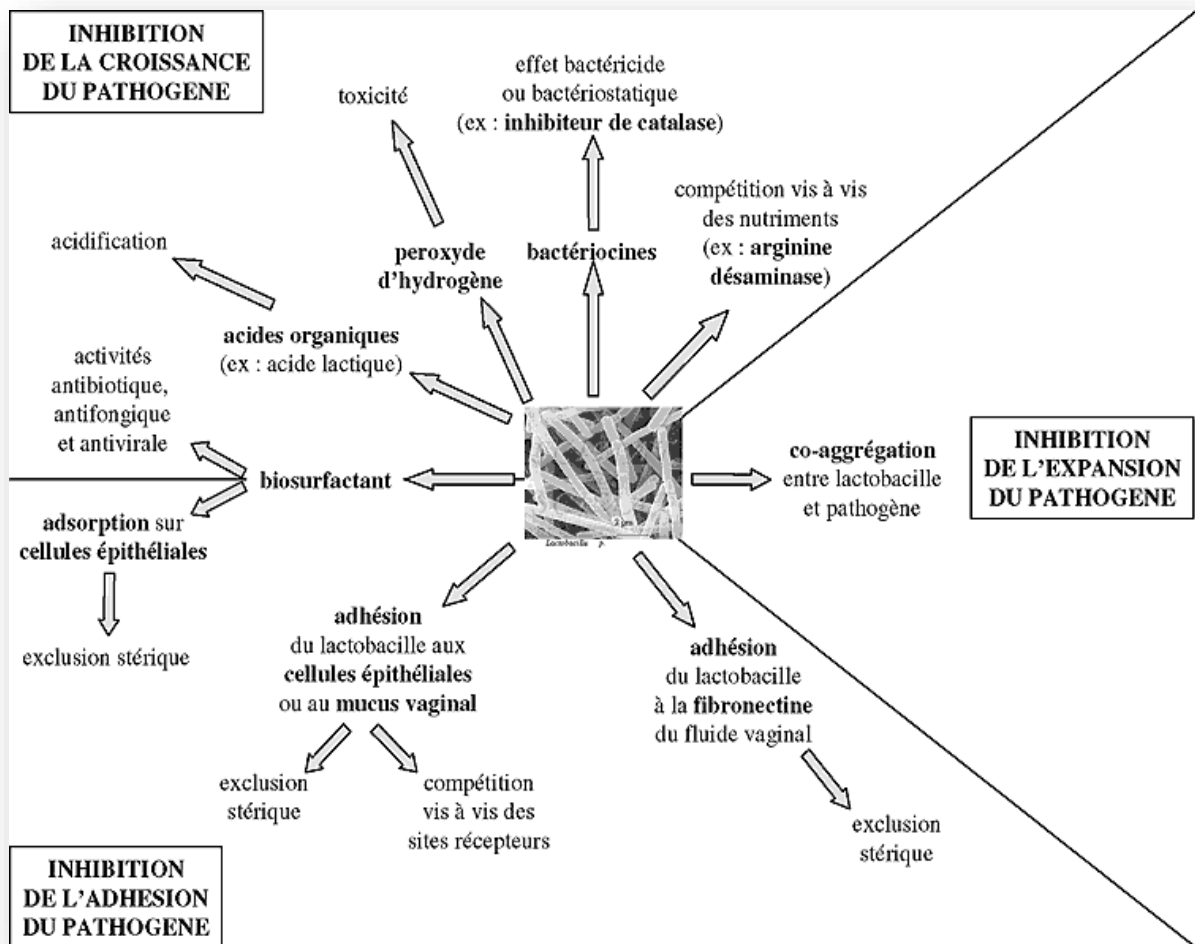


Figure 1: effets des lactobacilles vaginaux sur les souches à potentiel pathogène (Landay, 2013)

I.4. Les pathologies de l'appareil urogénital

I.4.1. Les infections de l'appareil urinaire

I.4.1.1. Physiopathologie des infections urinaires

En règle générale, l'appareil urinaire est considéré comme stérile à l'exception des premiers centimètres de l'urètre. Lorsqu'une contamination survient, elle déclenche une réponse inflammatoire de l'urothélium. Elle peut être limitée à la vessie (cystite) ou remonter dans le tractus urinaire supérieur jusqu'au rein (pyélonéphrite). L'infection urinaire se manifeste par un syndrome irritatif associant ou non une pollakiurie (augmentation de fréquence sans augmentation du volume), des brûlures et une impériosité détériorant le confort mictionnel qui mènent souvent à la consultation. (Lepargneur, 2002). D'autres signes inconstants peuvent se manifester comme la présence de globules blancs dans les urines (trouble plus ou moins important) associée ou non à une mauvaise odeur, une pesanteur vésicale pouvant être douloureuse, une dysurie et enfin une hématurie qui n'est ni spécifique, ni un facteur de gravité contrairement à deux autres critères: une fièvre supérieure à 38°C et une douleur abdominale et/ou lombaire. Ils indiquent l'évolution de l'infection en pyélonéphrite nécessitant une prise en charge hospitalière (Crutchet, 2016).

I.4.1.2. Les principaux agents pathogènes

Les uropathogènes sont classés en quatre groupes en fonction de leur pathogénicité comme figuré dans le tableau 2 (Belin et Bontemps, 2012),

Tableau 02: classification des uropathogènes (Belin et Bontemps, 2012),

Groupe I	Bactéries considérées comme pathogènes même faible bactériurie ($\geq 10^3$ UFC/ml) <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Groupe II	Bactéries souvent impliquées : <i>Entérobactéries autres qu'E.coli (Klebsiella spp, Proteus sp, Enterobacter...)</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus sp</i> <i>Corynebacterium urealiticum</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Groupe III	Bactéries dont l'implication est peu fréquente avec bactériurie élevée ($\geq 10^5$ UFC/ml) et isolation dans au moins deux échantillons d'urine <i>Staphylocoques à coagulase négative autres que saprophyticus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Aerococcus urinae</i> <i>Pseudomonaceae autres que aeruginosa</i> <i>Acinetobacter spp.</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Groupe IV	Espèces appartenant aux flores urogénitales considérées en général comme contaminants <i>Streptocoques ahémolytique, Gardnerella vaginalis, Lactobacillus spp., bacilles corynéformes sauf C.urealyticum.</i>

Les germes du groupe I sont le plus souvent retrouvés en cas d'infection et sont généralement synonyme d'une contamination fécale.

