



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

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



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

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة والحياة

Département : Microbiologie

قسم : الميكروبيولوجيا

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes*

Intitulé :

Diagnostic microbiologique des infections sexuellement transmissibles. Etude prospective de trois mois

Présenté et soutenu par : *AOUAG Ahlem*

Le : 22/06/2016

GHERAF Madjda

Jury d'évaluation :

Président du jury : *AITKAKI Zahia* (Pr – Univ 3 Constantine).

Rapporteur : *OULMI Lamia* (MCB - UFM Constantine).

Examineurs : *BOUZERAIB Latifa* (MAA – UFM Constantine).

*Année universitaire
2015 - 2016*

Table des matières

Remerciements	
Listes des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Résumé	
Introduction.....	1
RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE	
1°/ Les maladies sexuellement transmissibles.....	2
1-1 Définition	2
1-2 Terminologie.....	2
1-3 Rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil génital	2
1-3-1 L'appareil génital féminin.....	2
1-3-2 L'appareil génital masculin	3
1-4 Les populations touchées par les infections sexuellement transmissibles	4
2°/ Classification des infections sexuellement transmissibles.....	4
3°/ Les infections sexuellement transmissibles les plus courantes dans l'Afrique	4
4°/ Diagnostic microbiologique des IST.....	5
4-1 <i>Chlamydia trachomatis</i>	5
4-2 <i>Mycoplasme</i>	5
4 -3 <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5
4-4 <i>Treponema pallidum</i>	6
4-5 <i>Haemophilus ducreyi</i>	6

4-6 <i>Papillomavirus humains (PVH)</i>	7
4-7 Virus de l'herpès simplex (HSV-2)	7
4-8 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	7
4-9 <i>Trichomonas vaginalis</i>	8
4-10 <i>Candida albicans</i>	8
5°/ Traitement des infections sexuellement transmissibles	8
6°/ Prévention des infections sexuellement transmissibles	9

MATERIEL ET METHODE

1°/ Isolement des agents causals des infections sexuellement transmissibles	10
1-1 Les prélèvements	10
1-1-1 Le prélèvement vaginal	10
1-1-2 Les prélèvements au niveau de l'endocol	10
1-1-3 sperme	10
2°/ Examen cyto bactériologique et parasitologie	10
2-1 Examen microscopique	11
2-1-1 Examen à l'état frais de prélèvement vaginal	11
2-1-2 Examen après coloration du sperme	11
2-2 La culture	11
3°/ Recherches particulières	11
3-1. Recherche de Mycoplasme	12
3-1. a) Echantillons	12
3-1. b) Procédure	12
3-2. Recherche de <i>Chlamydia trachomatis</i> par immunofluorescence directe	13
3-2-1. Principe	13
3-2-2. Procédure	13

Résultats et discussion

1. Répartition des échantillons selon les paramètres épidémiologiques	15
1.1 Répartition des échantillons en fonction de l'âge des patients	15
1.2 Répartition des échantillons en fonction des services	15
1.3 Répartition des échantillons en fonction des cas positifs et négatifs	16

1.4 Répartition des échantillons en fonction du sexe	17
2. Résultats de l'examen cyto bactériologique et parasitologique.....	18
3. Répartition des germes isolés selon le sexe.....	19
4. Répartition des microorganismes isolés selon leurs types tinctoriaux.....	21
CONCLUSION.....	22
Références bibliographiques.....	23

Annexes

Liste des abréviations

AC : anticorps.

AG : antigène.

CHU : centre hospitalo-universitaire.

ELISA : enzyme linked immuno sorbent assay.

IST : Infections sexuellement transmissibles.

LGV : lymphogranulomatose vénérienne.

MST : maladies sexuellement transmissibles.

OMS : organisation mondiale de santé.

pH : potentiel hydrogène.

PV : prélèvement vaginal.

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise.

TA : traitement ambulatoire.

VHS : virus de l'herpès.

VIH : Le virus de l'immunodéficience humaine.

VPH : papillomavirus humains.

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant l'appareil génital féminin.

Figure2 : Schéma représentant l'appareil génital masculin.

Figure3 : Le Kit Mycoplasma Duo.

Figure4 : Représentation en histogramme de l'âge des patients.

Figure 5 : Représentation en histogramme de la répartition des échantillons négatifs, positifs et contaminés.

Figure 6 : Représentation en histogramme de la répartition des cas positifs et négatifs selon le sexe.

Figure 7 : Représentation en histogramme de la répartition des isolats en fonction du type de microorganismes

Liste des tableaux

Tableau 1 : Répartition des échantillons biologiques selon les structures d'envoi.

Tableau 2 : Répartition des échantillons positifs et négatifs. (Résultats des examens microscopiques des échantillons biologique).

Tableau 3 : Répartition des cas positifs et négatifs selon le sexe.

Tableau 4 : répartition des germes isolés selon le sexe.

Tableau 5 : répartition des isolats selon leur type tinctorial.

Résumé :

Les infections sexuellement transmissibles représentent un problème de santé publique en raison de leur fréquence élevée dans le monde.

L'objectif de notre étude est le diagnostic microbiologique des infections sexuellement transmissibles par des méthodes classiques de microbiologie qui passe par plusieurs étapes : examens directs, isolements et identification, afin d'analyser le profil microbiologique de ces infections

Durant la période d'étude (1^{er} février jusqu'à 30 avril de l'année 2016), nous avons reçu un total de 180 échantillons, au niveau de l'unité (MST) maladies sexuellement transmissibles, laboratoire de Bactériologie, CHU BenBadis Constantine. 40 germes ont été isolés de divers prélèvements (65 % prélèvements vaginaux, 35 % prélèvements sperme). Les germes isolés à partir des échantillons vaginaux sont : des levures avec un pourcentage de 50 %, suivi d'*E. coli* et *Mycoplasma spp.* Avec 14,8 %, et de *Streptococcus spp* avec 8,8 %, puis *klebsiella pneumonie* avec 5,8 %, enfin *Klebsiella oxytoca* et *Enterococcus spp* avec un faible pourcentage de 2,9 %. Les germes isolés du sperme sont : *Neisseria gonorrhoeae* en première position avec un pourcentage de 50 %, suivi de *Streptococcus spp* à 33,3 %, et enfin *Enterococcus spp* à 16,7 %.

En conclusion, la connaissance de la nature, la fréquence et la sensibilité des germes responsables de ces infections permet d'améliorer la prise en charge et la prévention demeure le meilleur moyen de lutte contre ces infections.

Mots clés : IST, diagnostic microbiologique, *Chlamydia trachomatis*, mycoplasme, *Trichomonas vaginalis*, prélèvements vaginaux, sperme.

Abstract

Sexually transmitted infections are a public health problem due to their high frequency in the world.

