

RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE

Université Badji Mokhtar Annaba

Badji Mokhtar University

جامعة باجي مختار، عنابة



FACULTÉ DES SCIENCES
DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE
Laboratoire de Biochimie et de Microbiologie appliquées



THÈSE

en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat L.M.D

En Microbiologie
Option : **Microbiologie Appliquée**

THÈME

**Rôle des lactobacilles isolés de différents biotopes
dans le contrôle de la microflore vaginale.**

Présentée Par : Souad ALIOUA

Devant le jury :

Président :	BRANES Zidane	(Pr)	Université d'Annaba
Directrice de thèse :	ABDI Akila	(MC A)	Université d'Annaba
Examinatrice :	GRARA Nedjoud	(MC A)	Université de Guelma
Examinatrice :	CHETTIBI Houria	(Pr)	Université d'Annaba
Examineur :	AOUADI Saoudi	(Pr)	Université d'Annaba

Année universitaire : 2016 -2017.

REMERCIEMENTS

Louange à Dieu qui nous a donné l'esprit, la volonté, le courage et le savoir.

*Je tiens à exprimer mes respectueux remerciements et toute ma gratitude à ma directrice de thèse **Melle ABDI Akila**, maître de conférences (MC A) à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour la confiance et la bienveillance qu'elle m'a témoignée et dont la disponibilité et l'indulgence m'ont permis de mener à bien cette étude. Je la remercie pour son aide précieuse et les conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de mon parcours difficile de doctorat.*

*A **Mr BRANES Zidane**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury, qu'il trouve ici l'expression de ma respectueuse reconnaissance.*

Je remercie vivement les membres examinateurs pour avoir accepté d'évaluer ce travail, particulièrement :

***Mme CHETTIBI Houria**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Mr AOUADI Saoudi**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse.*

***Mme GRARA Nedjoud**, maître de conférence classe A à l'université de Guelma, qui a honoré ce travail en acceptant d'être membre de jury de cette thèse. Je la remercie également de me consacrer de son temps et d'avoir accepté de se déplacer.*

*Mes vifs remerciements vont à **Mr LADJAMA Ali**, Professeur à l'université Badji Mokhtar Annaba, et directeur de laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée (LBMA) de m'avoir ouvert les portes du laboratoire et d'avoir réuni toutes les conditions propices au bon déroulement de nos travaux de recherche.*

Mes remerciements cordiaux à :

***Mme AOURES Djamil**a responsable du service de Gynécologie à l'hôpital d'El Bouni à Annaba ; **Docteur SAIHI Chaffai** et **Docteur ABADA Wided**, gynécologues à Annaba ; pour m'avoir accueilli, tout en me permettant d'avoir les prélèvements vaginaux et les prélèvements de lait maternel nécessaires à mon travail de recherche.*

Je remercie également tout le personnel du service de gynécologie à l'hôpital Ibn Roched, personnel du secteur sanitaire de Hadjer-Ediss à Annaba. Ainsi qu'au personnel du service de gynécologie à l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahya et la polyclinique Tebal Abdelmadjid à Jijel pour m'avoir permis de faire ma collecte de prélèvements vaginaux.

Je remercie tout les bénévoles qui m'ont permis d'avoir les prélèvements bucco-dentaires et les prélèvements rectaux chez les nourrissons allaités au sein nécessaires pour mon travail de recherche.

*Je n'oublie pas de remercier également Docteur **CHALGHEM**, directeur de laboratoire d'hygiène à Jijel, qui m'a donné la chance de travailler au cours de la période estivale.*

Mes vifs remerciements s'adressent également à :

*Professeur **BOUDABOUS Abdellatif** et Professeur **OUZARI Hadda-Imène**, pour m'avoir ouvert leurs portes du laboratoire LMBA (Laboratoire de Microbiologie et de Biomolécules Actives), faculté des Sciences d'El Manar Tunis-Tunisie, pour réaliser des techniques de biologie moléculaire, auprès d'eux j'ai beaucoup appris.*

*Je n'oublie pas de remercier Docteur **FHOULA Imène** pour sa disponibilité, son encouragement et sa complicité. Ainsi que tout le personnel du LMBA : Mounira, Wajdi, Sawssen, Chafik et Olfa.*

*Madame **BRINGEL Françoise**, Professeur à l'université de Strasbourg- France qui m'a permis de rejoindre son équipe UMR 7156 UNISTRA CNRS pour réaliser des techniques en biologie moléculaire, soyez assuré de ma sincère gratitude et de mes remerciements.*

*Monsieur **ENNAHAR Said**, Professeur à l'université de Strasbourg- France qui m'a permis de rejoindre l'équipe de Chimie Analytique des Molécules Bioactives, UMR7178 pour réaliser les techniques en chimie analytique dans le but de caractériser mes substances antimicrobiennes.*

*Je remercie le personnel du Département de Biochimie et spécialement nos techniciennes et techniciens de laboratoires : **Saida, Lazhar, Mouna, Nadjoua, Sakina, Zineb et Bouchra.***

*Mes remerciements à mes collègues **Sameh, Nadjat, Zahra, Ryma, Nour, Imène, Badra, Saida, Samia, Rym et Mouna** pour leur collaboration, leurs encouragements et la sympathie qu'ils m'ont toujours témoigné.*

Ces remerciements ne seraient pas complets sans mentionner :

*Mes chers parents **Mr FERDJALLAH Ammar et Mme FERDJALLAH Hafida**, pour ces longues années de soutien inconditionnel, pour leur confiance permanente et l'acceptation de mes choix. Ils m'ont offert la possibilité de réaliser mon rêve. Ils ont toujours témoigné de la plus grande des patiences et de la plus grande des compréhensions. Malgré toutes les difficultés rencontrées au cours de ces longues années d'études, ils m'ont toujours facilité ce parcours, au prix de nombreux efforts. Il me sera impossible de leur rendre tout ce qu'ils m'ont offert. Rien n'aurait été possible sans eux, cette réussite est donc un peu la mienne, mais surtout la leur. Aucun remerciement ne serait suffisant.*

*Et enfin, mes plus grands remerciements vont à la lumière de ma vie. Mon merveilleux époux **Mr GHOUIL Adel** qui embellit ma vie chaque jour, pour son soutien quotidien, son optimisme persistant, pour ses encouragements et son assistance qui m'ont permis de réaliser cette thèse dans de bonnes conditions, Merci à toi.*

Je remercie toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration et l'évaluation de ce travail.

Dédicaces

Avec joie et honneur, je dédie ce travail :

A mes parents

A mes parents biologiques

A mes beaux parents

A mon mari

A mes frères : Naceredine et Imed

A mes sœurs : Nadia, Nihed, Rima, Mouna, Ines et Meriem

A mes beaux-frères : Habib Chawki et Ayoub

A mes belles sœurs : Fatiha, Dounia, Leila, Meriem et Zineb.

A toutes les familles : Alioua, Ferdjallah et Ghouil

A toutes mes amies

A tous ceux que j'aime

Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
	Pages
Introduction	1 à 4

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 : L'écosystème vaginal

1.1. La microflore vaginale de femmes saines.....	5
1.1.1. Composition de la flore vaginale normale	5
1.1.2. Physiologie vaginale	5
1.1.3. Evolution de la microflore vaginale	6
1.1.4. Equilibre de la microflore	7
1.2. Les facteurs de régulation	7
1.3. Le rôle de la flore lactobacillaire.....	7
1.3.1. Inhibition de la croissance du pathogène	7
1.3.2. Mécanismes d'inhibition de l'adhésion du pathogène	10
1.3.3. Inhibition de l'expansion du pathogène	12
1.3.4. Stimulation des défenses immunitaires locales.....	12

Chapitre 2 : La pathologie des voies vaginales basses

2.1. Le déséquilibre de la microflore vaginale.....	14
2.1.1. Facteurs de déséquilibre	14
2.1.2. Mécanismes des infections	14
2.2. Les infections vaginales.....	14
2.2.1. Les vaginites bactériennes aérobies « <i>Aerobic vaginitis</i> ».....	14
2.2.2. Les mycoses vaginales.....	17
2.2.3. Autres pathologies	20
2.2.3.1. La gonococcie et les infections à <i>Neisseria</i>	20
2.2.3.2. Les infections à <i>Chlamydia trachomatis</i>	21
2.2.3.3. Les vaginites à <i>Trichomonas vaginalis</i>	22
2.2.3.4. Les vaginoses bactériennes	22

Chapitre 3 : Bactéries lactiques et probiotiques

3.1. Bactéries lactiques.....	24
3.1.1. Caractères généraux.....	24
3.1.2. Taxonomie.....	24

3.1.3. Applications.....	25
3.1.3.1. Applications industrielles.....	25
3.1.3.2. Conservation des aliments.....	25
3.1.3.3. Application probiotique.....	26
3.2. Action des probiotiques au niveau intestinal.....	26
3.2.1. Historique et définition.....	26
3.2.2. Effets positifs sur la santé et mécanismes d'action.....	27
3.2.3. Critères de sélection.....	27
3.3. Développement des probiotiques au niveau vaginal.....	28
3.3.1. Définition.....	28
3.3.2. Mécanismes d'action des souches probiotiques.....	29
3.3.3. Critères de sélection.....	29

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 1 : Isolement et caractérisation des microorganismes de différents biotopes