I.5. Pathologies de l'appareil génital

I.5.1. La vaginose bactérienne non spécifique

I.5.1.1. Physiopathologie

Le mécanisme de survenue de la vaginose bactérienne n'est pas clairement connu cependant, les auteurs semblent s'accorder sur le fait qu'elle est synchronisée à une déplétion des populations de Lactobacilles du microbiote vaginal. Les populations bactériennes sont alors multipliées par 1000, et le microbiote devient hautement diversifié. Il faut également noter que la vaginose bactérienne est une pathologie polymicrobienne : la présence de *Gardnerella vaginalis* seule n'est pas suffisante pour provoquer les symptômes. C'est en effet une flore dont le polymorphisme semble être la source ([Crutchet, 2016](#)).

I.5.1.2. Principaux agents pathogènes

➤ Gardnerella vaginalis

C'est un petit bacille anaérobie facultatif, immobile et de Gram variable. Il peut être assemblé en paires ou en palissades et sa culture sur gélose au sang humain produit de petites colonies gris-bleues entourées d'une zone de β -hémolyse ([Denis et al, 2011](#)).

➤ Mobiluncusspp

Ce sont des bacilles anaérobies à Gram positif mais apparaissant souvent variables ou négatif du fait de la faible épaisseur du peptidoglycane au niveau de la paroi bactérienne, induisant une facilité de décoloration. Leur forme est incurvée et ils sont mobiles à l'état frais. ([Denis et al, 2011](#)).

➤ Atopobium vaginae

C'est un bacille à Gram négatif, aéro-anaérobie facultatif, se présentant en chaînes courtes ou en paires ([Denis et al, 2011](#)).

➤ Mycoplasmes

Ce sont de bactéries aéro-anaérobies facultatives de très petite taille dépourvues de paroi. Leur identification passe par leur culture lente (48 h à 20 jours) sur des milieux contenant des stéroïdes ([Denis et al, 2011](#)).

I.5.2. La vaginite à Candida

De nos jours, les mycoses vaginales dues à l'espèce *C. albicans* sont très fréquentes. L'espèce *C. albicans* n'existe qu'à l'état endosaprophyte sur les muqueuses génitales et digestives qui en constituent le réservoir principal dès les heures qui suivent la naissance. Sa dissémination vers les voies génitales est généralement d'origine endogène et se fait à partir du tube digestif. *C. albicans* est susceptible de persister en équilibre écologique avec la flore vaginale pendant des mois, voire des années, sans manifestations cliniques (saprophytisme) (Benmansour, 2012)

Tableau 03: Classification du *C. albicans* (Kwon Chung et Bennet 1992).

Règne	<i>Champignons</i>
Division	<i>Eumycota</i>
Phylum (Sous-division)	<i>Deuteromycotina</i>
Classe	<i>Blastomycète (Levures asexuées)</i>
Ordre	<i>Moniliales</i>
Famille	<i>Moniliaceae</i>
Genre	<i>Candida</i>
Espèce	<i>Candida albicans</i>

Le genre *Candida* compte 196 espèces, dont seulement une dizaine ont été reconnues pathogènes pour l'homme, en raison de leur faculté d'adaptation à la température de 37°C (Benmansour, 2012)

La contamination est essentiellement endogène, c'est à dire que c'est la femme qui se contamine avec ses propres *Candida*. Sous l'influence de facteurs favorisant, cette levure peut passer d'un état saprophyte à un état pathogène grâce à un phénomène de dimorphisme qui lui est propre. *C. albicans* est donc une levure opportuniste qui profite d'un déséquilibre de la flore vaginale ou d'un déficit immunitaire pour se multiplier et coloniser la muqueuse vaginale (Benmansour, 2012).

I.5.2.1. Caractères morphologiques et les conditions de croissance

Les blastospores ou blastoconidies C'est la forme la plus courante de multiplication de *C. albicans*. Elles se présentent sous forme de petites cellules ovoïdes de 3,5 à 6 micromètres sur 6 à 10 micromètres. Cette cellule peut émettre un bourgeon qui donnera une cellule fille identique à la cellule mère (Benmansour, 2012)

Toutes les espèces du genre *Candida* sont aérobies. Il vit exclusivement sur les muqueuses. Il peut cependant survivre dans le milieu extérieur, mais il est détruit par le lavage du linge, la stérilisation du matériel médical et des cathéters. En effet, la croissance est possible pour des pH allant de 3 à 7. La température de croissance entre 20°C et 30° C pour la majorité des levures. Les espèces pathogènes sont capables de croître à 37 ° C (Benmansour, 2012)

I.5.2.2. Caractères physiologiques

Les différentes espèces de *Candida* se distinguent par leurs caractères nutritionnels et biochimiques. Nous nous intéresserons plus particulièrement à *C. albicans*, qui est la levure pathogène la plus fréquemment rencontrée (Benmansour, 2012) :

- Cette espèce possède la propriété de fermenter le glucose et le maltose, mais pas le lactose, ni le raffinose, ni le saccharose.
- Elle est incapable de réduire les sels de tétrazolium et de les transformer en un composé coloré (la colonie restera blanche).
- *C. albicans* n'est pas inhibé par l'actidione.
- *C. albicans* réduit le sulfite de bismuth (milieu de Nickerson Cator).
- *C. albicans* n'élabore pas d'uréase.
- *C. albicans* produit une protéase kératolytique, capable de digérer la couche cornée de l'épiderme, d'où la pathogénicité du champignon lorsqu'il est présent à la surface de la peau.

Chapitre II : les probiotiques

II.1. Définitions

Le terme « probiotique » signifie « pour la vie » et désigne des microorganismes vivants qui, ingérés en quantité appropriée, produisent un bénéfice pour la santé de l'hôte qui vont au delà des fonctions nutritionnelles de base. (Ezzariga, 2015).

Les probiotiques sont souvent des bactéries lactiques (*lactobacilles* et *bifidobactéries*) ou des levures introduites dans l'alimentation sous forme de produits lactés fermentés ou de suppléments alimentaires. Ces micro-organismes renforcent la flore intestinale et vaginale. Leur présence permet notamment de lutter contre la prolifération des bactéries pathogènes. Plusieurs études cliniques ont déjà démontré l'efficacité de certains probiotiques dans le traitement de maladies systémiques et infectieuses telles la diarrhée aigue et la maladie de Crohn. D'autres études ont suggéré une application potentielle pour le traitement des infections urogénitales, de cancers du colon, de dermatite atopique et des maladies allergiques notamment l'allergie alimentaire telle que l'intolérance au lactose (Mukandayambaje, 2009).