The objective of our study was the microbiological diagnosis of sexually transmitted infections by conventional microbiology methods involves several stages: direct examinations, isolation and identification, to analyze the microbiological profile of these infections

During the study period (1 February to 30 April 2016), we received a total of 180 samples at the unit level (STD) sexually transmitted diseases, Bacteriology Laboratory, CHU Constantine Benbadis. 40 germs were isolated from various samples (65% vaginal, 35% sperm). The germs isolated from vaginal samples are: yeast with a percentage of 50%, followed by *E. coli* and *Mycoplasma spp* with 14.8%, and *Streptococcus spp* with 8.8% and 5.8% with *klebseilla pneumonia* finally *Klebseilla oxytoca* and *Enterococcus spp* with a low percentage of 2.9%. The germs isolated from sperm are: *Neisseria gonorrhoeae* in first position with a percentage of 50%, followed by *Streptococcus spp* 33.3%, and finally *Enterococcus spp* with 16.7%.

Finally, knowledge of the nature, frequency and sensitivity of germs that cause these infections can improve care and prevention remains the best way to fight against these infections.

Key words: STI, microbiological diagnosis, *chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma*, *Trichomonas vaginalis*, vaginal samples, sperm.

ملخص:

تعتبر الأمراض التي تنتقل عن طريق الجنس مشكلة صحية عامة بسبب ارتفاع وتيرتها في العالم. الهدف من دراستنا هو التشخيص الميكروبيولوجي للأمراض التي تنتقل عن طريق الاتصال الجنسي وذلك باستعمال الأساليب التقليدية للمكروبيولوجيا على عدة مراحل: المعاينة المباشرة، والعزلة، وتحديد الخصائص الميكروبيولوجية لهذه الأمراض

خلال فترة الدراسة الممتدة من 1 فيفري الى غاية 30 أبريل عام 2016، تلقينا مجموع 180 عينة على مستوى وحدة (MST) الأمراض التي تنتقل عن طريق الجنس، مختبر علم البكتيريا بالمستشفى الجامعي ابن باديس قسنطينة. تم عزل 40 جرثومة من مختلف العينات (65٪ افرازات المهبلية، 35٪ السائل المنوي). الجراثيم المعزولة من عينات الافرازات المهبلية هي: الخميرة مع نسبة 50 ٪، تليها *E. coli* و *Mycoplasma spp* مع 14.8 ٪، ثم *Streptococcus spp* بنسبة 8.8 ٪ *klebsiella pneumonie* بنسبة 5.8 ٪ تأتي في المرتبة الاخيرة *Klebsiella oxytoca* و *Enterococcus spp* بنسبة 2.9 ٪ لكل منهما. الجراثيم التي تم عزلها من السائل المنوي هي: *Neisseria gonorrhoeae* في المركز الأول بنسبة 50 ٪، تليها *Streptococcus spp* بنسبة 33.3 ٪، وأخيرا *Enterococcus spp* بنسبة 16.7 ٪.

في الأخير، يمكن القول ان معرفة طبيعة، وتيرة وحساسية الجراثيم التي تسبب هذه العدوى يسمح بتحسين الرعاية وتظل الوقاية أفضل طريقة لمحاربة هذه الافة.

الكلمات المفتاحية:

العدوى المنتقلة عن طريق الجنس، التشخيص الميكروبيولوجي، الافرازات المهبلية، السائل المنوي

De nombreuses maladies humaines sont dues à l'action d'agents pathogènes microscopiques qui se développent au sein d'un tissu ou d'un organe. Ces germes sont d'origine bactérienne, virale, mycosique ou protozoaires qui causent des infections ou maladies infectieuses.

Parmi ces infections, les infections sexuellement transmissibles représentent un problème de santé publique en raison de leur fréquence élevée dans le monde ainsi qu'en raison des complications et des séquelles qu'elles entraînent : stérilité, grossesse extra-utérine, cancer du col de l'utérus, infections congénitales.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2015) chaque jour, plus d'un million de personnes contractent des infections sexuellement transmissibles (IST). L'organisation estime que, chaque année, 357 millions de personnes contractent l'une des quatre IST suivantes : chlamydie (131 millions), gonorrhée (78 millions), syphilis (5,6 millions) et trichomonase (143 millions). Elle estime également que plus de 500 millions de personnes vivent avec une infection par le virus de l'herpès simplex (HSV) et plus de 290 millions de femmes ont une infection à Papillomavirus humains (VPH), l'une des IST les plus courantes.

Le présent travail est le résultat d'une étude prospective de trois mois (01 février au 30 avril 2016) menée au laboratoire de bactériologie du Centre Hospitalo-universitaire Benbadis Constantine, unité des maladies sexuellement transmissible.

Nos objectifs furent de :

Déterminer les étiologies des infections sexuellement transmissibles dans les produits pathologiques réceptionnés au niveau de l'unité des infections sexuellement transmissible.

Réaliser une étude épidémiologique descriptive afin de décrire la fréquence et la répartition de ce type d'infection durant cette période.

1°/ Les maladies sexuellement transmissibles

1-1 Définition

Une maladie sexuellement transmissible est une infection qui se transmet entre partenaires au cours de différentes formes de rapports sexuels, quel que soit leur mode : génital, uro-génital, ano-génital (Kamalebo L. ; 2013). Ces infections sont causées par des virus, des bactéries, des champignons microscopiques ou des protozoaires.

1-2 Terminologie

Dans les années 1990, l'appellation MST (pour maladies sexuellement transmissibles) était d'usage courant. Depuis 1999, le terme MST est peu à peu remplacé par celui d'infections sexuellement transmissibles (IST) car le terme infection plutôt que maladie prend mieux en compte le fait que certaines sont asymptomatiques (E.pilly 2002)

1-3 Rappels anatomiques et physiologiques de l'appareil génital

Les infections sexuellement transmissibles se transmettent plus facilement à la femme qu'à l'homme du fait des particularités anatomiques et physiologiques de l'appareil génital féminin. Dans certains cas, chez la femme, elles sont peu symptomatiques, voire asymptomatiques, et ont tendance à se manifester à un stade tardif.

1-3-1 L'appareil génital féminin

L'appareil génital féminin est totalement distinct de l'appareil urinaire (figure1). Il comprend deux parties :

la partie supérieure qui constitue le site stérile, est représenté par : les ovaires et les trompes de Fallope, la cavité utérine et l'endocol,

et la partie inférieure de l'appareil, contaminé par une flore microbienne abondante et variée comprend : l'exocol, le vagin et la vulve.