1.1. Les différents prélèvements.....	30
1.1.1. Prélèvements vaginaux.....	30
1.1.2. Prélèvements bucco-dentaires.....	34
1.1.3. Prélèvement rectal chez les nourrissons allaités au sein.....	34
1.1.4. Prélèvement du lait maternel.....	35
1.2. Isolement des microorganismes.....	36
1.2.1. Isolement des microorganismes vaginaux potentiellement pathogènes.....	36
1.2.2. Isolement des lactobacilles de différents biotopes.....	36
1.3. Purification des microorganismes isolés.....	36
1.4. Conservation.....	37
1.5. Caractérisation des souches isolées.....	37
1.5.1. Caractérisation des microorganismes vaginaux potentiellement pathogènes.....	37
1.5.1.1. Tests préliminaires.....	37
1.5.1.2. Caractérisation biochimique (Système API, BioMérieux).....	38
1.5.1.3. Antibiogramme.....	39
1.5.2. Caractérisation des levures.....	42
1.5.2.1. Test de filamentation (blastèse).....	42
1.5.2.2. Antifongigramme.....	42
1.5.2.3. Amplification des régions intergéniques ITS1-ITS2 pour les souches de levures sélectionnées comme souches indicatrices.....	43
1.5.3. Caractérisation des lactobacilles de différents biotopes.....	43
1.5.3.1. Tests préliminaires.....	43
1.5.3.2. Tests physiologiques.....	44
1.5.3.3. Antibiogramme.....	44

Chapitre 2 : Sélection des lactobacilles à propriétés probiotiques

2.1. Activité antimicrobienne (Inhibition de la croissance des microorganismes pathogènes)	
2.1.1. Détection de l'activité antimicrobienne (Technique des disques).....	45
2.1.2. Détermination des conditions de cultures pour la mise en évidence des molécules inhibitrices (Technique des puits).....	45
2.2. Activité de l'arginine déshydrogénase « ADH »	48
2.3. Formation de biofilm sur les micro-plaques de polystyrène	49
2.4. Production d'exopolysaccharides (EPS)	49
2.5. Inhibition de la formation de biofilms par les microorganismes uropathogènes	50
2.6. Activité acidifiante	50
2.7. Production du peroxyde d'hydrogène	51
2.8. Résistance à différentes concentrations de Métronidazole, Clindamycine et Fluconazole	51

Chapitre 3 : Identification phénotypique et moléculaire des lactobacilles à potentiel probiotiques

3.1. Identification biochimique par Système API 50 CHL (Bio Mérieux)	52
3.2. Identification moléculaire.....	52
3.2.1. Extraction de l'ADN génomique par la méthode CTAB/ NaCl	52
3.2.2. Amplification enzymatique de l'ADN par PCR.....	52
3.2.2.1. Amplification des espaces intergéniques 16S-23S	53
3.2.2.2. Amplification de l'opéron ribosomique ADNr 16S	54
3.2.2.3. Amplification des espaces intergéniques 23S-5S pour les souches affiliées à <i>Lactobacillus casei</i> et souches apparentées.....	54
3.2.3. Analyse électrophorétiques (électrophorèse sur gel d'agarose).....	55
3.2.4. Séquençage de l'ADNr 16S par la méthode de Sanger et profils automatisés de visualisation de séquences d'ADN.....	56
3.2.5. Analyse des séquences et identification des bactéries.....	57
3.2.6. Analyse phylogénétique	59

Chapitre 4 : Mise en évidence de la diversité de la flore lactique chez des femmes enceintes par une technique de culture indépendante

4.1. Principe de la technique DGGE.....	60
4.2. Prélèvements à analyser	61
4.3. Caractérisation des prélèvements vaginaux	63
4.3.1. Détermination du Score de Nugent	63
4.3.2. Détermination du pH	63
4.4. Préparation du système DGGE (INGENY).....	63
4.5. Protocole de la DGGE.....	65

4.5.1. Extraction de l'ADN	65
4.5.2. Amplification PCR-DGGE	66
4.5.3. Préparation du gel d'empilement	66
4.5.4. Fonctionnement du gel	67
4.5.5. Manipulation du gel après électrophorèse	67
4.5.6. Excision des bandes à partir du gel à gradient dénaturant, ré-amplification et séquençage	67

RÉSULTATS

Chapitre 1 : Caractérisation des souches isolées

1.1. Pré-identification des microorganismes potentiellement pathogènes isolés de prélèvements vaginaux.....	69
1.2. Caractérisation de bactéries utilisées comme indicatrices.....	70
1.2.1. Identification biochimique par système API (Bio Mérieux).....	70
1.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries vaginales potentiellement pathogènes.....	73
1.3. Caractérisation des levures isolées.....	77
1.3.1. Morphologie	77
1.3.2. Test de filamentation	77
1.3.3. Antifongigramme	77
1.3.4. Identification moléculaire de levures sélectionnées	77
1.4. Caractérisation des lactobacilles isolées de différents biotopes.....	79
1.4.1. Caractérisation phénotypique	79
1.4.2. Antibiogramme	79

Chapitre 2 : Sélection des lactobacilles à propriétés probiotiques

2.1. Inhibition de la croissance des microorganismes uropathogènes	81
2.1.1. Détection de l'activité antimicrobienne par diffusion sur gélose (Technique des disques)	81
2.1.2. Détermination de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de 19 souches indicatrices (Technique des puits)	84
2.1.3. Mise en évidence des molécules inhibitrices (technique des puits)	86
2.2. Activité de l'arginine désaminase, pouvoir acidifiant, production du peroxyde d'hydrogène et production d'exopolysaccharides	92
2.3. Formation de biofilm sur les micro-plaques de polystyrène	93
2.4. Inhibition de la formation de biofilms des microorganismes uropathogènes	94
2.5. Résistance à différentes concentrations de Métronidazole, Clindamycine et Fluconazole	96

Chapitre 3 : Identification phénotypique et moléculaire des lactobacilles à potentiel probiotiques

3.1. Identification biochimique par Système API 50 CHL (Bio Mérieux).....	97
3.2. Identification moléculaire.....	101
3.2.1. Amplification des espaces intergéniques 16S-23S	101
3.2.2. Amplification de l'opéron ribosomique ADNr 16S.....	101
3.2.3. Analyse phylogénétique	103

Chapitre 4 : Diversité de la flore lactique chez des femmes enceintes en utilisant une technique de culture indépendante

4.1. Détermination du Score de Nugent et mesure de pH des prélèvements vaginaux.....	105
4.2. Identification taxonomique de la flore lactique vaginale par utilisation des amorces spécifiques Lac2-Lac3 et Lac1-Lac2 et les amorces universels 907R-357F.....	106

DISCUSSION	113
-------------------------	-----

Conclusion	120
-------------------------	-----

Références bibliographiques	123
--	-----

Résumé

Abstract

الملخص

Productions scientifiques

Annexes

Liste des abréviations

ADH : arginine dihydrolase

ADI : arginine déiminase

ADN : acide désoxyribonucleique

API 20E : analytical profile index 20E (E= Entérobactéries)

API STAPH : analytical profile index *Staphylococcus*

API 20NE : analytical profile index 20NE (N= Non, E= Entérobactéries)

APS : persulfate d'ammonium

ARN : acide ribonucleique

ATCC : american type culture collection

BET : bromure d'éthidium

Blast : basic local alignment search tools

CFS : cell - free supernatant

CLSI : clinical and laboratory standards institute

CMI : concentration minimale inhibitrice

DGGE : denaturing gradient gel electrophoresis

dNTP : désoxyribonucléotides triphosphate

ddNTP : didésoxyribonucléotides triphosphate

DO : densité optique

DS : déviation standard

EDTA : éthylène diamine tétra-acétique

EPS : exopolysaccharides

FAO : food and agriculture organization of the United Nations

H₂S : hydrogène sulfuré

Ig : immunoglobuline

ITS : internal transcribed space

LM : lait maternel

NCBI : national center for biotechnology information

NCCLS : national committee for clinical laboratory standard

OMS : organisation mondiale de la santé

OX : oxydase

PB : prélèvement buccal

PBS : phosphate buffered saline

PCR : polymerase chain reaction

PFGE : pulsed-field gel electrophoresis

pH : potentiel hydrogène

PR : prélèvement rectal

PV : prélèvement vaginal

TAE : tris-acetate- éthylène diamine tétra-acétique

TBE : tris-borate- éthylène diamine tétra-acétique

TE : tris- éthylène diamine tétra-acétique

TEMED : tetramethyl ethylene diamine

TTGE : temporal temperature gradient gel electrophoresis

UFC : unité formant colonie

UI : unité internationale

UV : ultra violet

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

VP : voges-proskauer

WHO : world health organization

Zi : zone d'inhibition

Liste des figures

- Figure 1** : Localisation du vagin au sein de l'appareil génital féminin.
- Figure 2** : Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles.
- Figure 3** : Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles.
- Figure 4** : Effet des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes.
- Figure 5** : Effet de lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase.
- Figure 6** : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière du à l'adhésion des lactobacilles à l'épithélium vaginal.
- Figure 7** : Mécanismes d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par adhésion des lactobacilles à la fibronectine.
- Figure 8** : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière des biosurfactants produits par les lactobacilles.
- Figure 9** : Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) standard.
- Figure 10** : Les étapes du séquençage par la méthode de Sanger et appareillage.
- Figure 11** : Electrophérogramme des séquences de bases azotées correspondantes.
- Figure 12** : Technique DGGE.
- Figure 13** : Présentation des microorganismes potentiellement pathogènes.
- Figure 14** : Répartition des bactéries potentiellement pathogènes selon le Gram.
- Figure 15** : Répartition des microorganismes potentiellement pathogènes selon le genre.
- Figure 16** : Répartition des microorganismes chez les femmes enceintes ou non.
- Figure 17** : Répartition des microorganismes isolés selon l'aspect clinique.
- Figure 18** : Antibiogramme standard de la souche *Klebsiella oxytoca* SI3.
- Figure 19** : Antibiogramme standard de la souche *Staphylococcus aureus* SI10.
- Figure 20** : Aspect macroscopique et microscopique (coloration au bleu de méthylène GX100) de *Candida albicans* L2.
- Figure 21** : Amplification des régions intergéniques ITS1 et ITS4 chez les levures sélectionnées.
- Figure 22** : Aspect macroscopique de quelques souches de *Lactobacillus sp.* de différents biotopes sur MRS agar (A) et milieux LAMVAB (B, C).
- Figure 23** : Répartition des lactobacilles isolées selon le type de prélèvement.
- Figure 24** : profil d'antibiorésistance des souches appartenant au genre *Lactobacillus*.