II.2. Relation probiotiques, prébiotiques, synbiotiques

II.2.1. Probiotiques et prébiotiques

Les prébiotiques sont à distinguer des probiotiques, car ce ne sont pas des microorganismes. Ils sont définis comme étant des « ingrédients alimentaires non digestibles qui stimulent de manière sélective au niveau du côlon la croissance et/ou l'activité d'une ou d'un nombre restreint d'espèces bactériennes susceptibles d'améliorer la physiologie et donc la santé de l'hôte » (Ezzariga, 2015). Ils sont considérés comme des facteurs de croissances des probiotiques. Un composé prébiotique doit avoir les trois caractéristiques suivantes Ezzariga. (2015) :

- Ne pas être digéré ni absorbé avant d'atteindre le côlon,
- Être un substrat sélectif d'une ou plusieurs bactéries de la flore intestinale ayant un rôle bénéfique sur la santé,

- Modifier la composition de la flore intestinale dans un sens favorable à la santé, soit en favorisant la croissance de bactéries bénéfiques, soit en atténuant celle des souches pathogènes.

La plupart sont des glucides d'origine végétale ou synthétique. Certains prébiotiques sont naturellement présents dans des aliments, et d'autres sont ajoutés dans des aliments à visée fonctionnelle ou dans des suppléments alimentaires (Ezzariga, 2015).

II.2.2 Probiotiques et synbiotiques

Un composé synbiotique est un produit qui contient à la fois un probiotique et un prébiotique (Ezzariga, 2015). L'effet synergique n'est pas requis, mais il est possible que le prébiotique soit ajouté afin de favoriser la survie et l'activité des souches probiotiques. Si une telle relation est indiquée, elle doit être scientifiquement démontrée (Rousseau, 2004).

II.3. Critères de sécurité

Une série de principes généraux et de critères pratiques ont été mis en place pour sélectionner les souches probiotiques les plus sécuritaires. (Ezzariga, 2015).

II.3.1. Identification de la souche

Les effets des probiotiques étant souche-spécifiques, il est nécessaire de caractériser de manière précise les souches utilisées. La détermination taxonomique d'une souche potentiellement probiotique est une étape indispensable (Ezzariga, 2015).

Les souches probiotiques doivent être identifiées via des méthodes moléculaires fiables de détermination du phénotype et du génotype. Pour spécifier l'appartenance d'une souche à une espèce, l'hybridation ADN-ADN est la méthode de référence, mais le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S est une technique tout aussi pertinente. L'identification de la souche doit ensuite être réalisée avec une méthode génétique reconnue telle que l'électrophorèse en champ pulsé (Ezzariga, 2015).

Toutes les souches probiotiques doivent être déposées dans une collection de cultures reconnue à l'échelon international. A chaque souche est attribué un code alphanumérique d'identification choisi par le laboratoire ou la collection. Une fois identifiées, les bactéries

probiotiques doivent être nommées selon les règles du Code International de Nomenclature des Bactéries pour une compréhension universelle (Nom du genre / nom de l'espèce / identifiant de la souche) (Ezzariga, 2015).

II.3.2. Innocuité

Un microorganisme probiotique doit présenter une totale innocuité pour le consommateur, c'est-à-dire être non toxique et exempt de toute pathogénicité. Ce critère de sécurité semble évident, mais il est important de l'évaluer précisément pour chaque souche potentiellement probiotique, en étudiant tout effet indésirable possible (résistance aux antibiotiques, activités métaboliques nocives, production de toxines, potentiel infectieux, activité hémolytique) (Ezzariga, 2015).

II.3.3. Critères fonctionnels

Afin d'être conformes à la définition établie par la FAO/OMS, les microorganismes utilisés comme probiotiques doivent survivre, persister temporairement dans tractudigestif et montrer une activité qui doit se traduire par des effets positifs sur la santé de l'hôte. Les exigences fonctionnelles des probiotiques sont établies à l'aide de tests *in vitro* qui se réfèrent à des propriétés bactériennes et plus rarement à des effets probiotiques proprement dits (Boucheфра, 2012).

II.3.4 Critères technologiques

En plus des critères de sécurité et fonctionnels, plusieurs aspects technologiques doivent être pris en compte dans la sélection des souches probiotiques. En effet, les caractéristiques des souches ne doivent pas être altérées durant les procédés de production du probiotique. Les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation du produit et fournies en dosage approprié jusqu'à la date de péremption. A ce propos, des études doivent être menées pour déterminer la date limite d'utilisation de chaque produit probiotique sans diminution ou perte de leurs propriétés bénéfiques (Guarner, 2008).

II.4. mécanisme d'action et effets bénéfiques des probiotiques

La diversité des situations cliniques dans lesquelles une efficacité des probiotiques a été démontrée suggère qu'un mécanisme d'action unique est improbable, et qu'au contraire, ce sont de multiples mécanismes qui sont impliqués (Ezzariga, 2015).

Les bactéries probiotiques ont le potentiel d'améliorer la santé gastro-intestinale de l'hôte et d'atténuer les symptômes de certaines maladies. Les effets santé des probiotiques peuvent être classés selon trois modes d'action généraux. D'abord, ils agissent sur les fonctions intestinales en modifiant l'activité enzymatique et la motricité intestinale. Ensuite, ils modulent le microbiote intestinal en influençant la production de certaines substances microbiennes (toxines), en faisant compétition avec les pathogènes ou en modifiant la physico-chimie de la lumière intestinale. Finalement, ils ont aussi le potentiel de moduler la réponse immunitaire de l'hôte, incluant l'immunité innée et adaptative. Ces modes d'action sont grandement impliqués dans la défense contre les infections, la prévention du cancer, la stabilisation et la reconstitution du microbiote intestinal (Ezzariga, 2015).

II.5. Applications thérapeutiques

II.5.1. Les infections vaginales

La flore vaginale tient une place centrale dans la prévention des infections et l'équilibre physiologique de l'appareil urogénital féminin. Chez une femme saine, 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 (estrogènes), l'âge, la contraception, l'hygiène et l'activité sexuelle de la femme (Bergogne-Berezin, 2007 ; Lepargneur, 2002).