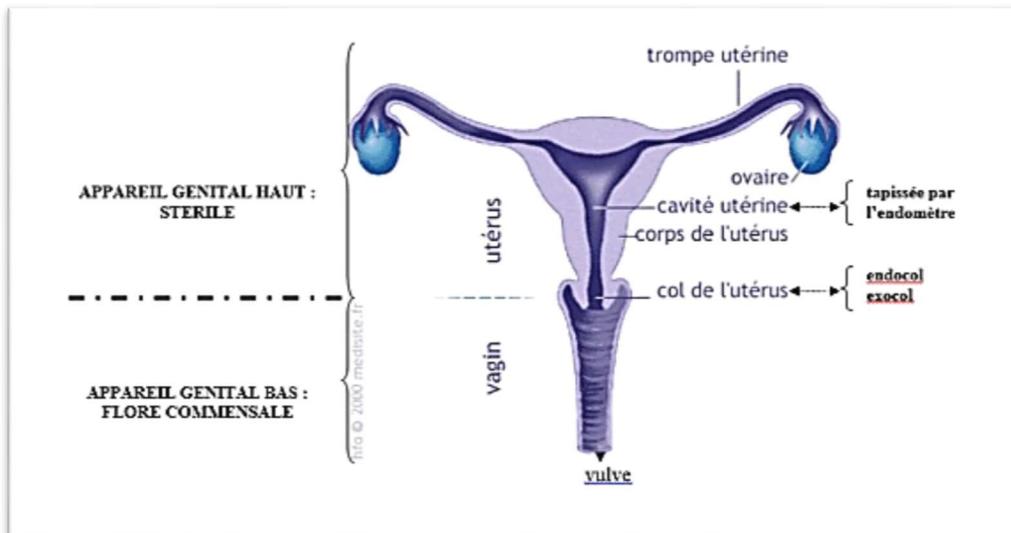


Figure 1 : schéma représentant l'appareil génital féminin.

1-3-2 L'appareil génital masculin

L'appareil génital masculin se confond avec la partie inférieure de l'appareil urinaire (figure2). En effet l'urètre de l'homme est long, comprenant une portion antérieure ou distale qui traverse le corps spongieux et une portion postérieure ou proximale.

Les sécrétions prostatiques et le liquide séminal se déversent dans le canal urétral. Alors que les vésicules séminales, le canal déférent, l'épididyme et les testicules sont stériles. La flore génitale se localise au niveau du gland et de l'urètre distal. Il s'agit d'une flore commensale poly microbienne voisine des flores entérique et cutanée (Rahal K. *et al.* ; 2001).

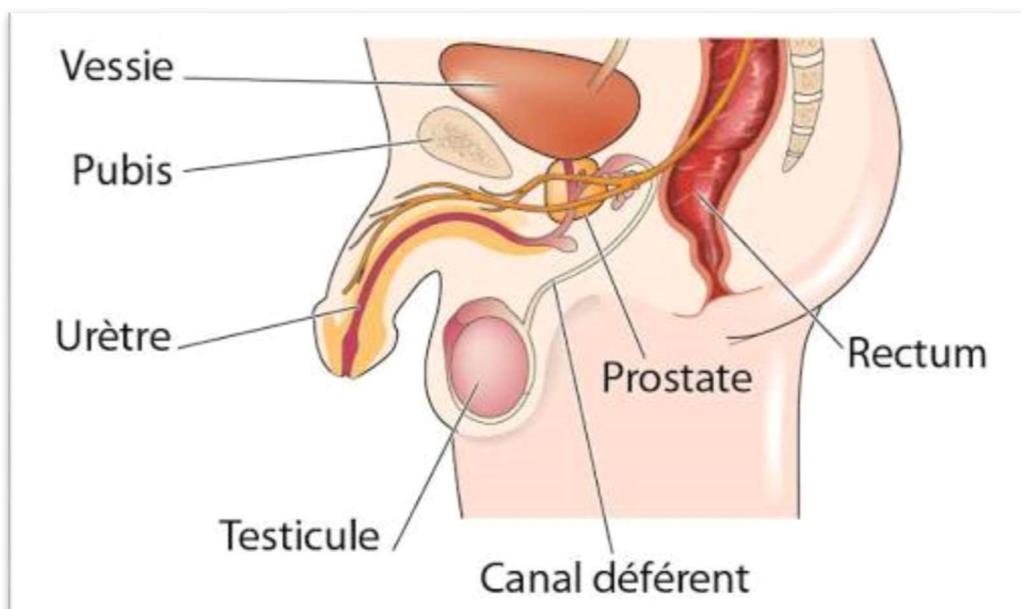


Figure2 : schéma représentant l'appareil génital masculin.

1-4 Les populations touchées par les infections sexuellement transmissibles

Dans la plupart des pays, certains groupes de personnes sont plus exposés que d'autres. De tels groupes se composent d'adolescents sexuellement actifs, de professionnels du sexe et leurs partenaires et des hommes et des femmes ayant des partenaires multiples.

2°/ Classification des infections sexuellement transmissibles

On peut classer les infections sexuellement transmissibles de deux façons :

- soit en se référant à leur agent causal, ainsi nous pouvons avoir :
 - ✓ des IST causées par des bactéries,
 - ✓ des IST causées par des virus,
 - ✓ des IST causées par des protozoaires,
 - ✓ des IST causées par des champignons,
 - ✓ des IST causées par des ectoparasites,
- soit en se référant à leurs manifestations cliniques (symptômes), ainsi nous pouvons avoir :
 - ✓ des IST à écoulement (apparition d'un écoulement anormal au niveau génital).
 - ✓ des IST à ulcération (existence de boutons et/ ou de plaies au niveau de l'appareil génital).

3°/ Les infections sexuellement transmissibles les plus courantes en Afrique

En Afrique nous trouvons essentiellement :

Les IST à écoulement :

- ✓ Chlamydie (*Chlamydia trachomatis*).
- ✓ Gonococcie (*Neisseria gonorrhoeae*).
- ✓ Trichomonase (*Trichomonas vaginalis*).

Les IST à ulcération :

- ✓ Chancre mou (*Haemophilus ducreyi*).
- ✓ Herpès génital (Herpes simplex (VHS)).

- ✓ Syphilis (*Treponema pallidum*).
- ✓ Condylomes (Human Papilloma Virus).

4°/ Diagnostic microbiologique des IST

4-1 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis est une bactérie pathogène strictement humaine, parasite intracellulaire obligatoire à transmission humaine, non colorable par la coloration de Gram. *C. trachomatis* est une petite bactérie arrondie de 0.3 μ de diamètre, possède des antigènes spécifiques, elle est plus répandue sous les climats tropicaux. Elle cause la lymphogranulomatose vénérienne ou chlamydie qui est une maladie sexuellement transmissible. Il y a deux autres espèces qui sont : *Chlamydia pneumoniae* responsable d'infections respiratoires chez l'homme et *Chlamydia psittaci* l'agent de chlamydie aviaire (Loup J. et al. ; 1992) .

Le Diagnostic du chlamydie repose sur l'examen microscopique des cellules lésionnelles prélevées par grattage au niveau vaginal. Cet examen est réalisé soit après coloration de Giemsa par inclusions. Seulement cette méthode est peu sensible pour les formes génitales soit par immunofluorescence avec anticorps monoclonaux qui met en évidence les corps élémentaires.

4-2 *Mycoplasme*

Les mycoplasmes *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* sont des bactéries dépourvus de paroi non colorable par le Gram à faible pourcentage en guanine plus cytosine et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi d'où un aspect polymorphe coccoides ou filamenteux et une insensibilité totale aux bêta-lactamines. Les mycoplasmes ont une petite taille de 300-850 nm, les mycoplasmes sont des microorganismes parasites fréquents des voies génitales

Le diagnostic de mycoplasme dépend largement de la reconnaissance des syndromes cliniques, par ce que les mycoplasmes ne sont habituellement pas mis en culture par les microbiologistes, un prélèvement urétral sperme ou vaginal est réalisé, sur milieu liquide approprié.