- Figure 25 :** Zones d'inhibition par les lactobacilles vis-à-vis d'*E. coli* SI1, *K. oxytoca* SI3 et *C. albicans* L2 (technique des disques).
- Figure 26 :** Répartition des lactobacilles à pouvoir inhibiteur selon l'origine des prélèvements.
- Figure 27 :** Répartition des lactobacilles de différents biotopes à fort potentiel inhibiteur vis-à-vis des souches indicatrices.
- Figure 28 :** Activité inhibitrice du CFS de lactobacilles vis-à-vis de *Ec. faecalis* SI71 (A), *S. aureus* SI10 (B, D), *S. marcescens* SI5 (C) et *C. glabrata* L4 (E).
- Figure 29 :** Pouvoir inhibiteur des CFS des lactobacilles sélectionnés.
- Figure 30 :** Spectre d'inhibition des lactobacilles à pouvoir inhibiteur.
- Figure 31 :** Activité inhibitrice du surnageant après traitement des souches de lactobacilles (LB24: A, LB55: B, LB30: C) vis-à-vis de certaines souches pathogènes.
- Figure 32 :** Résultats de mise en évidence des molécules inhibitrices dans les surnageants des lactobacilles LB57, LB74 et LB30.
- Figure 33 :** Couleur des colonies de lactobacilles producteurs du peroxyde d'hydrogène .
- Figure 34 :** Niveaux de biofilms formés sur microplaques de polystyrène par les lactobacilles sélectionnés.
- Figure 35 :** Résultats d'inhibition de biofilms des microorganismes uropathogènes (*K. pneumoniae* SI2; *Ps. aeruginosa* SI6; *C. glabrata* L4; *C. albicans* L2) par le CFS des lactobacilles sélectionnés.
- Figure 36 :** régions intergéniques ISR 16S–23S rDNA des souches de lactobacilles sélectionnées.
- Figure 37 :** Amplifiats de l'ADNr 16S des souches sélectionnées.
- Figure 38 :** arbre phylogénique des isolats des bactéries lactiques basées sur des séquences partielles d'ADNr 16S.
- Figure 39 :** Profil DGGE des produits PCR (amorces Lac2-Lac3) des prélèvements vaginaux.
- Figure 40 :** Profil DGGE des produits PCR (amorces Lac1-Lac2) des prélèvements vaginaux.
- Figure 41 :** Profil DGGE des produits PCR (amorces 907R-357F) des prélèvements vaginaux.
- Figure 42 :** Répartition des bactéries à Gram positives chez 15 femmes enceintes.

Liste des tableaux

- Tableau 1.** Bactéries cultivables détectées dans le vagin de la femme saine.
- Tableau 2.** Présentation des différents prélèvements vaginaux.
- Tableau 3.** Présentation des différents prélèvements bucco-dentaires.
- Tableau 4.** Présentation des différents prélèvements rectaux.
- Tableau 5.** Présentation des différents prélèvements du lait maternel.
- Tableau 6.** Liste des antibiotiques testés selon les bactéries isolées.
- Tableau 7.** Interprétation des CMI de *Candida* par les méthodes CLSI et EUCAST.
- Tableau 8.** Amorces utilisées et conditions d'amplification.
- Tableau 9.** Souches indicatrices utilisées pour détermination de l'activité antimicrobienne des lactobacilles.
- Tableau 10.** Amorces, taille des amplicons attendus et conditions d'amplification.
- Tableau 11.** Régions intergéniques 23S-5S des souches utilisées comme témoins positif.
- Tableau 12.** Composition du mélange réactionnel utilisé pour les réactions PCR.
- Tableau 13.** Présentation des différents prélèvements vaginaux analysés par la technique DGGE.
- Tableau 14.** Calcul du score de Nugent après coloration de Gram.
- Tableau 15.** Composition de la solution dénaturante.
- Tableau 16.** Oligonucleotides utilisés pour la PCR- DGGE.
- Tableau 17.** Conditions d'amplification PCR-DGGE.
- Tableau 18.** Identification par API 20 E des souches d'entérobactéries fermentaires.
- Tableau 19.** Identification par API 20 NE des bacilles à Gram négatif non fermentaires.
- Tableau 20.** Identification par API 20 Staph des souches de Staphylocoques.
- Tableau 21.** Résultats d'antibiogramme standard des souches d'entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterococcus*).
- Tableau 22.** Résultats d'antibiogramme standard des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Tableau 23.** Résultats d'antibiogramme standard des souches de *Staphylococcus aureus*.
- Tableau 24.** Résultats de séquençage des régions intergéniques ITS1-ITS4.
- Tableau 25.** Zones d'inhibition de lactobacilles pré-sélectionnés à pouvoir inhibiteur important (technique des disques).
- Tableau 26.** L'activité antimicrobienne du CFS (sous différents traitements) des lactobacilles sélectionnés.

Tableau 27. Activité de l'arginine désaminase, pouvoir acidifiant, production du peroxyde d'hydrogène et production d'exopolysaccharides.

Tableau 28. Résultats de caractérisation biochimique et physiologique des lactobacilles sélectionnés.

Tableau 29. Résultats d'identification des isolats de lactobacilles à propriétés probiotiques.

Tableau 30. Résultats d'alignement des séquences de l'ADNr 16S des dix souches de lactobacilles.

Tableau 31. Caractéristiques des prélèvements vaginaux des 15 femmes enceintes.

Tableau 32. Résultats du séquençage de l'ADNr16S des bandes d'ADN excisés.

INTRODUCTION

Le système génital de la femme adulte en raison de sa grande surface et de ses sécrétions muqueuses constitue une véritable niche écologique pour un certain nombre de microorganismes qui y vivent à l'état commensal.

Cette microflore très hétérogène, prédominée à l'état normal par des bacilles du genre *Lactobacillus*, dit bacille de Döderlein. Ce genre fait partie d'un groupe communément appelé "Bactéries lactiques", regroupées pour la première fois par Orla-Jensen (1919), en raison de leurs caractéristiques physiologiques et écologiques communes.

Les lactobacilles vaginaux ont été découverts dans les années 1890 par Döderlein qui décrit la flore vaginale comme homogène et constituée de bacilles Gram positif. Par la suite, dans les années 1900, Metchnikoff fut le précurseur de l'utilisation de lactobacilles dans le but de restaurer la microflore intestinale *via* la consommation de laits fermentés. Puis, dans les années 1930, Molher et Brown furent les premiers à proposer un traitement des vaginites et de la vaginose par l'application d'une culture de bacilles de Döderlein.

La microflore de Döderlein est composée d'une à plusieurs espèces de lactobacilles (Reid et Bocking, 2003). Avant les années 1980, les principales souches identifiées par méthode phénotypique étaient assignées à l'espèce *Lactobacillus acidophilus*.

Le groupe de bactéries précédemment connu sous le nom de *L. acidophilus* s'est révélé très hétérogène par Lauer *et al.* (1980). Ensuite, ce groupe a été divisé selon l'homologie d'ADN en deux groupes (A et B) donnant six espèces du complexe *L. acidophilus* (*L. acidophilus* A1, *L. crispatus* A2, *L. amylovorus* A3, *L. gallinarum* A4, *L. gasseri* B1 et *L. johnsonii* B2) (Johnson *et al.*, 1980 ; Vasquez *et al.*, 2002).

Ainsi, la composition de la microflore vaginale a été revue par identification génomique et les espèces les plus couramment rencontrées sont :

- majoritairement *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners*,
- puis *L. vaginalis*, *L. ruminis*, *L. oris* et *L. Reuteri* (Antonio *et al.*, 1999; Falsen *et al.*, 1999; Song *et al.*, 1999; Vallor *et al.*, 2001; Tarnberg *et al.*, 2002).

Chez une femme saine, la flore vaginale est principalement constituée de différents lactobacilles exerçant un rôle protecteur de la muqueuse.

Différents mécanismes tels que la compétition pour des nutriments (activité arginine désaminase), la compétition pour des récepteurs (production d'exopolysaccharides et l'adhésion aux cellules épithéliales), la production de substances bactériostatiques et bactéricides (peroxyde d'hydrogène, acides organiques et bactériocines) ont été décrits pour leur effet protecteur (Ehrstrom *et al.*, 2010) ce qui conduit à l'établissement d'un environnement écologique équilibré particulier.

La diminution du pH intracellulaire et l'accumulation de la forme ionisée de l'acide organique au sein de la cellule bactérienne pathogène peut être responsable de sa destruction (Russell et Diez-Gonzalez, 1998).

Ainsi que, l'effet bactéricide du peroxyde d'hydrogène a été attribué à son effet oxydant sur la cellule bactérienne et à la destruction de la structure moléculaire de base des protéines cellulaires (Lindgren et Dobrogosz, 1990).

En outre, l'activité arginine désaminase diminuerait le niveau de l'arginine dans l'environnement vaginal ce qui peut contribuer à l'inhibition de la croissance du pathogène (Rousseau et *al.*, 2005).