La flore microbienne normale est principalement constituée de lactobacilles, appelés également bacilles de Döderlein, qui forment un biofilm sur la muqueuse. D'autres espèces sont présentes à des taux très variables parmi lesquelles dominent les espèces anaérobies. Les lactobacilles assurent l'essentiel de la défense microbienne génitale en inhibant la croissance, l'adhésion ou l'expansion d'autres micro-organismes. L'équilibre écologique de la flore de Döderlein est parfois perturbé par l'utilisation de médicaments tels que les antibiotiques, les antifongiques ou les contraceptifs oraux. Des dispositifs à usage local peuvent également déséquilibrer la flore, tels que les tampons périodiques, certains spermicides, les diaphragmes ou les dispositifs intra-utérins. Enfin, certains états peuvent être associés à un déséquilibre de

la flore vaginale comme la grossesse ou une immunodépression (Barrons *et al.*, 2008). Les lactobacilles de la flore vaginale, grâce à leurs propriétés antimicrobiennes, régissent les autres microbiotes urogénitaux. Une perturbation de l'équilibre microbien de la flore vaginale favorise le développement de bactéries commensales ou l'infection par des pathogènes exogènes, ce qui provoque des infections vaginales mais aussi des infections du tractus urinaire. Les vaginoses bactériennes sont parmi les pathologies infectieuses génitales les plus fréquente. Elles sont dues à la prolifération de bactéries commensales potentiellement pathogènes suite à un déséquilibre de la flore vaginale. Malgré un traitement approprié, les taux de récurrences sont très importants. 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. Des résultats encourageants ont été obtenus dans la prévention des récurrences avec des souches de *Lactobacillus rhamnosus* et de *Lactobacillus reuteri* (Bohbot *et al.*, 2012).

Dans une revue systématique publiée en 2009, des chercheurs ont comparé l'efficacité de différents traitements contre la vaginose bactérienne. Ils ont conclu que l'utilisation locale de lactobacilles est plus efficace que les antibiotiques prescrits par voie orale (clindamycine, métronidazole). En outre, les antibiotiques donnent de meilleurs résultats s'ils sont combinés à des suppléments alimentaires de lactobacilles. Aucune des études cliniques entreprises depuis la publication de cette revue n'est venue contredire ces conclusions (Oduyebo *et al.*, 2009). En 2007, une revue de littérature a été publiée afin d'évaluer l'efficacité des probiotiques sur la vaginose bactérienne chez la femme enceinte. La compilation des résultats provenant des deux revues incluses indique que la consommation de probiotiques réduit de 81% le risque d'infection génitale. Des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer l'utilisation de probiotiques dans le traitement des infections vaginales (Othman, 2007).

II.5.2. Les candidoses vulvo-vaginales

Sont des infections mycosiques très répandues qui affectent une large proportion de femmes en âge de procréer. L'agent pathogène est généralement *Candida albicans*, une levure opportuniste qui se développe lors de la rupture de l'équilibre vaginal et du mécanisme de l'immunité locale. La recolonisation vaginale grâce à l'utilisation de *Lactobacillus acidophilus* permettrait de restaurer le pH vaginal et d'activer la croissance normale de la

flore bactérienne. Dans la prévention des récurrences, le bénéfice de l'utilisation des probiotiques est discuté. Des études *in vitro* ont montré que les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de *Candida 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 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus fermentum* administrés soit oralement, soit par voie vaginale. Ces derniers permettraient une colonisation du vagin ou/et la prévention de la colonisation et de l'infection par *Candida albicans*. Une étude récente vient renforcer ces conclusions en montrant que l'adjonction de lactobacilles renforcerait le traitement classique au fluconazole (Ezzariga, 2015).

II.5.3. Les infections urinaires

Les infections des voies urinaires sont parmi les infections bactériennes les plus courantes chez les femmes. Elles correspondent à une inflammation associée à une infection de la vessie causée par la prolifération anormale d'agents infectieux dans le système urinaire. Elles concernent surtout les femmes de 20 à 30 ans, ainsi que les femmes ménopausées (Ezzariga, 2015).

Le principal pathogène en cause est *Escherichia coli* uropathogène. Cette bactérie fait partie de la flore fécale, colonise ensuite le vagin et l'urètre distal, puis atteint la vessie. Les réservoirs de bactéries uropathogènes peuvent demeurer dans le tractus gastro-intestinal et dans le vagin de la personne sensible. Les lactobacilles du vagin préviennent la colonisation initiale des bactéries uropathogènes. La restauration de la flore urogénitale par des lactobacilles semble alors intéressante pour lutter contre les infections urinaires. L'évaluation de l'efficacité et de la sécurité des probiotiques dans la prophylaxie des uropathogènes a mis en évidence l'intérêt de la plupart des lactobacilles et en particuliers de certaines souches : *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri* semblent être les plus efficaces, *Lactobacillus casei*Shirota et *Lactobacillus crispatus* ont également montré une efficacité dans certaines études alors que *Lactobacillus rhamnosus* GG ne semble pas être si probant. Les probiotiques révèlent un bon profil d'innocuité et peuvent être bénéfiques pour prévenir les infections urinaires récurrentes chez les femmes (Ezzariga, 2015).

Chapitre I : Matériels et méthodes

I.1. Matériels

I.1.1 L'objectif :

Mettre en évidence l'activité antimicrobienne de bactérie lactique (*Lactobacillus rhamnosus*) et anti-asptiquesur vis-à-viscandida albicans agents pathogène responsable des quelques infections urogénitales (*candida albicans*).

I .1.2. Présentation du lieu de l'étude expérimental

Notre étude expérimentale a été réalisée auniveau de laboratoire de microbiologie N°03 site III (UMAB Mostaganem).

I .1.3. Matériels expérimentales

I.1.3.1. Les souches bactériennes

I .1.3.1.1. Souche lactique

Tableau N° 04 : la nature et l'origine de la souche lactique utilisée (d'après l'étudiante)

Souche	Référence	Milieu de culture
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Laboratoire de recherche d'université de Mostaganem	MRS Bouillon

I.1.3.1.2. Les souches pathogènes

Tableau N°05: La souche pathogènes (d'après l'étudiante)

Souche	Référence	Milieu de culture
<i>Candida Albicans</i> ATCC10231	Laboratoire de recherche d'université de Mostaganem	Sabourand Bouillon

I.1.4. Les milieux de culture

Les différents milieux de culture utilisés sont :

- **Milieu MRS** (Man, Rogosa, Sharp) bouillon et Gélose et semi-solide : utilisé pour Favoriser la culture des Bactéries lactiques du Genre *Lactobacillus spp* (De Manne et al. 1960)
- **Milieu Sabouraud** bouillon : utilisé pour la réactivation de notre souche pathogène *Candida Albicans* ATCC10231