4 -3 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae est un parasite strict de l'espèce humaine. Les gonocoques sont des Cocci réniformes à coloration de Gram négative, aérobie stricte, habituellement groupés en diplocoques. Ils apparaissent classiquement en amas plus ou moins importants

à l'intérieur de polynucléaires altérés. *N.gonorrhoeae* est une bactérie fragile et sensible aux variations de température.

Le gonocoque est l'agent d'une des maladies vénériennes ou maladies sexuellement transmissibles les plus répandues, la blennorragie ou gonococcie.

Pour le diagnostic de la gonococcie, les prélèvements doivent être faits au laboratoire, le matin avant émission d'urine ou toilette génito-urinaire. On prélèvera le pus et les sécrétions à partir de l'urètre ou le col, comme on peut prélever le sang. L'examen microscopique, après coloration de Gram qui révèle la présence de nombreux diplocoques à Gram négatif.

4-4 *Treponema pallidum*

Treponema pallidum est une bactérie pathogène et l'agent de la syphilis. Il a de 5 à 15 microns de long sur 0,2 micron de large. Ses spires sont régulièrement espacées les unes des autres de 1 micron. Sa mobilité est caractéristique : rotation et flexion sinusoïdales. *Treponema pallidum* ne se colore pas bien par coloration de Gram.

Les prélèvements à faire, pour le diagnostic de la syphilis, sont des frottis, de la sérosité dermique du chancre et des lésions secondaires, provoquées par grattage des lésions avec un vaccinostyle pour recherche microscopique du germe, et des prélèvements de sang pour recherche des anticorps (sérodiagnostic).

La recherche du tréponème se fait soit par examen au microscope à fond noir, soit par immunofluorescence.

Pour le diagnostic sérologique de la syphilis on emploie des antigènes non tréponémiques et des antigènes tréponémiques.

4-5 *Haemophilus ducreyi*

Haemophilus ducreyi est un bacille pléomorphe à coloration de Gram négative, aérobies-anaérobies facultatifs, immobiles, non sporulés, qui exigent pour leur croissance un ou deux facteurs présents dans le sang et dans les tissus animaux. *H.ducreyi* est l'agent du chancre mou ou d'ulcère génital.

Le diagnostic du chancre mou est réalisé à partir des prélèvements consistant en pus, sang et liquide céphalo-rachidien.

L'examen microscopique est souvent très évocateur. Les bacilles peuvent être identifiés directement sur le frottis par immunofluorescence.

La culture se fait sur gélose chocolat et l'identification ultérieure des colonies, par l'exigence en facteurs X et V, et par la mise en évidence de l'antigène capsulaire. Elle sera

toujours complétée par une recherche de la sensibilité aux antibiotiques, notamment à l'ampicilline (existence ou non d'une bêta-lactamase) et au chloramphénicol.

4-6 Papillomavirus humains(PVH)

Le (Papillomavirus humains) c'est un virus contenant de l'ADN bicaténaire, d'environ 7900 paires de bases, appartenant à la famille des *Papillomaviridae*, infectant les kératinocytes. Il en existe plus de 100 types dont seuls certains sont oncogènes (col utérin, carcinome anal). Les papillomavirus humains est l'agent des infections sexuellement transmissibles qui sont les condylomes et certains cancers muqueux (anus, utérus) (Prescott *et al.* ; 2010).

Le diagnostic de papillomavirus humain est réalisé sur des prélèvements sanguins :

La détection d'antigènes sérotypes les plus courants de HPV se fait par la technique Immuno-enzymatique à l'aide d'anticorps monoclonaux marqués respectivement à l'isothiocyanate de fluorescence et à la PAL ou à la peroxydase de Raifort (Rahal K. *et al.* ; 2001).

4-7 Virus de l'herpès simplex (HSV-2)

Le virus *Herpès simplex* de type 2 (HSV-2) fait partie de la famille des *Herpesviridae* qui ont un cycle réplcatif très court, l'ADN double brin est linéaire (Prescott *et al.* ; 2010)

Il existe deux catégories de tests permettant de diagnostiquer les infections au VHS : les tests d'identification virale et les tests sérologiques par la détection d'antigène de VHS.

4-8 Le virus de l'immunodéficience humaine(VIH)

Le virus de l'immunodéficience humaine, est le virus responsable de la maladie SIDA (Syndrome d'Immuno Déficience Acquise). Ce virus attaque le système de défense de l'organisme (le système immunitaire) qui protège le corps contre les microbes, le VIH est un rétrovirus à ARN simple brin, qui possède trois gènes (*Gag, Pol, Env*). (Prescott *et al.* ; 2010)

Le test de dépistage essentiel du SIDA est le test ELISA, méthode immuno-enzymatique, à partir du sang. Ce test utilise différents types d'antigènes.

Le diagnostic biologique d'infection à virus de l'immunodéficience humaine doit être confirmé par un deuxième prélèvement permettant de s'assurer de l'identité du patient et de la réalité de la contamination.

4-9 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis est un protozoaire flagellé, de forme ovoïde, membrane ondulante. Il s'agit de l'agent d'une infection sexuellement transmissibles appelée la trichomonase.

Pour le diagnostic de la trichomonase, un examen microscopique réaliser sur des pertes vaginales chez les femmes infectées.

Chez les hommes infectés, le parasite sera recherché dans le sperme ou l'urine (Prescott et al, 2010).

4-10 *Candida albicans*

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes, se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère, formant ainsi des colonies blanches crémeuses, cette levure peut mesurer de 3 à 15 µm, c'est l'agent pathogène opportuniste qui provoque les candidoses.

Pour diagnostiquer une candidose à partir des prélèvements vaginaux deux types d'examen sont à réalisées un examen macroscopique des cultures où les colonies blanches sont crémeuses et lisses et un examen microscopique qui révèle la présence de cellules ovoïdes eucaryotes de grande taille et bourgeonnante (Cardinale V 2001).

5°/ Traitement des infections sexuellement transmissibles

On dispose actuellement de traitements efficaces pour plusieurs IST.

- On peut généralement guérir trois IST bactériennes (chlamydie, gonorrhée et syphilis) et une IST d'origine parasitaire (trichomonase) à l'aide d'une antibiothérapie à dose unique (doxycycline, minocycline, tetracycline, erythrocin).
- Les médicaments les plus efficaces pour le traitement de l'herpès et de l'infection à VIH sont des antiviraux qui, bien qu'ils ne puissent guérir la maladie, peuvent en moduler l'évolution.

- Les immunomodulateurs (interférons) et les médicaments antiviraux (OMS 2015)

6°/ Prévention des infections sexuellement transmissibles

La prévention de toutes ces infections repose sur :

- L'utilisation correcte du préservatif qui est un moyen simple et efficace pour éviter la contamination et l'infection par les agents infectieux responsables des IST.
- En cas d'infection, prévenir le, la ou les partenaires pour qu'ils se fassent examiner et éventuellement se faire traiter le plus tôt possible. La chaîne de la transmission sera ainsi interrompue.
- Suivre intégralement le traitement prescrit par le médecin.
- En cas de rapports sexuels pendant le traitement, toujours utiliser le préservatif (Kamalebo L. ; 2013).