La flore anaérobie pathogène de la vaginose bactérienne métabolise l'arginine en putrescine par la voie arginine décarboxylase. Cela conduit à une diminution du transport des antibiotiques, inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire, alcalinisation du milieu, synthèse de polyamines responsables de la mauvaise odeur caractéristique et destruction de l'intégrité de la muqueuse vaginale (Hillier, 1993 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

Par contre, les lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase métabolisent l'arginine et privent les bactéries anaérobies pathogènes associées à la vaginose de cet acide aminé ce qui inhibe leur croissance et leur prolifération (Flamuro et *al.*, 2001 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

D'autre part, cette voie de dégradation d'arginine chez les lactobacilles (voie ADI) génère de l'énergie *via* la production d'ATP. Elle produit également de l'ammoniac qui contribue à la survie des bactéries lactiques en augmentant le pH de la culture (Marquis et *al.*, 1987 ; Montel et Champomier, 1987 ; Manca de Nadra et *al.*, 1988). Cependant, il existe de grandes variations dans la répartition des enzymes de dégradation de l'arginine chez les bactéries lactiques, dont certaines souches ne possédant qu'une partie du système enzymatique (Liu et *al.*, 1995 ; Liu et Pilone, 1998 ; De Angelis et *al.*, 2002).

D'autres mécanismes ont été également prouvés tels que l'inhibition par la production de bactériocines, l'inhibition par la compétition directe avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales vaginales, l'inhibition par l'adhérence à la fibronectine humaine, l'inhibition par les biosurfactants, l'inhibition de l'expansion du pathogène et la stimulation des défenses immunitaires locales. (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Gagnon, 2007; Spurbeck et Arvidson, 2011; Unlu ; Donders, 2011 Bastani et *al.*, 2012 ; Bohbot et Lepargneur, 2012).

Dans certains cas, cet état d'équilibre peut être rompu, par des facteurs multiples (hormonaux, physiques, pathologiques ou bien iatrogènes) (Colarelli, 2010; Linhares et *al.*, 2010). Et par conséquent, une diminution de la concentration de lactobacilles, favorisant la surcroissance et la formation de biofilms des bactéries aérobies et aéro-anaérobies facultatives et des levures, est fréquemment signalée (McMillan et *al.*, 2011), conduisant à une infection vaginale.

La communauté scientifique a classé les vaginites bactériennes en «vaginite spécifique» et «vaginose bactérienne». Cependant, en 2002, Donders et ses collaborateurs ont proposé une troisième classe de «vaginite aérobie».

Deux types d'infections ont été étudiées (la vaginite aérobie et la candidose vulvo-vaginale) selon les limites des moyens disponibles d'isolement et de détection, tels que les conditions nécessaires pour manipuler les bactéries anaérobies strictes responsables de la vaginose

bactérienne (*Gardrenella*, *Mycobacterium*, *Provotella*, *Bacteroides*...); les conditions de culture des bactéries exigentes responsable de la gonococcie (*Neisseria gonorrhoeae*) et de l'infection à *Chlamydia trachomatis*.

Notre étude a porté sur la sélection de lactobacilles à propriétés probiotiques pour le traitement de ces deux types d'infections.

La vaginite aérobie est caractérisée par une rupture de la flore lactobacillaire accompagnée de signes inflammatoires et une prédominance d'une flore microbienne aérobie ou anaérobie facultative composée de bactéries entériques commensales ou pathogènes (Hay, 1994 ; Donders et *al.*, 2002; Donders et *al.*, 2011; Denis et *al.*, 2016). Cette vaginite aérobie est plus responsable qu'une vaginose bactérienne de complications lors de grossesse comme la rupture prématurée des membranes et l'accouchement prématuré dont la véritable prévalence est encore inconnue (Donders et *al.*, 2011).

La candidose vulvo-vaginale (VVC) est une infection du vagin et de la vulve qui est due à *Candida*. Environ 75% des femmes sexuellement actives ont contracté, au moins une infection à levures dans leur vie (Zhou et *al.*, 2009).

Le traitement de la vaginite aérobie (AV) chez les femmes enceintes et non enceintes est toujours inefficace. Le symptôme inflammatoire chez la plupart des patientes avec AV suggère que les antibiotiques peuvent ne pas être efficaces (Donders et *al.*, 2011). Le métronidazole et la clindamycine, des agents de choix pour le traitement de la vaginose bactérienne sont actifs contre les bactéries anaérobies, et ne sont pas indiqués pour la vaginite aérobie (Zarbo et *al.*, 2013).

La base du traitement conventionnel pour les VVC est un médicament antifongique y compris imidazole, nystatine, clotrimoxazole et fluconazole (Bansal et *al.*, 2014). Cependant, cela semble être inefficace dans la prévention des infections récurrentes (Ehrstrom et *al.*, 2010).

En effet, ces traitements ne permettent pas toujours à la flore vaginale de retrouver son équilibre initial, garant d'un écosystème vaginal sain ; or, le retour à une flore normale semble essentiel afin d'éviter les récives.

C'est pourquoi l'intérêt s'est porté, au cours de ces 20 dernières années, sur des traitements susceptibles de maintenir ou de restaurer une flore vaginale normale. Ainsi, l'utilisation de probiotiques à base de lactobacilles pourrait permettre de remplacer la flore vaginale pathogène par une flore saine.

Les lactobacilles probiotiques autochtones ont été considérés comme une supplémentation au traitement conventionnel des AV et des VVC car leur effet antimicrobien a été prouvé ainsi que leur capacité à éradiquer les biofilms des pathogènes (McMillan et *al.*, 2011).

L'activité inhibitrice est assurée par différentes substances antagonistes (acides organiques, peroxyde d'hydrogène et bactériocines) à la fois vis à vis d'une gamme de bactéries associées aux vaginites aérobies et des *Candida albicans* (Ehrstrom et al., 2010).

Selon une recherche bibliographique effectuée (Google Scholar et PubMed), notre étude est la première à caractériser des isolats locaux de lactobacilles et à déterminer leur interaction avec les agents pathogènes chez les femmes Algériennes ayant une vaginite aérobie ou bien une candidose vulvo-vaginale, dont l'hygiène périnéale locale est différente du monde occidental.

Une étude *via* des techniques de culture indépendante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) a été réalisée au cours de ce projet dans le but de déterminer la corrélation entre la diversité de bactéries lactiques (notamment des lactobacilles) et l'incidence de la vaginose bactérienne déterminée préalablement par le score de Nugent chez des femmes Algériennes enceintes.

Notre étude a été effectuée au niveau du :

Laboratoire de Biochimie et Microbiologie Appliquée LBMA (Département de Biochimie- Université d'Annaba- Algérie).

Laboratoire d'hygiène (Centre de santé de Jijel- Algérie).

Laboratoire de Micro-organismes et Biomolécules Actives LMBA (LR03ES03), (Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université d'El Manar, 2092 Tunis-Tunisie).

Laboratoire de Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (Département de Microbiologie, Génomique et Environnement, Université de Strasbourg UMR 7156 UNISTRA CNRS, France).

Dans cette intention notre projet de thèse s'est porté sur l'isolement et la sélection de souches de lactobacille locaux à propriétés probiotiques pour le traitement de la vaginite aérobie et la candidose vulvo-vaginale, ainsi que sur la caractérisation phénotypique et moléculaire des souches sélectionnées. La corrélation entre la diversité de bactéries lactiques vaginales et l'incidence de vaginose bactérienne chez des femmes enceintes a été également étudiée.

Ainsi ce manuscrit s'articule autour de trois parties, la première partie présentera une synthèse bibliographique sur l'écosystème vaginal et les facteurs de régulation, les infections vaginales et les facteurs de déséquilibre, les bactéries lactiques et les probiotiques avec leurs mécanismes d'action et leurs critères de sélection.

Puis dans la deuxième partie, nous détaillerons les outils méthodologiques utilisés (techniques phénotypiques, physiologiques, biochimiques et moléculaires) avant d'exposer dans la troisième partie les résultats de notre travail et leur discussion.

**ÉTUDE
BIBLIOGRAPHIQUE**

Chapitre 1
L'écosystème vaginal

1.1. La microflore vaginale de femmes saines

1.1.1. Composition de la flore vaginale normale

La première description de la flore vaginale fut faite en 1892 par Doderlein qu'il considérait comme constituant une population homogène de bactéries à Gram positif. Des études plus récentes ont fait état de l'hétérogénéité de la flore vaginale en mettant en évidence des coliformes, cocci à Gram positif et anaérobies strictes (Hickey *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Dans des conditions normales, un millilitre de sécrétions vaginales contient 10^7 UFC de lactobacilles (Aslim et Kilic, 2006 ; Kaewsrichan *et al.*, 2006) qui assurent l'équilibre écologique et l'auto-défense du vagin contre les infections (Kaewsrichan *et al.*, 2006; Linhares *et al.*, 2010 ; Abd Ulkareem, 2012).

Leur nombre est affecté par le taux de glycogène des cellules épithéliales, de même que par le pH et le taux des hormones sexuelles.

Le tableau 1 rassemble les différentes espèces bactériennes qui constituent la flore vaginale saine.

Tableau 1. Bactéries cultivables détectées dans le vagin de la femme saine (Janier, 2009).

Espèces bactériennes dont le portage est habituel (10^8 cel. /g de sécrétion)
<i>Lactobacillus sp.</i> : <i>L. gasseri</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. janssenii</i>
Corynébactéries
<i>Bifidobacterium sp.</i>
<i>Streptococcus viridans</i> alpha hémolytique non groupable
Espèces bactériennes dont le portage est fréquent (10^4 cel. /g de sécrétion)
<i>Staphylococcus coagulase + et -</i>
<i>Streptococcus B et D</i>
Entérobactéries : <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i>
<i>Gardnerella vaginalis</i>
Anaérobies : <i>Bacteroides-prevotella sp.</i> , <i>Clostridium sp.</i>
Mycoplasmes: <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>Ureaplasma urealyticum</i>
Espèces bactériennes dont le portage est peu fréquent ($<10^4$ cel. /g de sécrétion)
<i>Streptococcus A</i> , <i>Pneumococcus</i> , <i>Haemophilus influenzae</i>

1.1.2. Physiologie vaginale

Le vagin est un conduit qui s'étend de la vulve au col de l'utérus (figure 1).