I.1.5. Appareillage

- Autoclave
- Etuve bactériologique
- Centrifugeur
- Balance de précision
- Bain marie
- Bec bunsen
- Agitateur
- Congélateur
- La jarre
- La haute

I.1.6. Réactifs et solutions

- H₂O₂
- Thiosulfate
- Huile à immersion
- Les solutions tampons

I.1.7. Verrerie et petit matériel

- ❖ Pipettes Pasteur,
- ❖ Flacons en verre (de 250 ml),
- ❖ Tubes à essai, à visse en Verre,
- ❖ Pipettes graduées (1ml, 5ml, 10ml ...),
- ❖ Boîtes de pétri en plastique,
- ❖ Béchers de 200, 500 et 1000 ml,

- ❖ Erlen Myers,
- ❖ Micropipette (200 µl) et (100 µl),
- ❖ Burette,
- ❖ Anse de platine,
- ❖ Tubes ependroff

I .2. Méthodologie utilisée

I .2. 1. La technique de réactivation des souches

Les souches bactériennes ont été réactivées avant leur utilisation dans les tests d'inhibition à partir d'un stock de culture sur des milieux gélosés, réalisées sur milieu MRS liquide pour les bactéries lactiques, et le milieu sabouraud pour *candida albicans* à raison de 05 ml de milieu de culture dans chaque tube ; ensuite, elles sont

I .2.2.1.1. Caractérisation morphologique

Cette étude est conçue par des observations macroscopiques et microscopiques des isolats.

I.2.2.1.1.1. Examen macroscopique

Cet examen permet de constater la morphologie des colonies obtenues sur milieux solide. Ainsi, déterminer la forme, taille, couleur et aspect des colonies et sur milieu liquide présentant un trouble du milieu. (Johnson et al., 1980).

I.2.2.1.1.2. Examen microscopique

Basé sur la morphologie des cellules bactériennes et leur mode d'association observés par microscope optique.

➤ Observation microscopique à l'état frais

Une préparation à l'état frais permet d'examiner la mobilité des bactéries et d'en déceler la forme, bien que ce renseignement soit plus accessible sur des frottis colorés.

➤ **Technique de la préparation de l'état frais :**

- Déposer une petite goutte d'eau stérile sur la lame.
- Prélever une fraction de colonies sur gélose
- Faire une suspension homogène dans la goutte d'eau en incorporant progressivement l'inoculum,
- Recouvrir d'une lamelle en évitant d'enfermer des bulles d'air.
- Le liquide ne doit pas déborder (sinon jeter la lame dans une solution désinfectante et recommencer).
- Observer à l'objectif 40
- Après observation, jeter l'état frais dans un bac contenant un désinfectant car les bactéries sont vivantes.

Des bactéries sont considérées comme mobiles lorsque des trajets très différents sont observés (déplacement dans toutes les directions). Une bactérie immobile est animée de mouvements d'agitation normaux appelés mouvements browniens, qu'il ne faut pas confondre avec la mobilité (Canler, 2005).

➤ **Observation microscopique d'un frottis coloré**

La réalisation de frottis de bonne qualité est une condition préalable à toute coloration

I.2.2.2. Technique de préparation des frottis:

Avant toute coloration, il faut réaliser un frottis, c'est-à-dire un étalement et fixation des bactéries sur une lame. La technique du frottis est fort simple :

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile si la culture prélevée est solide, puis prélever à l'aide de l'anse de platine une parcelle de la culture.
- Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.

Réaliser le frottis en partant du centre de la lame, en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires de façon à obtenir un étalement mince et homogène sur au moins 2/3 de la lame. Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen sans trop le chauffer. Une fois sec, passer dans la flamme le frottis 3 ou 4 fois une demi-seconde, pour le fixer.

Le frottis étant fixé, la lame ne présente plus de danger de contamination. On peut alors effectuer la coloration désirée.

Remarque : avant de colorer, attendre que la lame refroidisse sous peine de cristallisation du premier colorant ou de casse de la lame.

➤ **Coloration simple (la fuchsine)**

La coloration la plus informative est la coloration de Gram. Une coloration au bleu de méthylène peut apporter des informations concernant la morphologie des germes (Canler, 2005). Sur le frottis fixé et refroidi :

Faire couler la solution de bleu de méthylène jusqu'à ce que toute la lame soit recouverte. Laisser agir 1 minute. Rincer abondamment la lame avec le jet d'une pissette d'eau distillée, ou à l'eau du robinet jusqu'à élimination des colorants en excès. Sécher à l'air ou devant le bec bunsen, ou encore sécher délicatement entre deux feuilles de papier filtre fin (ou buvard), sans froter.

Examiner au microscope, objectif 100 avec une goutte d'huile d'immersion.

Les bactéries sont colorées en bleu sombre. Cette coloration est intéressante pour l'observation rapide des frottis mais elle permet seulement l'étude de la morphologie des bactéries.

I.2.3. Conservation des souches

Selon le temps de conservation désiré, les souches pures sont conservées de la manière suivante :

Conservation à courte durée : les souches purifiées sontensemencées sur Gélose MRS incliné, sont incubées à la température d'isolement pendant 14h en culture jeune et après croissance bactérienne, ces cultures sont conservées à 4°C au réfrigérateur (Kihal, 1996 ; Labioui et al. 2005)

Conservation à long terme : les souches pures sont ensemencées en cultures jeunes sur milieux liquides, après incubation de 14h :

1. Mettre 600 µl de la culture bactérienne dans un micro tube.
2. Ajouter 400 µl de glycérol. Agiter le micro tube, centrifuger brièvement.
3. Sur une étiquette, noter la date et le contenu.
4. Coller cette étiquette et mettre le micro tube à -20°C

I.2.4 Préparation de l'inoculum

La préparation des surnageant s'effectue par la mise en culture des souches lactiques qui seront par la suite centrifugées à 10000 tours/min pendant 10 min. on sépare le culot de la suspension dans des conditions stériles.

I.2.5 Méthode des puits ADT (Agar well Diffusion Test)

Les bactéries lactiques synthétisent des molécules à action bactéricide/bactériostatique comme les acides organiques, le peroxyde d'hydrogène, le dioxyde de carbone, le diacétyle et les bactériocines. Ces mécanismes antimicrobiens ont été exploités pour améliorer la préservation des aliments (Titiek *et al.*, 1996 ; Labioui *et al.*, 2005).