1°/ Isolement des agents causals des infections sexuellement transmissibles

1-1 Les prélèvements

L'étude a été réalisée entre le 1^{er} février et le 30 avril de l'année 2016, sur des prélèvements génitaux provenant de patients suspectés d'être atteints d'infections sexuellement transmissibles. Elle a porté sur trois types de prélèvements réceptionnés au niveau de l'unité des infections sexuellement transmissibles du laboratoire de Bactériologie du Centre Hospitalo-universitaire Benbadis de Constantine.

1-1-1 Le prélèvement vaginal :

Le prélèvement est pratiqué soit au laboratoire, soit lors d'une consultation gynécologique. Il doit être réalisé en l'absence de tout traitement d'antibiotique ou d'antiseptique, de préférence en dehors des règles et sans avoir procédé à une toilette intime récente.

Le recueil des sécrétions vaginales sur un ou deux écouvillons, les sécrétions sont prélevées au retrait de speculum (paroi vaginal, cul-de-sac vaginal post).

Le prélèvement doit être transporté au laboratoire rapidement (délai inférieur à 4 h) à température ambiante (22 °C).

1-1-2 Les prélèvements au niveau de l'endocol

L'exocol est nettoyé avec un tampon de gaz stérile. Le prélèvement est réalisé au niveau de l'endocol à l'aide d'un écouvillon stérile (voir annexe) celui-ci est immédiatement mis en milieu de transport à une température ambiante (22 °C) pour la recherche de *Chlamydia* et *Mycoplasme*.

1-1-3 Le sperme :

Le prélèvement est réalisé après une abstinence de 3 jours, après une miction et une désinfection du gland. Le prélèvement de sperme est recueilli après masturbation dans un flacon stérile, conservé à 37 °C et envoyé rapidement au laboratoire.

2°/ Examen cytobactériologique et parasitologie :

L'analyse cytobactériologique permet la recherche et l'identification des agents responsables de l'infection sexuellement transmissible : bactéries, parasites (*Trichomonas vaginalis*), champignons microscopiques (*Candida albicans*).

L'analyse consiste à rechercher l'élément pathogène soit par observation directe (examen des échantillons à l'état frais ou après coloration), soit après mise en culture et l'identification des germes après culture.

2-1 Examen microscopique :

2-1-1 Examen à l'état frais de prélèvement vaginal :

Cet examen permet d'apprécier la :

- présence de cellules épithéliales,
- présence de leucocytes,
- présence de levures,
- présence de germes pathogènes dans l'échantillon.

Pour se faire, une goutte du prélèvement vaginal est déposée entre lame et lamelle puis examinée sous microscope optique à l'objectif $\times 40$.

2-1-2 Examen après coloration du sperme :

Consiste à réaliser une coloration simple avec le bleu de méthylène qui permet d'observer les germes pathogènes et les polynucléaires.

- Une goutte du prélèvement de sperme est déposée sur une lame propre, puis étalée la goutte avec l'anse de platine et laissée sécher à l'air libre.
- Le frottis est fixé avec la flamme de bec bunsen.
- La lame est colorée par le bleu de méthylène (voir annexe) pendant 10 à 15 minutes.
- La lame est lavée avec l'eau distillé. Une fois sèche, elle est examinée sous microscope optique à immersion (objectif $\times 100$).

2-2 La culture :

La culture est réalisée sur une des boites de Pétri contenant de la gélose de chocolat.

Les prélèvements (le sperme ou bien le prélèvement vaginal) sont ensemencés en stries serrés et incubés à une température de 37 °C pendant 24 heures.

3°/ Recherches particulières

Certaines recherches ne font pas partie de l'examen cyto bactériologique de sécrétions génitales et feront l'objet pour l'instant d'une prescription motivée complémentaire :

- recherche de Mycoplasme,
- recherche de Chlamydia.

3-1. Recherche de Mycoplasme :

3-1. a) Echantillons :

Les prélèvements génitaux : sécrétion vaginale ou bien sperme.

3-1. b) Procédure :

Pour la culture, l'identification et le titrage différentiel des mycoplasmes, nous avons utilisé le Kit : Mycoplasma Duo Kit selon les recommandations du fournisseur Bio-Rad.

Tout d'abord, Il faut décharger l'écouvillon dans le milieu de suspension (5), puis ensemencement la microplaque (3) comme suit :

- La rangée inférieure de la microplaque (1) :

Avec le flacon compte-gouttes, 4 gouttes (200 μ l) de diluant (6) sont mis dans les 3 cupules de la rangée inférieure de la microplaque : U $\geq 10^4$, D, H $\geq 10^4$, et 1 goutte (25 μ l) suspension contenant le prélèvement dans la cupule D avec une autre micropipette (4), (il est indispensable de changer la micropipette pour effectuer les dilutions). Bien homogénéiser le contenu de la cupule D, puis aspirer cette suspension et verser respectivement 1 goutte dans la cupule U $\geq 10^4$ et 1 goutte dans la cupule H $\geq 10^4$.

- La rangée supérieure de la microplaque (2) :

À l'aide d'une micropipette, le milieu de suspension ensemencé contenant le prélèvement : 4 gouttes (100 μ l) sont mises dans les 3 cupules de la rangée supérieure de la microplaque : U, X, H.

Chaque cupule contient :

- Des substrats déshydratés pour l'identification
- Des facteurs de croissance des mycoplasmes
- Des inhibiteurs de croissance de la flore polymorphe associée.

L'identification et le titrage des mycoplasmes sont basés sur l'utilisation de leurs propriétés métaboliques : hydrolyse de l'urée et hydrolyse de l'arginine avec libération d'ammoniaque et alcalinisation du milieu. La réaction est visualisée par le virage du jaune au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol) : cupule jaune (absence de mycoplasmes) et cupule rouge (présence de mycoplasmes).

Incubation : La microplaque est recouverte d'un film adhésif puis elle est incubée 24 heures à l'étuve à 37°C. Si nécessaire, il faut prolonger cette incubation de 24 heures supplémentaire. La première lecture après 24h est définitive dans le cas des titres forts. La deuxième lecture à 48h permet de confirmer les négatifs, de révéler les titres faibles ou de révéler les souches à titre fort avec un métabolisme lent.