Cette structure permet l'évacuation des menstruations et le passage du fœtus à l'accouchement ; elle permet également les rapports sexuels mais aussi l'entrée de microorganismes potentiellement pathogènes (Linhares et *al.*, 2010).

Il est constitué d'un épithélium stratifié en multicouches avec présence de glycogène dans la couche superficielle. La prolifération de cet épithélium et son rétrécissement évoluent en association avec le cycle menstruel (Mac Groarty, 1993).

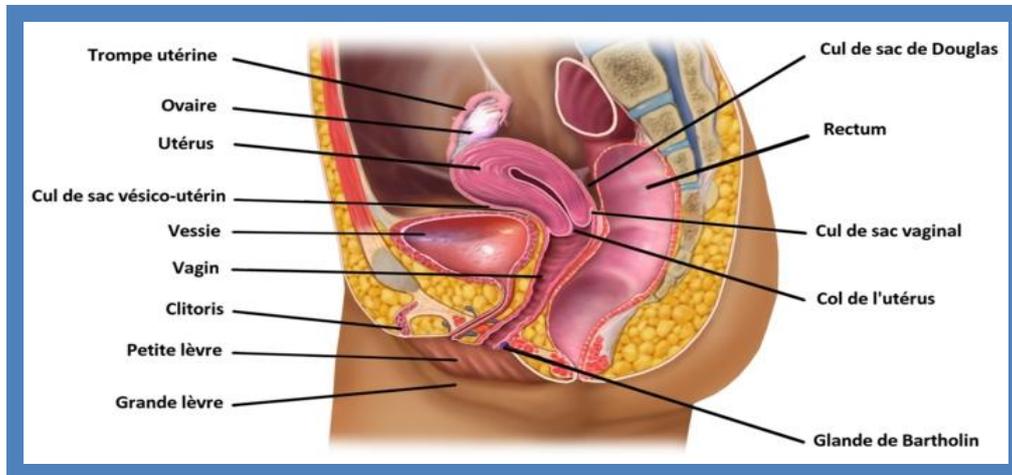


Figure 1 : Localisation du vagin au sein de l'appareil génital féminin (Web 1).

Dans le lumen, un fluide vaginal se forme à partir de transsudat de l'épithélium, de sécrétions de glandes voisines et d'exsudat de l'utérus. Il est composé de sels, de protéines, de glucides (dont le glycogène de 4 à 15 g/L), de composés organiques à faible masse molaire (dont l'acide lactique de 2 à 5 g/L) et de l'urée (Owen et Katz, 1999). Le dépôt de glycogène dans l'épithélium est stimulé lors de taux élevés d'oestrogènes pendant la période post-pubertaire et de pré-ménopause (Mac Groarty, 1993). Pour un vagin non excité sexuellement, le volume de fluide est de 1 à 4 millilitres (Valore et *al.*, 2002). Ainsi, grâce à cette richesse de l'environnement vaginal, l'acquisition d'une flore microbienne naturelle est favorisée.

1.1.3. Evolution de la microflore vaginale

Les lactobacilles colonisent le vagin du bébé fille dès le premier jour de sa vie car, lors de l'accouchement le bébé avale une certaine quantité de sécrétions présentes dans le vagin de sa mère (Hickey et *al.*, 2012).

Durant l'enfance, l'absence d'oestrogènes provoque une réduction du niveau de glycogène et une augmentation concomitante du pH (pH vaginal presque neutre) ce qui donne des conditions de vie inadaptées aux lactobacilles au sein de la flore vaginale (Aslim et Kilic, 2006). Cette dernière est dominée par différents assemblages de bactéries aérobies, anaérobies strictes et des entérobactéries (Neumann, 2010 ; Hickey et *al.*, 2012).

Au cours de la puberté, la production d'oestrogène aura lieu ce qui permet une colonisation progressive du vagin par une flore de femme adulte ; dominée par les lactobacilles (Silvester et Dicks, 2003 ; Neumann, 2010).

Durant la grossesse, on assiste à une chute parfois très importante des lactobacilles, contre laquelle il est important de lutter car la composition de la flore vaginale au moment de l'accouchement va déterminer celle de la première flore intestinale du nouveau-né (Ünlü et Donders, 2011).

A partir de la ménopause, le changement hormonal qui intervient met fin à la dominance des lactobacilles dans la flore vaginale, celle-ci redevient similaire à celle de l'enfance (Neumann, 2010 ; Kerchove, 2011).

1.1.4. Equilibre de la microflore

Le vagin est un carrefour reliant une zone stérile, l'utérus, à une zone septique, la peau avec l'anus pour voisin immédiat : une microflore d'origines intestinale et cutanée peut donc s'y installer (Berrebi et Ayoubi, 1999).

La composition de la microflore varie en fonction du cycle menstruel et de l'étape de la vie, principalement à cause de changements hormonaux et physiologiques. Les lactobacilles dominent lorsque les taux d'oestrogènes sont élevés (Mac Groarty, 1993). En général, chez une femme pendant la période post-pubertaire et pré-ménopause, 95 % des bactéries sont des lactobacilles constituant la microflore de Doderlein. Les 5 % restants sont constitués d'espèces anaérobies (mycoplasmes, peptocoques et bacteroides) et aérobie (streptocoques, corynéformes et entérobactéries) (Rousseau, 2004).

1.2. Les facteurs de régulation

Les différents mécanismes de régulation ont pour rôle de limiter la quantité et d'influer sur la qualité de la microflore.

L'équilibre de cette dernière est maintenu grâce au concours de facteurs exogènes et endogènes.

L'indice d'oxydoréduction (Redox) abaissé par la prolifération anormale des bactéries anaérobies, diminue la capacité phagocytaire des leucocytes et des macrophages de la muqueuse sous-jacente.

Il est probable que d'autres substances jouent un rôle complémentaire dans le maintien de cet équilibre en créant des synergies microbiennes de prédilection, et en excluant d'autres bactéries. Le mucus endocervical charrie de la lactoferine, du zinc, du lysozyme et du complément créant au cours des agressions exogènes un environnement idéal pour la phagocytose.

Les œstrogènes participent à cet équilibre en augmentant le flux sanguin et en maintenant la perception sensorielle périphérique, prévenant ainsi l'atrophie vaginale (Catalan et al., 2000).

1.3. Le rôle de la flore lactobacillaire

1.3.1. Inhibition de la croissance du pathogène

- **Inhibition par la production d'acide lactique**

Le pH normal du vagin est de l'ordre de 4. La principale molécule responsable de l'acidification du vagin est l'acide lactique. Il est synthétisé *via* la fermentation lactique du glycogène présent dans le fluide vaginal par les lactobacilles et par l'épithélium. D'autres acides organiques peuvent être produits par fermentation lactique comme l'acide acétique qui est dix fois moins concentré que l'acide lactique dans le milieu vaginal. Ces acides organiques ont été considérés parmi les principaux métabolites impliqués dans les activités antagonistes. Le mécanisme d'action dépend du pH et de leur constante acide de dissociation (pKa), qui détermine leur forme dissociée ou non dissociée à un pH donné.

La forme non dissociée de ces molécules lipophile, leur permet de diffuser à travers la membrane plasmique et de pénétrer la cellule, dans laquelle le pH plus basique, favorise la dissociation de ces acides.

Les protons accumulés dans le cytosol diminueront le pH de ce dernier et permettent ainsi d'inhiber les principales activités métaboliques de la glycolyse, en conséquence les flores acido-sensibles sont inhibées (Russell et Diez-Gonzalez, 1998 ; Mollapour et Piper, 2008 ; Blagojev *et al.*, 2012).

Le mode d'action est décrit dans la Figure 2.

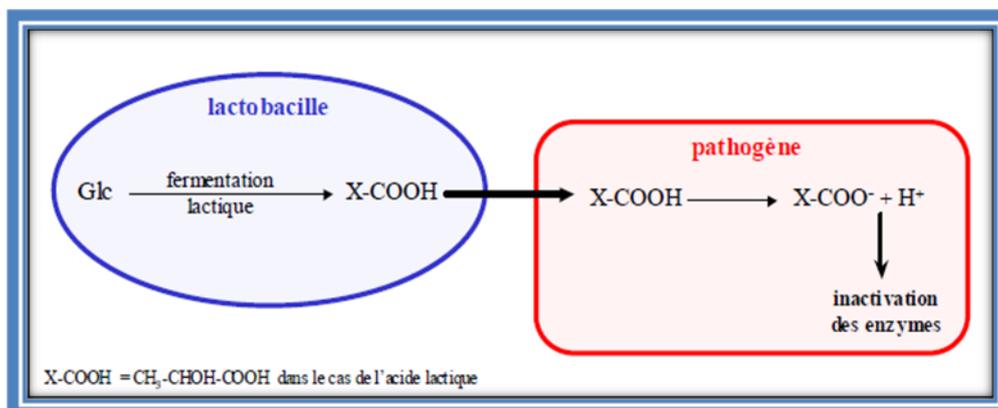


Figure 2 : Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

- **Inhibition par la production de peroxyde d'hydrogène**

Les propriétés bactéricides de nombreuses souches de lactobacilles vis-à-vis des bactéries pathogènes, responsables d'infections du système urogénital chez la femme, sont attribuées à la production du peroxyde d'hydrogène (Atassi et Servin, 2010). En effet, 96 % des femmes saines ont une flore à lactobacilles producteurs de peroxyde d'hydrogène (Eschenbach *et al.*, 1989).