Pour la mise en évidence de la production de ces molécules par les souches testées, nous avons choisi La méthode de diffusion en puits ADT selon (Cintas *et al.*, 1995) basées sur le principe que ces substances qui peuvent diffuser dans un milieu de culture semi-solide qu'on inocule préalablement avec une souche cible; le résultat se manifeste alors par l'apparition de zones d'inhibition autour des colonies.

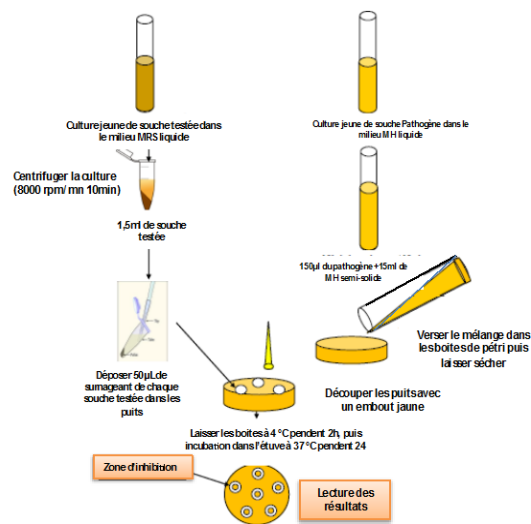
Cette méthode consiste a utilisé le mélange de 1000µl de souche indicatrice avec une charge de 10^7 UFC /ml avec 15ml de milieu de culture semi-solide à 45°C à l'aide d'un vortex. Ce mélange a été coulé en boîte de pétrie de 90mm de diamètres sur une épaisseur de 4 mm Les boîtes sont Ensuite mises à sécher pendant 15 mn a la température ambiante ; nous avons aménagé les cavités (puits) de 6 mm de diamètre à l'aide d'une pipette pasteur dans la gélose. Puis nous avons remplis les puits par 50µl de surnageant de bactérie lactique qui a été obtenu par centrifugation à 10000 tr/min pendant 10 min d'une culture bactérienne jeune de la même charge de souche cible.

On a réalisé cette méthode par deux types de surnageant :

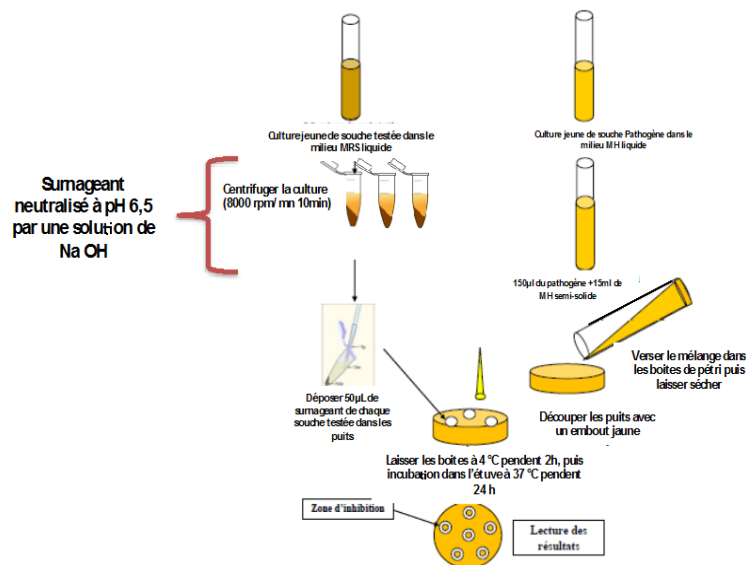
- ✓ Surnageant neutralisé à pH 7 par une solution de NaOH 0,1N.
- ✓ Surnageant non neutralisé.

Après 3h d'incubation à 4°C, les boîtes ont été incubées en anaérobiose à 37°C Pendant 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition apparaissant autour des puits ont été mesurés (moyenne de deux diamètres perpendiculaires).

Etude de l'antagoniste par la méthode de diffusion en puits ADT (Surnageants non neutralisés I)



Etude de l'antagoniste par la méthode de diffusion en puits ADT (Surnageants neutralisé)



Le terme Thiosulfate désigne les ions thiosulfate $S_2O_3^{2-}$. C'est la forme basique de l'acide thiosulfurique $H_2S_2O_3$, instable en milieu aqueux. Selon un aspect préféré de l'invention, les pathogènes dont la croissance est inhibée par l'association de thiosulfate et de lactobacille appartiennent à la famille de *Candida albicans*, des *Prevotella bivia*, des *Gardnerella vaginalis*, des *Mycoplasma* ou des *Mobiluncus*.

Enfin, l'invention concerne aussi une nouvelle utilisation du thiosulfate et en particulier du thiosulfate de sodium, pour le traitement des infections urogénitales telles que les vaginoses, les candidoses, et les infections urinaires par potentialisation de l'effet anti pathogène des lactobacilles(NIVOLIEZ.2014)

Conclusion

La santé de notre microbiote urogénital est très largement dépendante de l'équilibre de son écosystème largement dominé par les lactobacilles, la perturbation de ce dernier est responsable de l'apparition des pathologies urogénitales si fréquentes et invalidantes pour les femmes qui en souffrent. Depuis une dizaine d'années, le marché des probiotiques s'est enrichi de nombreux produits parmi lesquels il est difficile de faire le tri entre les aspects purement « marketing » et les réels effets positifs sur la santé. Le principe de l'utilisation des probiotiques dans les pathologies urogénitales semble cependant attractif avec de solides bases scientifiques et une stratégie cohérente puisqu'il s'agit de remplacer une flore déficiente par la même espèce bactérienne la composant, administrée par voie locale ou et exerçant son action par la production d'acides (lactique surtout), de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines ou en modulant les réponses inflammatoire et immunitaire de la muqueuse. L'analyse de la littérature, plus ou moins nombreuse selon les applications, manque encore d'études cliniques d'efficacité standardisées. Même les méta-analyses publiées ces dernières années peinent à conclure mais tendent néanmoins à reconnaître l'intérêt d'approfondir les investigations concernant les propriétés bénéfiques des souches probiotiques et leurs applications urogénitales

Le présent travail permis de la mise en évidence l'effet antimicrobien de la souche *lactobacillus rhamnosus* sur la souche responsables des infections urogénitales *candida albicans*. Les résultats présentés dans ce travail permettent de confirmer l'intérêt de potentiel antimicrobien des souches *Lactobacillus rhamnosus* représentent une des solutions de la thérapie urogénitale.