1- la rangée inférieure
2- la rangée supérieure
3- la microplaque
4- la micropipette
5- le milieu de suspension
6- le diluant

Figure 3 : Le Kit Mycoplasma Duo

3-2. Recherche de *Chlamydia trachomatis* par immunofluorescence directe

1. Principe

La détection des antigènes chlamydiens par un anticorps monoclonal spécifique fluorescent dans le sperme et le prélèvement vaginal. La technique est basée sur :

- une ou plusieurs liaisons Ag-Ac
- un réactif spécifique marqué par fluorescéine

2. Procédure

- **Préparation des lames témoins et celles des patients :**

Tout d'abord, nous avons fait sortir une lame témoin du réfrigérateur et la laissée revenir à température ambiante sans la déballer (5 à 10 minutes). En suit, les lames de patients sont retirées de leurs récipients de stockage et la lame témoin de son emballage. Une goutte (environ 30 μ l) est déposée de l'anticorps monoclonal dirigé contre *Chlamydia trachomatis* dans chaque puits des lames témoins et patients. La solution d'anticorps doit recouvrir la totalité du puits (figure 3).

- **Incubation :**

Les lames sont incubées pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. (Il ne faut pas laisser sécher les anticorps sur la lame).

- **Rinçage :**

Les lames sont rincées fortement à l'eau distillée pendant 10 à 15 secondes afin d'éliminer l'excès de réactif. Puis elles sont immergées dans un béccher ou une fiole Coplin remplie d'eau distillée sur la partie de la lame située au-dessus du puits, en laissant l'eau s'écouler sur le puits. (Ne pas projeter d'eau directement dans le puits. Laisser égoutter afin d'éliminer l'excès d'eau).

- **Lecture :**

Une goutte de milieu de montage est déposée dans le puits et recouvert d'une lamelle, en veillant soigneusement à ne pas piéger de bulles d'air.

Les lames sont examinées au microscope à fluorescence à un grossissement de 400 à 500 X et confirmé à un grossissement de 1000 X. Si nécessaire, il faut conserver les lames dans l'obscurité et les examiner dans les 24 heures qui suivent).

NB :

Il faut d'abord examiner les lames témoins. Si la réactivité des témoins est conforme, examiner les lames patientes. Répéter le test si les témoins ne réagissent pas correctement.

Les échantillons de patients suspectés d'être atteints d'infections sexuellement transmissibles sont récupérés au niveau de l'unité des maladies sexuellement transmissibles du laboratoire de Bactériologie du Centre-Hospitalo-Universitaire Benbadis Constantine. Notre travail a porté sur un total de 180 échantillons recueillis durant les trois mois de notre stage (1^{er} Février jusqu'au 30 Avril 2016).

I. Répartition des échantillons selon les paramètres épidémiologiques

I.1 Répartition des échantillons en fonction de l'âge des patients

Pour le sexe féminin, nous avons reçu des échantillons de patientes âgées de 6 ans à 50 ans, avec une moyenne d'âge de 31 ans.

Pour le sexe masculin, nous avons reçu des échantillons de patients âgés de 17 ans à 62 ans, avec une moyenne d'âge de 39 ans.

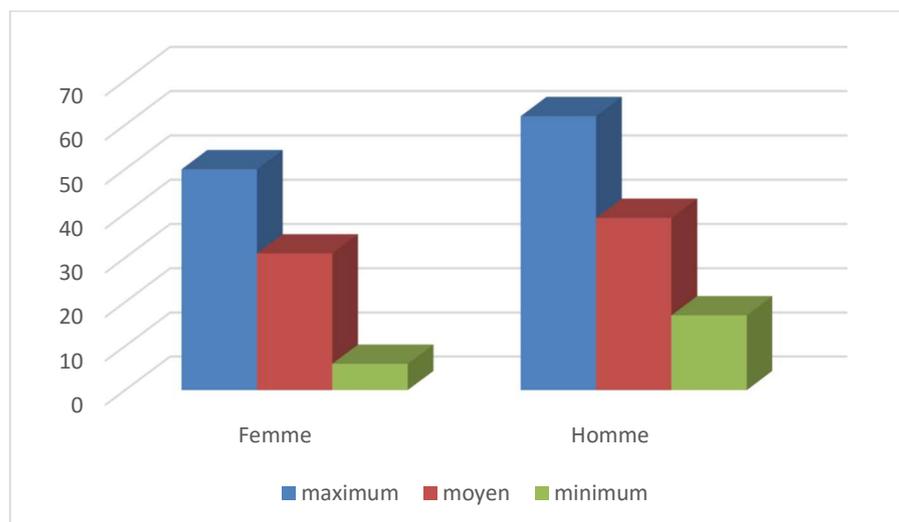


Figure4 : Représentation en histogramme de l'âge des patients.

I.2 Répartition des échantillons en fonction des services

Les échantillons biologiques proviennent de patient hospitalisés au niveau de cinq différents services du CHU Benbadis Constantine (services : épidémiologie, maladies infectieuses, physiologie, endocrinologie et orthopédie) et de patients non résident au CHU (traitement ambulatoire). Le tableau numéro 1 illustre la répartition des 180 échantillons reçu au niveau de l'unité selon la structure d'envoi.

Tableau1 : répartition des échantillons biologiques selon les structures d'envoi.

Service	Nombre d'échantillons	PV	Sperme	Pourcentage
Epidémiologie	91	47	44	50,5 %
Traitement ambulatoire (TA)	68	58	10	37,7 %
Maladies infectieuses	14	5	9	7,7 %
Physiologie	3	3	0	1,6 %
Endocrinologie	3	3	0	1,6 %
Orthopédie	1	1	0	0,5 %
Total	180	117	63	100 %

PV : prélèvement vaginal

Le plus grand nombre d'échantillons (91 échantillons) a été envoyé du service d'épidémiologie avec un taux de 50,5 %, puis en deuxième position 68 échantillons sont reçues des patients non résident au CHU (TA) avec un taux de 37,7 %, suivi par 14 échantillons qui ont été envoyé du service des maladies infectieuses avec un taux de 7,7 % et 3 échantillons ont été envoyé du service de physiologie et d'endocrinologie avec un taux de 1,6 %. Seulement un seul échantillon a été envoyé du service d'orthopédie avec un taux très faible de 0,5 %.

I.3 Répartition des échantillons en fonction des cas positifs et négatifs

Un échantillon négatif se définit par l'absence totale de germe pathogène, de leucocytes, de polynucléaires et d'hématies.

Par contre un échantillon positif se définit par la présence de germe pathogène, de leucocytes, de polynucléaires et d'hématies.

L'analyse des échantillons, illustrée dans le tableau 2, montre que la fréquence des échantillons négatifs (74,4 %) est beaucoup plus importante que celle des échantillons positifs ou contaminés.

Tableau 2 : Répartition des échantillons positifs et négatifs. (Résultats des examens microscopiques des échantillons biologique).