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase, elles ne peuvent pas dégrader le peroxyde d'hydrogène, produit en croissance aérobie grâce à des flavoprotéines oxydases, à des NADH oxydases ou des alpha-glycéro-phosphate oxydases (Condon, 1987).

La toxicité du peroxyde d'hydrogène est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites OH (radical hydroxyle) et O₂⁻ (anion superoxyde) produits par des agents

réducteurs (ions halogénures du type Cl^-) et des enzymes peroxydases qui sont présentes dans le fluide vaginal. Les réactions sont décrites dans la figure 3.

Ces molécules peuvent agir sur les protéines (inactivation des enzymes cytoplasmiques), les lipides membranaires (augmentation de la perméabilité membranaire) et les acides nucléiques (induction de mutations de l'ADN). Par contre, l'autodestruction des lactobacilles est évitée pour ceux possédant une NADH peroxydase qui transforme le peroxyde d'hydrogène (Ocana et al., 1999b ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

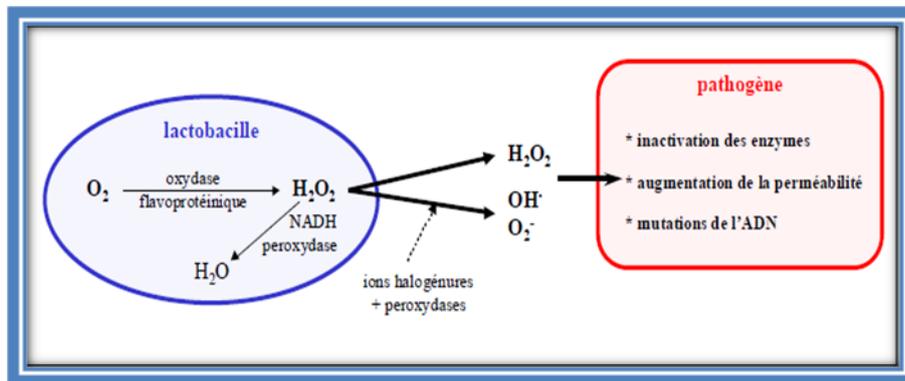


Figure 3 : Modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

- **Inhibition par la production de bactériocines**

D'autres molécules bactéricides peuvent être produites par les lactobacilles, notamment les bactériocines ou les substances proches des bactériocines appelées «*bacteriocin-like*».

Les bactériocines sont des peptides généralement d'une taille inférieure à 10 kDa, cationiques, amphiphiles, possédant un spectre d'activité bactéricide restreint (Hoesl et Altwein, 2005 ; Pascual et Barberis, 2011) et agissant en perméabilisant la membrane des souches cibles. Elles s'ancrent sur la paroi, forment des pores et induisent ainsi la fuite du contenu cytoplasmique et la lyse de la cellule (Ocana et Nader-Macias, 2004 ; Gagnon, 2007).

La figure 4 illustre l'effet des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes.

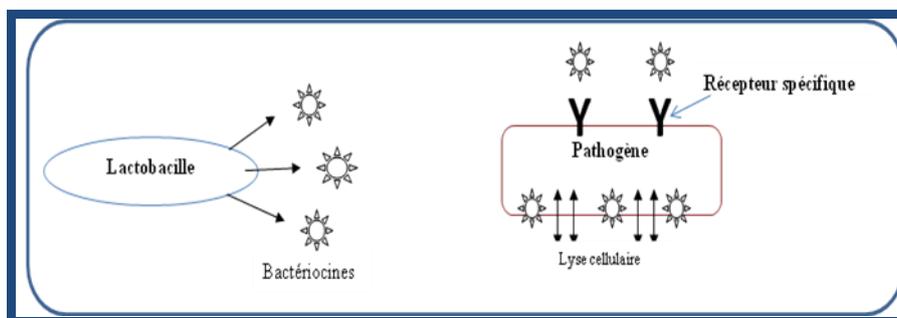


Figure 4 : Effet des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes.

Les «*bacteriocin-like*», synthétisées par les lactobacilles, sont des substances de nature protéique, à spectre d'action plus large que les bactériocines en inhibant une large gamme de

bactéries Gram positives et négatives ainsi que les champignons (Merk et *al.*, 2005 ; Kaewsrichan et *al.*, 2006 ; Unlu et Donders, 2011).

- **Inhibition par la production de l'enzyme arginine désaminase**

La production d'arginine désaminase par les lactobacilles est un autre mécanisme de défense très intéressant qui perturbe l'activité des bactéries pathogènes (figure 5).

Cette enzyme empêche l'action de l'arginine décarboxylase menant à la synthèse de polyamines caractéristiques de la vaginose bactérienne (spermine, spermidine, putrescine, cadaverine). Donc, elle évite la production de ces polyamines et en remplacement elle métabolise l'arginine en citrulline et ammoniac qui empêchent la prolifération des bactéries anaérobies pathogènes en les privant d'arginine. De plus, la citrulline et l'ammoniac sont source de carbone, d'azote et d'énergie pour les lactobacilles (Famularo et *al.*, 2001 ; Mastromarino et *al.*, 2002 ; Reid et Bocking, 2003 ; Colarelli, 2010).

Par ailleurs, l'utilisation de l'arginine influencerait la synthèse d'oxyde nitrique (médiateur de l'immunité) et minimiserait ainsi l'inflammation (Famularo et *al.*, 2001).

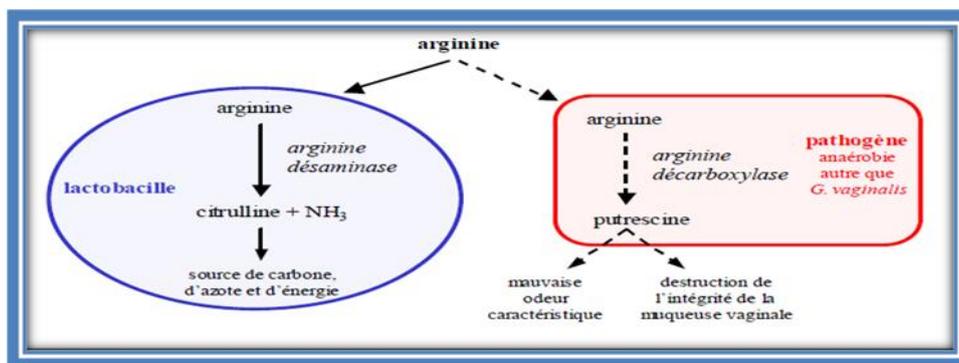


Figure 5 : Effet de lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase (Rousseau, 2004).

1.3.2. Mécanismes d'inhibition de l'adhésion du pathogène

L'adhésion aux cellules vaginales se fait soit de manière non spécifique par des interactions électrostatiques ou hydrophobes, soit de manière spécifique par des récepteurs impliquant des glycoprotéines ou des acides lipotéichoïques à la surface des bactéries et des glycolipides sur les cellules vaginales (Boris et *al.*, 1998).

- **Inhibition par la compétition directe avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales vaginales :**

Les lactobacilles peuvent empêcher les bactéries pathogènes d'adhérer aux récepteurs des cellules hôtes et protègent ainsi le tractus vaginal. Ils possèdent une plus grande affinité pour ces récepteurs que les bactéries pathogènes, leur permettant de s'y fixer durablement et même d'exclure les pathogènes qui y sont déjà fixés (figure 6) (Spurbeck et Arvidson, 2011).

Les sites récepteurs peuvent exister aussi bien au niveau des cellules épithéliales vaginales qu'au niveau du mucus recouvrant la surface cellulaire (Lepargneur et rousseau, 2002). Cela aboutit à la création d'un biofilm protégeant la muqueuse vaginale et empêchant par encombrement stérique l'adhésion des bactéries pathogènes (Spurbeck et Arvidson, 2011).

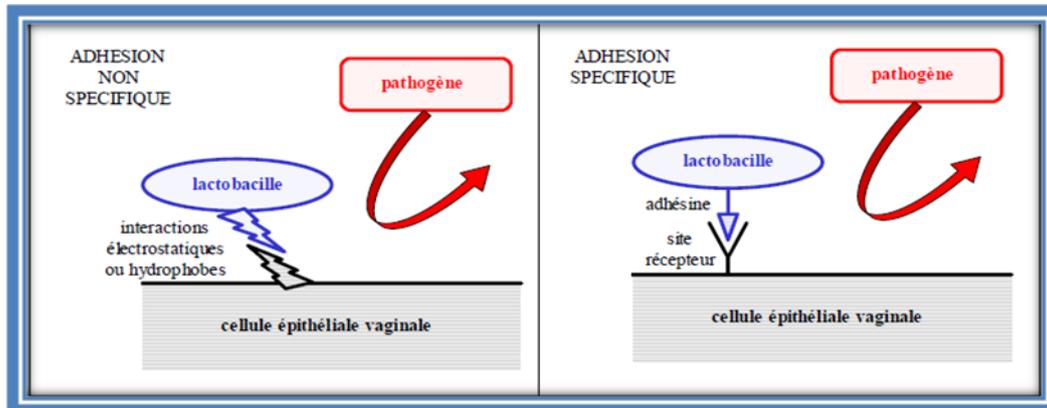


Figure 6 : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière du à l'adhésion des lactobacilles à l'épithélium vaginal (Rousseau, 2004).

- **Inhibition par adhérence à la fibronectine humaine**

La fibronectine est une glycoprotéine de masse molaire élevée, qui est présente sous forme soluble dans le fluide vaginal et qui forme à la surface de l'épithélium des polymères, structure de base pour l'attachement des microorganismes (Nagy *et al.*, 1992).

En effet, les lactobacilles se fixent sélectivement à cette molécule et empêchent ainsi la fixation des pathogènes (figure 7). Cette adhérence est d'autant plus forte quand le pH vaginal est acide (Lepargneur et Rousseau, 2002).