Bibliographies

A

- AUDE. C, Intérêt de l'utilisation des probiotiques en thérapeutique urogénitale. pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE UNIVERSITE DE BORDEAUX DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES. LA France 2016.
- Achemchem F. et Abrini J., 1997. Production de bactériocines par des bactéries lactiques à partir du jben de chèvre du Nord du Maroc. *Journal of Applied Microbiology*, 70 : pp 660-669.
- Allouche F.N., Hellal A., Laraba A., 2010. Etude de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles thermophiles utilisées dans l'industrie laitière. *Revue Nature et Technologie*. N° 03 : pp 13 -20.
- Ammor S., Tauveron G., Dufor E. et Chevalier I., 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17: 454-461.
- Ali QS, Farid A J, Kaibeier B M, Zemberi S, Shuhaimi M, Ghazali H M & Yazid A M. (2007). Adhesion properties of Bifidobacterium Pseudocatenulatum G4 and Bifidobacterium longum BB536 on HT-29 Human Epithelium Cell Line at Different Times and PH *International of Biological and Life Sciences* 3:4 2007.

B

- Barrons R, Tassone D. Use of Lactobacillus Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women: A Review. *Clinical Therapeutics*. 2008;30:453-68.

- Bazo M. (2011). Recherche des effets de l'activité antibactérienne des bactéries lactiques sur le staphylococcus aureus résistant à la methicilline (SARM). Thèse présentée comme exigence partielle de la maîtrise en biologie. Université du Québec à Montréal. P13.
- BENMANSOUR. M, Les Candidoses vulvo-vaginales à Candida albicans : Facteurs de risques, diagnostic mycologique et prévalence spécifique, Pour l'obtention du diplôme de Docteur en Pharmacie, UNIVERSITE ABOU BEKR BELKAÏD FACULTE DE MEDECINE, Tlemcen 2012
- Bébéar C, Bébéar CM. Chapitre 39 - Mycoplasmes. In: Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen É, Quentin R, éditeurs. Bactériologie Médicale (2e édition largement revue et actualisée) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2011 [cité 26 nov 2015]. p. 537-44.
- Belin N, Bontemps F. Les infections urinaires. Le moniteur des pharmaciens. 2012;1-16.
- Bergogne-Berezin E. Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic et thérapeutique. Antibiotiques. 2007;9:139-44.
- BERREBI A., AYOUBI J.M. (1999). Le déséquilibre de la flore vaginale. Genesis, n° 44, P 1 - 4
- BOHBOT J. M. (1996). Acquisitions récentes sur la physiopathologie des candidoses vulvovaginales. Gyn. Obs. n°3 54, P 25-28.
- BOHBOT J. M. (2007). Extrait des mises à jour en Gynécologie Médicale, CNGOF, P 145
- BOUBLI L. (1998). Approche clinique des mycoses vulvo-vaginales. Gynécologie internationale, Hors-série, P 4-5.
- BOHBOT J.M., CATALAN .F (1991). Candidoses urérogénitales ; MST Abrégés Masson., 2ème édition.
- Boudouhi R., Ferreira C., Morel E., Szymanski A., Tizaoui S. Aliments fonctionnels : «réalité et/ou allégation ». Lille : Université Lille 1 Sciences et Technologies, 2005. 202 p.
- Bohbot J-M, Lepargneur J-P. La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations. Gynécologie Obstétrique Fertil. 2012;40(1):31-6.
- Bouchefra A. Yaourts probiotiques algériens et ferments commerciaux utilisés dans leur fabrication : contrôle de qualité et de l'étiquetage.[Thèse]. Biotechnologie Alimentaire.

Institut de la Nutrition, de l'Alimentation et des Technologies Agro- Alimentaires (INATAA).2012.135p

- Bohbot JM, Lepargneur JP. La vaginose bactérienne en 2011 : encore beaucoup d'interrogations. *Gynécobstétrique et Fertilité*. 2012;40:316.

C

- CALDERONE RA AND FONZI WA. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*, *Trends in Microbiologie*, volume 9, P 327-33 5
- Canler J-P., 2005. Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration : Origines etsolutions. *Groupe Gis-Biostep. Doc & Tech. FNDAE n°33 : pp 100-104*.

D

- Denis F, Ploy M-C, Martin C, Bingen É, Quentin R, éditeurs. Chapitre 34 - Bacilles à Gram négatif aérobies et aéro-anaérobies. In: *Bactériologie Médicale (2e édition largement revue et actualisée) [Internet]*. Paris: Elsevier Masson; 2011
- Diagnostic et antibiothérapie des infections urinaires bactériennes communautaires chez l'adulte. *Médecine Mal Infect*. 2008;38, Supplement 3:S203-52
- DIDDLE A.W. (1969). Oral contraceptive medication and vulvovaginalcandidiasis. *Obstet. Gyn.*, P 373 - 377.
- Draï J, Bessedé T, Patard J-J. Prise en charge des pyélonéphrites aiguës. *Prog En Urol*. 2012;22(14):871-5
- De Man J.D, Rogosa M, & Sharpe M.E., 1960. Amedium for the cultivation of *Lactobacilli*.
- Doumandji A, Hellal A & Saidi N. (2010). Purification de la bactériocine à partir de
- Drider, D., Fimland, G., Héchard, Y., Mc Mullen, L.M., Prevost, H., 2006. The continuing story of class IIa bacteriocin. *Microbiology; Molecular & Biology Review*. 70 (2): pp 564-582.
- Drouault S&Corthier G. (2001).Effets des bacteries lactiques ingérées avec des Lait fermenté sur la santé. *Vet. Res*. 32 (2001) 101-117.

E

- EUZEBY J. (1994). Mycologie médicale comparée. Edition Mérieux, Fondation manuel, Tome II, P 88-25 1.
- EZZARIGA N, 2015 ; probiotique : applications thérapeutiques et effets secondaires thèse doctorat

F

- FART A. (1995). Vulvo-vaginite et grossesse. Encyclopédie médicale chirurgicale, P 1 - 8.
- F. CATALAN, A. MILOVANOVIC, Marie MINZ, Marie Françoise, (2000).Vaginites et vaginoses, Cahier bioforma N° 19, P 55-66

G

- Gordon JI, Klaenhammer TR. A rendez vous withour microbes. Proc NatlAcadSci U S A. 2011;108(Suppl 1):4513-5.
- Gorodeski GI, Hopfer U, Liu CC, Margles E. Estrogen Acidifies Vaginal pH by Up-Regulation of Proton Secretion via the Apical Membrane of Vaginal-EctocervicalEpithelialCells. Endocrinology. 2005;146(2):816-24.
- Gompel A, Moraillon M. Leucorrhées. In: Du symptôme à la prescription en médecine générale [Internet]. Elsevier; 2009 [cité 25 nov 2015]. p. 508-11.
- Guarner F, Aamir G. Khan ,Aamir G. Khan . Recommandation pratique : Probiotiques et Prébiotiques .Organisation mondiale de gastroentérologie 2008.
- GUIGNARD J.L., BOUCHET P., MADULO G., REGLI. P (1989). Mycologie générale et médicale. Abrégé Masson, P 107-120.