Résultat d'analyse	Prélèvements vaginaux	Sperme	Pourcentage (%)
Positif	34	6	22,2 %
Négatif	79	55	74,4 %
Contaminé	4	2	3,33 %
Total	117	63	100 %

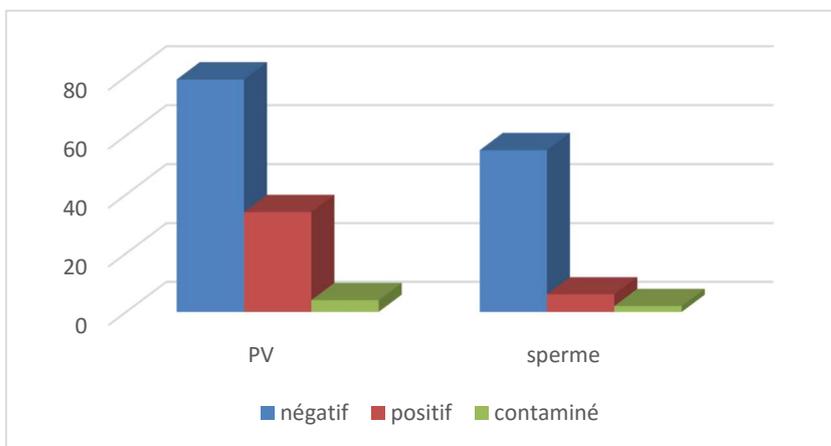


Figure 5 : Représentation en histogramme de la répartition des échantillons négatifs, positifs et contaminés.

I.4 Répartition des échantillons en fonction du sexe :

Le nombre d'échantillon reçu de patients de sexe féminin (65 %) représente presque le double de celui reçu de patients de sexe masculin (35 %) (tableau 3). Ces résultats pourraient être expliqués par la particularité anatomique et physiologique de l'appareil génital femelle.

Tableau 3 : répartition des cas positifs et négatifs selon le sexe

Sexe	Nombre d'échantillons	Cas positif	Cas négatif	Echantillons contaminés
Homme	63	6	55	2
Femme	117	34	79	4
Total	180	40	134	6

En effet, les échantillons positifs chez le sexe féminin sont toujours majoritaires que celle des échantillons positifs observées chez le sexe masculin. Figure (5)

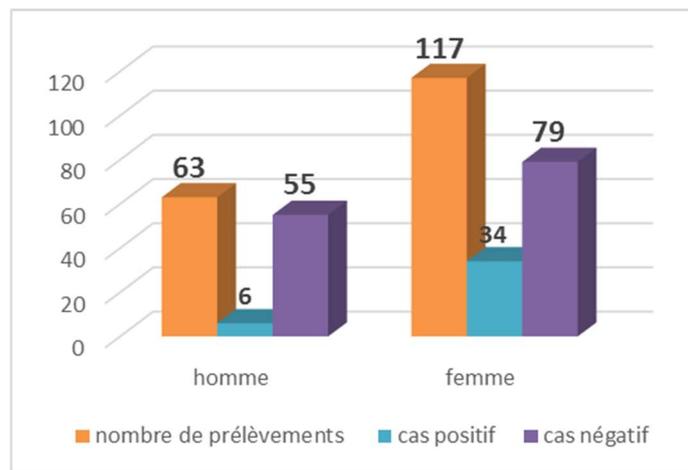


Figure 6 : Représentation en histogramme de la répartition des cas positifs et négatifs selon le sexe.

II. Résultats de l'examen cytbactériologique et parasitologique

L'examen microscopique des échantillons positif par l'observation microscopique à l'état frais ou bien après coloration au bleu de méthylène a indiqué la présence de leucocytes ou bien des polynucléaires qui signifie la présence d'une réaction inflammatoire.

Les résultats de l'examen microscopique à l'état frais à l'objectif X40 des prélèvements vaginaux chez la femme, a révélé la présence de :

- leucocytes pour 86 cas,
- La flore microbienne importante pour 64 cas,
- hématies pour 12 cas.

- Les cellules épithéliales pour 109 cas.

Tandis que l'examen microscopique après coloration au bleu de méthylène du sperme chez l'homme a montré la présence de :

- polynucléaires pour 12 cas,
- leucocytes pour 16 cas,
- cellules épithéliales pour un seul cas.

III. Répartition des germes isolés selon le sexe

Les résultats des isolements de germes pathologiques dans les différents échantillons biologique sont mentionnés dans le tableau suivant.

Tableau 4 : répartition des germes isolés selon le sexe

Germe		Femme	Homme
Champignons	Levure	17	0
Bactéries	<i>E. coli</i>	5	0
	<i>Streptococcus spp</i>	3	2
	<i>Enterococcus spp</i>	1	1
	<i>Mycoplasma</i>	5	0
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	0
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	0	0
	<i>Klebsiella pneumonie</i>	2	0
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	0	3
Protozoaires	<i>Trichomonas vaginalis</i>	0	0
Total		34	6

Les germes isolés des échantillons de prélèvements vaginaux montrent la prédominance des levures dans 17 échantillons avec un pourcentage de 50 %, les bactéries sont trouvées dans les 17 autres échantillons dont la répartition est la suivante : *E. coli* et *Mycoplasma spp* avec 14,8 %, et *Streptococcus spp* avec 8,8 %, puis *klebsiella pneumonie* avec 5,8 %, enfin *Klebsiella oxytoca* et *Enterococcus spp* avec un faible pourcentage de 2,9 %. On note l'absence totale du protozoaire *trichomonas vaginalis*.

Les résultats que nous avons obtenus sont différents de ceux des résultats d'une étude rétrospective menée à l'hôpital Parnet d'Alger par Benslimani A. et ces collaborateurs. En effet cette équipe a pu isolé, à partir d'échantillons de prélèvements vaginaux, des bactéries à raison de 50 %, des levures à raison de 35 % et des *trichomonas vaginalis* avec un pourcentage de 15 %.

À partir d'échantillons de sperme, nous avons pu isolé six bactéries appartenant à trois espèces différentes. *Neisseria gonorrhoeae* avec un pourcentage de 50 %, *Streptococcus spp* à raison de 33,3 % et *Enterococcus spp* avec 16,7 %.

Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Naim. M (1995), étude réalisée à l'hôpital militaire de Tindouf entre 1990 et 1993, où les résultats ont montré que *Neisseria gonorrhoeae* vient en première position avec une prévalence de 33,78 %.

Par ailleurs, l'infection uro-génitale à *C. trachomatis* est la plus fréquente des IST d'étiologie bactérienne. Elle atteint particulièrement l'homme jeune et la femme en âge de procréer, constituant ainsi un véritable problème de santé publique dans le monde (Hamdaf F., 2010). Alors que notre étude a révélé l'absence totale de *C. trachomatis* dans nos échantillons, cette différence est probablement due à :

- La technique de diagnostic utilisée qui sert apporte un diagnostic rapide mais avec des performances limitées.
- Les prélèvements génitaux contenant peu de corps bactériens qui peuvent apparaître faussement négatifs.

L'identification des mycoplasmes urogénitaux reposent sur l'utilisation de leurs propriétés métaboliques : hydrolyse de : l'urée par *Ureaplasma urealyticum* (UU), l'arginine par *Mycoplasma hominis* (MH), avec libération d'ammoniaque et alcalinisation du milieu (sans trouble du milieu).

Dans notre étude, nous avons obtenus un taux de 14,8 % de cas positifs à mycoplasme chez les femmes. Ce taux est inférieur à celui trouvé dans une étude réalisée au Maroc (74 %) sur 90 femmes (Radouani.F. *et al*, 2010).