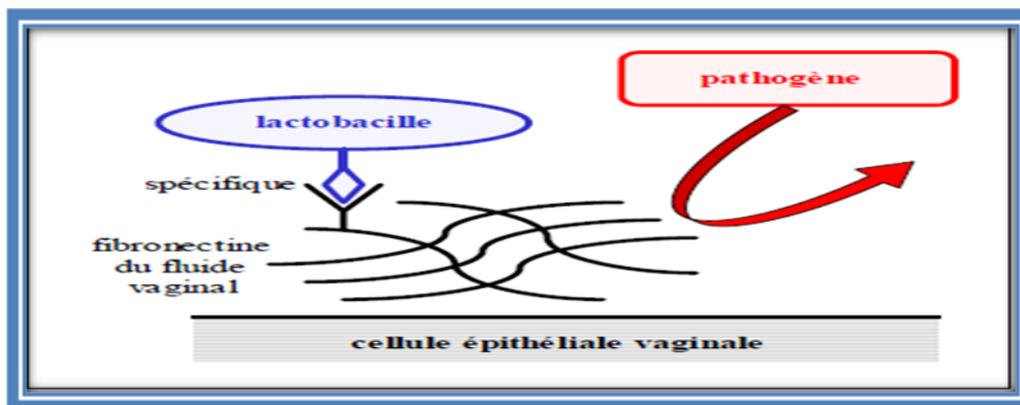


Figure 7 : Mécanismes d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par adhérence des lactobacilles à la fibronectine (Rousseau, 2004).

- **Inhibition par les biosurfactants**

Certains lactobacilles (exemple : *L. fermentum* et *L. acidophilus*) sont capables de synthétiser des molécules jouant un rôle de biosurfactant à la surface de la muqueuse et empêchant ainsi

l'adhésion de certains uropathogènes. Ces biosurfactants sont des molécules amphiphiles du type glycolipide ou lipopeptide, qui participent à la régulation du biofilm en agissant sur les tensions de surface et en renforçant les interactions entre la flore et la muqueuse vaginale. Le mécanisme est décrit dans la Figure 8. (Velraeds et *al.*, 1998 ; Velraeds et *al.*, 2000 ; Lepargneur et rousseau, 2002 ; Spurbeck et Arvidson, 2011; Bohbot et Lepargneur, 2012)

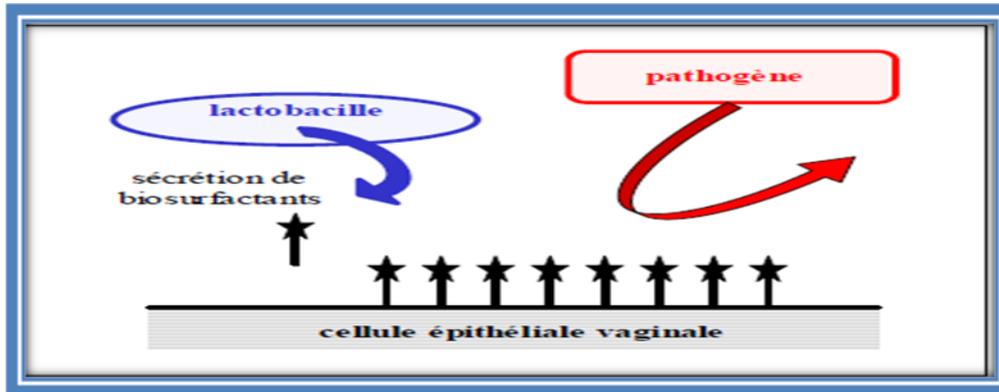


Figure 8 : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par un effet barrière des biosurfactants produits par les lactobacilles (Rousseau, 2004).

1.3.3 Inhibition de l'expansion du pathogène

Certains lactobacilles sont capables de s'auto-agrégérer entre eux mais peuvent aussi co-agrégérer avec des microorganismes pathogènes. lorsque la formation des agrégats pathogènes-lactobacilles aura lieu, la concentration des substances antimicrobiennes produite par ces derniers sera augmentée (Mastromarino et *al.*, 2002 ; Ocana et Nader-Macias, 2002 ; Marelli et *al.*, 2004 ; Barrons et Tassone, 2008 ; Martín et *al.*, 2009 ; Pascual et Barberis, 2011 ; Unlu et Donders, 2011 ; Saran et *al.*, 2012). Ils empêchent ainsi l'accès des pathogènes aux récepteurs des cellules épithéliales et leur adhérence à la muqueuse. Cela permet alors au fluide vaginale de les évacuer plus rapidement hors du tractus vaginale (Spurbeck et Arvidson, 2011). Les molécules impliquées dans l'agrégation sont soit localisées à la surface des cellules (acides lipotéichoïques, protéines ou glucides), soit sécrétées par celles-ci (peptides ou protéines solubles) (Boris et *al.*, 1997).

1.3.4. Stimulation des défenses immunitaires locales

Ce mécanisme porte sur l'interaction des lactobacilles avec le système immunitaire pour accroître la réponse immune de l'hôte contre des uropathogènes (Linhares et *al.*, 2010 ; Kerchove, 2011 ; Bastani et *al.*, 2012).

Parmi les effets observés, quelques auteurs soulignent une stimulation de l'immunité adaptative ; augmentation de la production des IgA, IgG, des cytokines anti-inflammatoires tels que les IL-10 et des peptides de défense tels que le β -défensine 2 (Reid et Bocking, 2003 ; Hoesl et Altwein, 2005 ; Pascual et Barberis, 2011), ou innée (macrophages,

basophiles, monocytes) par les probiotiques (Gagnon, 2007 ; Linhares et *al.*, 2010 ; Unlu et Donders, 2011).

Chaque mécanisme isolé n'a pas beaucoup de poids face aux pathogènes mais la synergie de ces différents mécanismes permet aux lactobacilles d'être de bons «défenseurs», en revanche, tous les lactobacilles vaginaux ne possèdent pas tous ces propriétés. Ce qui explique que certaines femmes possédant une flore normale, c'est-à-dire constitué d'un nombre suffisant de lactobacilles, peuvent quand même être sujettes aux infections vaginales (Bohbot, 2007).

Chapitre 2

La pathologie des voies vaginales basses

2.1. Le déséquilibre de la microflore vaginale

2.1.1. Facteurs de déséquilibre

Les lactobacilles dominent la microflore normale, mais ils coexistent avec une multitude d'autres espèces dont des pathogènes potentiels. Une rupture de cet équilibre peut être un facteur qui induit des infections (Maggi et *al.*, 2000).

Les causes de déséquilibre sont multiples :

- hormonales (troubles de la sécrétion glyco-génique lors d'une grossesse, alcalinisation du milieu vaginal lors des périodes de menstruation, la prise de contraceptifs oraux et de la ménopause)
- physiques (habitudes sexuelles, une mauvaise hygiène intime, utilisation de spermicides, de dispositifs intra-utérins et parfois de tampons, excès d'hygiène)
- pathologiques (patientes diabétiques ou immunodéficientes)
- iatrogènes (traitements aux antibiotiques à large spectre d'action, la prise d'ovules, l'utilisation d'antiseptiques et les interventions chirurgicales) (Barbes et Boris, 1999 ; Berrebi et Ayoubi, 1999 ; Silvester et Dicks, 2003 ; Falagas et *al.*, 2006 ; Colarelli, 2010 ; Linhares et *al.*, 2010).

Ce dysfonctionnement engendre deux sortes d'anomalies touchant les lactobacilles vaginaux :

- Diminution quantitative des lactobacilles
- Prédominance des lactobacilles dépourvus d'action efficace.

2.1.2. Mécanismes des infections

Les changements hormonaux qui jalonnent la vie des femmes provoquent des dégradations en cascade de l'écosystème fragile. La diminution des œstrogènes entraîne une raréfaction des lactobacilles et une modification du pH. En effet, le pH est un bon indicateur de l'équilibre ou du déséquilibre de la microflore : en absence d'infection, le pH est voisin de 4 sauf en période de menstruation où il augmente, dans les cas infectieux de vaginose bactérienne, le pH est supérieur à 4,5 et dans le cas infectieux de vaginite à levure, le pH est inférieur à 4. (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Rousseau, 2004).

2.2. Les infections vaginales

2.2.1. Les vaginites bactériennes aérobies «*Aerobic vaginitis*»

- **Définition**

La vaginite aérobie «*Aerobic vaginitis*» est due à un type de flore vaginale anormale nouvellement identifié et ne devrait pas être confondu avec la vaginose bactérienne. Elle est définie comme rupture de la flore lactobacillaire, accompagnée de signes inflammatoires et de

prédominance d'une flore microbienne aérobie ou anaérobie facultative composée de bactéries entériques commensales ou pathogènes (Donders et *al.*, 2011).

- **Les agents responsables**

Escherichia coli est l'une des bactéries les plus fréquemment isolée chez les femmes avec vaginite aérobie, mais aussi *Proteus* et *Enterobacter cloacae*.

Ces bactéries Gram négatif sont le plus souvent associées à des cocci Gram positif avec une forte prédominance des *Streptocoques agalactiae* et Entérocoques (Donders et *al.*, 2011).

D'autre part, Mumtaz et ces collaborateurs, ont constaté la présence de *Staphylococcus aureus* chez la majorité des femmes avec vaginite aérobie, suivi d'entérobactéries Gram-négatives (*E. coli*) puis de cocci Gram-positif (Mumtaz et *al.*, 2008).

Bien que la présence d'*E. coli* et *S. aureus* dans la vaginite aérobie peuvent induire les réponses immunitaires importantes de l'hôte rencontrées dans l'infection intra-utérine, la chorioamnionite ou la sepsie néonatale, ces bactéries peuvent également être présentes dans le vagin des femmes en bonne santé (Donders et *al.*, 2011).