J

- Johnson J. L., Phelps C. F., Cummins C. S., London J et Gasser F., 1980. Taxonomy of *Lactobacillus acidophilus* group, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: pp. 53-68.

K

- Klemmer PJ, Mattern WD. 135 - Infection du tractus urinaire. In: Runge MS, Greganti MA, éditeurs. Médecine interne de Netter (Second edition) [Internet]. Paris: Elsevier Masson; 2011 [cité 13 mars 2014]. p. 1036-43.
- KOENIG H. (1995). Guide de mycologie médicale. Edition Ellipses, P 20-21, P 46-49, P 252-268
- Kihal M., 1996. Etude de la production du dioxyde de carbone par *Leuconostoc mesenteroides*, élément d'application en technologie fromagère type fromage bleu. *Thèse de Doctorat d'état. université d'Es-Senia (Oran)*.
- *kibyer*

L

- Lepargneur J.P., Rousseau V., « rôle protecteur de la flore de Doderlein » *Journal de gynécologie obstétrique et biologie de la reproduction* 2002 ; 31 : 485-494. In.
- Lecomte F. Les infections urinaires de la femme. John LibbeyEurotext; 1999. 198 p.
- Livengood CH. Bacterial Vaginosis: An Overview for 2009. *Rev Obstet Gynecol.* 2009;2(1):28-37.
- Lepargneur JP, Rousseau V. Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reprod.* 2002;31:485-94.
- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachoui M. et Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de bactéries lactiques antibactériennes. *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux.* 144 : 237-250.

- Labioui H., Elmoualdi L., El Yachioui M. et Ouhssine M., 2005. Sélection de souches de *Lactobacillus acidophilus* 11 . *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn .*,**4(2)**, 25-47
- Liliana M, Pascuala, Maria B. D, Ruiz F, Walter G, Pajaro C & Lucila B. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* L60, a probiotic isolated from the human vagina. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 54, 141-148.S

M

- Machado A, Salgueiro D, Harwich M, Jefferson KK, Cerca N. Quantitative analysis of initial adhesion of bacterial vaginosis-associated anaerobes to ME-180 cells. *Anaerobe*. 2013;23:1-4.
- MALLIE M , LABORATOIRE JANSSEN - CILAG (BASTIDE J.M.). (1998). Les candidoses vaginales : aspects physiopathologiques, P 1 - 8.
- Mobarez A.M. , Hossien Doust R., Sttari M & N Manthegi, (2008). Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *J Biological sci.* 8 (1) : (221-224)

N

- Ninane V., Mukandayambaje R., Berben G. Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir . *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*. 2009. Vol. 13, n°3, p. 8.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 1991;29(2):297-301
- NIVOLIEZ, A(2014) ; utilisation de thiosulfate pour potentialiser l'effet anti-pathogène des *Lactobacillus*, brevets

O

- O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. Landay A, éditeur. PLoS ONE. 2013;8(11):e80074.
- O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. BMC Infect Dis. 2011;11(1):200.
- Oduyebo OO, Anorlu RI, Ogunsoola FT . The effects of antimicrobial therapy on bacterial vaginosis in non-pregnant women. Cochrane Database Syst Rev. 2009 Jul 8;(3):CD006055. Review.
- Othman, M., Neilson, J. P., and Alfirevic, Z. Probiotics for preventing preterm labour. Cochrane Database Syst Rev. 2007;(1):CD005941.

P

- Prélèvements génitaux [Internet]. [cité 20 nov 2015].
- PHILLIP H, MCKEE, ANTHONY DU VIVIER. (1996). Atlas de dermatologie clinique, De Boeck université, 2ème édition, 242
- PATRICIA FENER, CLAIRE CRITON. (2007). Manifestations cliniques et biologiques de l'infection à VIH; sida chez la femme, 34
- P. BERNARD. (2005). Les infections génitales, Corpus Médical, P 24

R

- Rampersaud R, Randis TM, Ratner AJ. Microbiota of the upper and lower genital tract. Semin Fetal Neonatal Med. 2012;17(1):51-7.
- READ B.D. (1992). Risks factors for Candida vulvovaginitis. Obst. and gynecol. Survey. Vol 47, P 55 1-560.

- Rousseau V. Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. [Thèse] Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. 2004. Toulouse .186p
- Rowland I. Chapman CMC, Gibson GR, Effects of single- and multi-strainprobiotics on biofilm formation and in vitro adhesion to bladdercells by urinary tract pathogens. Anaerobe [Internet]. [cité 13 mars 2014]

S

- Sacoun E. Infection urinaire de la femme enceinte. Option/Bio. 2010;21(434):12.
- SENET J.M, ROBERT R. (1995). Physiopathologie des candidoses. Jour. Mycol. Méd.Vol 5, P 145-166.
- Spear GT, French AL, Gilbert D, Zariffard MR, Mirmonsef P, Sullivan TH, et al. Human α -amylase Present in Lower-Genital-Tract MucosalFluidProcessesGlycogen to Support Vaginal Colonization by Lactobacillus. J Infect Dis. 2014;210(7):1019-28.
- Spear GT, McKenna M, Landay AL, Makinde H, Hamaker B, French AL, et al. Effect of pH on Cleavage of Glycogen by Vaginal Enzymes. Zhong G, éditeur. PLOS ONE. 2015;10(7):e0132646.

T

- Thompson J K, Collins M A & Mercer W D. (1996). Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helveticus* CNRZ 450. J. Appl. Bacteriol., **80**, 338-348.

V

- Ventolini G. Vaginal Lactobacillus: biofilm formation in vivo – clinical implications. Int J WomensHealth. 2015;243

Z

- Zhou X, Brotman RM, Gajer P, et al. RecentAdvances in Understanding the Microbiology of the Female Reproductive Tract and the Causes of PrematureBirth, RecentAdvances in Understanding the Microbiology of the Female Reproductive Tract and the Causes of PrematureBirth. Infect Dis ObstetGynecol Infect Dis ObstetGynecol. 9 déc 2010;2010, 2010:e737425.