Ces différences peuvent être s'expliquées par :

- Une différence de méthodologie de diagnostic.
- Une différence de collecte d'échantillons

- La durée d'étude qui est de trois mois pour notre étude alors que leur étude a été plus importante.

IV. Répartition des microorganismes isolés selon leurs types tinctoriaux

Selon notre étude (tableau 5), les bactéries à coloration de Gram négative présentent un taux de 27,5 % alors que les bactéries à coloration de Gram positive présentent un taux de 17,5 %.

Tableau 5 : répartition des isolats selon leur type tinctorial

	Gram négatif	Gram positif	Autres germes	Total
Nombre de germes	11	7	22	40
Pourcentage	27,5 %	17,5 %	55 %	100 %

Les infections sexuellement transmissibles ont des conséquences graves sur la santé publique, un seul rapport sexuel non protégé peut suffire à transmettre l'infection.

Ces infections peuvent être dues aux différents microorganismes : bactéries, virus, protozoaires et champignons.

Les résultats obtenus au cours de notre étude sur les infections sexuellement transmissibles, montre que :

- Le taux de positivité des échantillons de patients suspectés d'être atteints d'infections sexuellement transmissibles est de 22.2 %.
- Le sexe féminin est le sexe le plus exposé aux infections sexuellement transmissibles avec un taux de 65 %.
- Les germes en cause les plus fréquents sont : les levures chez les femmes, et *Neisseria gonorrhoeae* chez les hommes.

Enfin, il ne faut pas oublier qu'une IST peut en cacher d'autres et l'utilisation des techniques de détection de plusieurs microorganismes simultanément devrait permettre une meilleure connaissance de l'épidémiologie de ces infections et une meilleure prise en charge des patients.

En conclusion, la prévention demeure le meilleur moyen de lutte contre ces infections. Cette prévention s'articule sur le respect des mesures d'hygiène.

- **Archambaud M. et Clave D.** (2008) Diagnostic bactériologique direct d'une infection : les prélèvements, principales bactéries en cause, interprétation. Laboratoire de Bactériologie-Hygiène Faculté de Médecine Toulouse-Rangueil.
- **Benslimani A., Bachi F., et Belazzoug S.** (1994) L'examen bactériologique, mycologique et parasitologique des prélèvements vaginaux : étude rétrospective sur une année au laboratoire central de l'hôpital Parnet. Le journal du praticien : n°3 : mai :98-103
- **Cardinale V.** (2001) Les candidoses vaginales récidivantes à *Candida albicans*. Thèse. Université HENRI Poincaré-Nancy I. Faculté de pharmacie. p : 27
- **E.pilly** (2002). Maladies infectieuses et tropicales par le college universitaire des maladies infectieuses et tropicales, 18ème édition.
- **Hamdaf F.** (2010). Diagnostic des infections sexuellement transmissibles à Chlamydia et à mycoplasme. Service de Bactériologie, CHU d'Amciens, France.
- **Loup J. Dabernat H. Denis F. et Monteil H.** (1992). Bactériologie clinique (édition 2) CHU. Toulouse.
- **Kamalebo L. E.** (2013) L'impact socio-économique des maladies sexuellement transmissibles sur la population active de la ville de Goma. Cas du quartier Mapendo. Rapport de stage. Institut UZIMA.
- **Lagane C.** (2007) Rôle de l'il-13 et des ligands de ppar- γ dans la réponse anti-infectieuse des macrophages murins et des monocytes humains vis-à-vis de *Candida albicans* implication de ppar- γ . Thèse. Université Toulouse III. Faculté d'immunopathologie oncogénèse et signalisation cellulaire. p : 12.
- **Naim M.** (1995) Les urétrites masculines gonococciques et non gonococciques en milieu militaire. Thèse de DESM.
- **OMS (2015) :** les infections sexuellement transmissibles : [//www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/fr/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/fr/)
- **Prescott H., Klein W. et Sherwood W.** (2010) La microbiologie (édition2).
- **Radouani F., Benmoussa D. et Hassar M.** (2010). Les infections sexuellement transmissibles à *Chlamydia trachomatis* et à Mycoplasmes urogénitaux au Maroc. Laboratoire des Infections sexuellement transmissibles. Institut Pasteur, Casablanca, Maroc
- **Rahal K.** (2001) Techniques microbiologiques (prélèvements génitaux). Institut PASTEUR d'Algérie.

Annexe 1. Composition de la gélose de chocolat au sang cuit :

polypeptone	15g/l
Amidon de maïs.....	1g/l
Chlorure de sodium.....	5g/l
Hémoglobine (bovin).....	10g/l
Agar.....	10g/l
pH	7.2

Annexe 2. Composition de bleu de méthylène :

Eau bidistillée.....	100g/l
Bleu de méthylène.....	10g/l
Sodium dodécyl sulfate.....	1g/l

Annexe 3. L'écouvillon de prélèvement :



Diagnostic microbiologique des infections sexuellement transmissibles. Étude prospective de trois mois

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes

Résumé

Les infections sexuellement transmissibles représentent un problème de santé publique en raison de leur fréquence élevée dans le monde.

L'objectif de notre étude est le diagnostic microbiologique des infections sexuellement transmissibles par des méthodes classiques de microbiologie qui passe par plusieurs étapes : examens directs, isolements et identification, afin d'analyser le profil microbiologique de ces infections

Durant la période d'étude (1^{er} février jusqu'au 30 avril de l'année 2016), nous avons reçu un total de 180 échantillons, au niveau de l'unité (MST) maladies sexuellement transmissibles, laboratoire de Bactériologie, CHU BenBadis Constantine. 40 germes ont été isolés de divers prélèvements (65 % prélèvements vaginaux, 35 % prélèvements sperme). Les germes isolés à partir des échantillons vaginaux sont : des levures avec un pourcentage de 50 %, suivi d'*E. coli* et *Mycoplasma spp.* avec 14,8 %, et de *Streptococcus spp* avec 8,8 %, puis *klebsiella pneumonie* avec 5,8 %, enfin *Klebsiella oxytoca* et *Enterococcus spp* avec un faible pourcentage de 2,9 %. Les germes isolés de sperme sont : *Neisseria gonorrhoeae* en première position avec un pourcentage de 50 %, suivi de *Streptococcus spp* à 33,3 %, et enfin *Enterococcus spp* à 16,7 %.

En conclusion, la connaissance de la nature, la fréquence et la sensibilité des germes responsables de ces infections permet d'améliorer la prise en charge. La prévention demeure le meilleur moyen de lutte contre ces infections.

Mots clés : IST, diagnostic microbiologique, *Chlamydia trachomatis*, mycoplasme, *Trichomonas vaginalis*, prélèvements vaginaux, sperme.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie Microbiologique et Applications UFM Constantine

Jury d'évaluation :

Président du jury : AITKAKI Zahia (Pr - Univ 3 Constantine),
Rapporteur : OULMI Lamia (MCB - UFM Constantine),
Examineur : BOUZERAIB Latifa (MAA - UFM Constantine).

Date de soutenance : le 22 /06/2016