- **L'aspect clinique**

La vaginite bactérienne «*Aerobic Vaginitis*» est caractérisée par une flore microbienne anormale accompagnée d'une réaction inflammatoire locale et une réponse immunitaire, ainsi qu'un écoulement contenant de nombreux polynucléaires. Ces manifestations cliniques peuvent s'accompagner ou non d'une odeur nauséabonde.

Chez la femme enceinte, la vaginite bactérienne est caractérisée par une production locale importante d'interleukine IL-1, IL-6 et IL-8, ainsi qu'un risque accru d'accouchement prématuré et d'infection chorioamniotite chez le fœtus (Donders et *al.*, 2011).

- **Le diagnostic**

- **Examen direct**

Le diagnostic de la vaginite aérobie (AV) repose sur cinq critères microscopiques (Donders, 1999 ; Donders et *al.*, 2002 ; Donders, 2007).

- ❖ Classement lactobacillaire (LBG):

- LBG I : principalement morphotypes lactobacillaire de taille variable, absence ou bien présence de très peu de bactéries autres que *Lactobacillus*.

- LBG II : constitue un groupe intermédiaire, dans lequel les lactobacilles sont mélangés avec d'autres bactéries. LBG IIa est une perturbation moins sévère, avec les lactobacilles encore plus nombreux que la flore anormale, et LBG IIb est une variété plus sévère, avec d'autres types de flores plus nombreuses que les lactobacilles. Dans le système de notation de la vaginite aérobie, LBG I et LBG IIa sont considérés comme normaux (score 0) et LBG IIb scores 1 point.

- LBG III est caractérisé par le remplacement complet des lactobacilles par d'autres morphotypes bactériens, tels que les cocci et les coccobacilles. Ils sont considérés comme anormaux (score 2 points) (Donders, 1999 ; Donders et *al.*, 2002).

❖ Nombre proportionnel de leucocytes:

Le nombre de leucocytes est évalué dans un champ de haute puissance à grossissement (X400). S'il y a plus de dix leucocytes présentes par champ, le nombre moyen entourant chaque cellule épithéliale est compté (score 1 point). S'il y a une moyenne de plus de dix leucocytes par cellule épithéliale, ceci signifie un score de 2 points (Donders et *al.*, 2011).

❖ Présence de leucocytes toxiques :

Le leucocyte toxique terme décrit les leucocytes arrondis contenant des lysosomes. Si la proportion des leucocytes toxiques par rapport au nombre total de leucocytes est <50%, 1 point est donné ; s'il y a plus de 50%, soit 2 points sont donnés (Donders et *al.*, 2011).

❖ Type de bactéries présentes:

Un score de 1 est donné si les morphotypes lactobacillaires sont présents avec de petits bacilles autres que les lactobacilles, comme les coliformes et *Klebsiella*. Un score de 2 est donné en cas de remplacement total du morphotype lactobacillaire par des cocci uniques ou en chaînettes (Donders et *al.*, 2011).

❖ Présence de cellules épithéliales parabasales :

Les cellules épithéliales superficielles et intermédiaires sont normaux (score 0), mais la présence de cellules épithéliales parabasales (petite cellule avec un grand noyau et le cytoplasme foncé arrondi) sont anormaux. Si on observe entre 1 et 10% des épithéliocytes sont des cellules parabasales 1 point est donné, mais si plus de 10% sont des cellules parabasales, 2 points sont donnés. Les cellules parabasales sont uniquement rencontrées dans les formes modérées ou graves de vaginite aérobie (vaginite inflammatoire) (Sobel, 1994 ; Donders et *al.*, 2002 ; Newbern et *al.*, 2002).

Pour chacun de ces paramètres un score est donné qui varie de 0 à 2 points.

La somme des points établit le score AV, avec un score maximum de 10. Comme pour le score de Nugent pour le classement des BV, le score AV peut être flore normale (score ≤ 3) ou légère (score entre 3 et 4), modérée (score entre 5 et 6) ou AV sévère (score entre 6 et 10) (Zarbo et *al.*, 2013).

Cependant, à l'exception de ces paramètres, les éléments suivants doivent être présents: les sécrétions vaginales jaunâtres, pH vaginal supérieur à 5 (Donders et *al.*, 2002 ; Donders, 2007 ; Tempera et *al.*, 2006).

Les autres caractéristiques sont la dyspareunie, des démangeaisons vulvovaginales, l'érosion du col avec l'isolement des micro-organismes qui ne sont pas dans les critères proposés à l'origine (Tempera et *al.*, 2006).

➤ **Culture bactérienne**

Le cas échéant, nécessite un prélèvement vaginal du fornix postérieur ; la culture est réalisée sur différents milieux, les résultats de culture bactérienne confirment la prédominance d'un ou plusieurs types de bactéries issues de la flore digestive ou oro-pharyngée : *E. coli*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* (Zhou et *al.*, 2007 ; Yamamoto et *al.*, 2009).

• **Le traitement**

➤ **Antibiotiques**

La meilleure approche pour traiter une vaginite aérobie chez les femmes enceintes et non enceintes est encore inconnue. La composante inflammatoire, y compris les leucocytes et les

cellules parabasales, de la plupart de patientes atteintes de vaginite aérobie suggère que les antibiotiques peuvent ne pas être suffisants.

La thérapie de choix pour la vaginite aérobie doit assurer deux objectifs: l'éradication de l'agent pathogène au moyen d'un traitement antibiotique et le rétablissement de l'homéostasie du biotope vaginal pour prévenir les conditions qui ont favorisé l'apparition de l'infection (McDonald *et al.*, 1997 ; McDonald *et al.*, 2007).

Tempera et ces collaborateurs ont testé localement la kanamycine chez des femmes non enceintes avec vaginite aérobie et ont effectué une analyse détaillée des résultats de la culture ou ils ont conclu que ce traitement topique peut être une approche efficace pour le traitement des vaginites à entérobactéries. Cependant, le test de cet antibiotique pendant la grossesse n'a pas été réalisé (Tempera *et al.*, 2004 ; Tempera *et al.*, 2006).

Une autre classe d'antibiotiques (quinolones) a été utilisée pour la vaginite aérobie (Furnieri *et al.*, 2008).

Le métronidazole et la clindamycine, actif contre les bactéries anaérobies et certains protozoaires, donc appropriés pour la vaginose bactérienne, ne sont pas indiqués pour la vaginite aérobie (Zarbo *et al.*, 2013).

➤ Antiseptiques

Seules des études sporadiques, basés sur l'utilisation de médicaments antiseptiques tel que chlorhexidine, povidone iode ou chloramine ont été effectués comme une mesure préventive pour prévenir les complications infectieuses périnatales et maternelles pendant la grossesse. Ces derniers sont généralement sans aucun succès (Rouse *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 1998) d'où cette stratégie thérapeutique a été largement abandonnée pendant la grossesse (Donders *et al.*, 2011).

2.2.2. Les mycoses vaginales

• Définition

La vulvo-vaginite mycosique est une infection opportuniste due à une levure du genre *Candida*. Toutes les levures sont considérées comme des agents opportunistes: ce sont des microorganismes pratiquement dépourvus de virulence mais qui peuvent devenir pathogènes lorsque le système immunitaire est affaibli (Naglik *et al.*, 2011). Les vaginites à levures les plus fréquentes sont dues à *Candida albicans* (Iannitti et Palmieri, 2010), c'est une pathologie infectieuse affectant un grand nombre de femmes en période d'activité génitale.

• Les agents responsables

➤ *Candida albicans*

C. albicans est un hôte commensal des muqueuses digestives et génitales, il n'est retrouvé que rarement sur la peau saine (Anofel, 2010). Cette espèce produit de vrais filaments mycéliens à la différence des espèces de *Candida* non-*albicans* qui produisent du pseudo-mycélium. Elle est présente chez 5 à 10% des femmes saines, chez 18 à 23% des femmes ayant des leucorrhées et chez plus de 30% des femmes enceintes (Catalan *et al.*, 2000).

Cette espèce est retrouvée dans 80% des cas de candidose vulvo-vaginale. Cela s'explique par le fait qu'elle possède, au niveau de sa paroi, des ligands spécifiques des récepteurs situés au niveau des cellules épithéliales vaginales. La liaison à ces récepteurs favorise alors l'expression de ses facteurs de virulence, sa germination et le passage de l'état saprophyte, sous forme de blastopores, à l'état pathogène, sous forme de filaments mycéliens (Anane et *al.*, 2010).

➤ **Candida non-albicans**

Les espèces de *Candida non-albicans* sont souvent retrouvées dans les cas de candidoses récidivantes. *C. glabrata* serait responsable de 6 à 29% des cas de récidives. L'implication importante des espèces de *Candida non-albicans* pourrait être expliquée par l'utilisation répétée et prolongé des antifongiques qui entraînent une pression sélective et favorisent l'émergence de ces espèces résistantes (Amouri et *al.*, 2010).

❖ **Candida glabrata**

C'est la seconde espèce responsable de la mycose vulvo-vaginale, à l'origine de 5 à 15% des cas. Cette espèce est plus fréquemment rencontrée chez les patientes diabétiques et souvent résistante aux thérapeutiques habituelles (Anane et *al.*, 2010).

❖ **Autres espèces**

Autres espèces sont responsable d'une très faible minorité des cas, il s'agit de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* et *C. krusei* (Anane et *al.*, 2010).

• **L'aspect clinique**

La candidose vaginale dans sa forme classique se présente essentiellement comme une vulvo-vaginite associant :

- un prurit vulvaire et vaginal
- une odeur de levure de pain
- un érythème muqueux
- une sécrétion vaginale épaisse plus ou moins caillibottée, adhérent à la muqueuse en paquets grumeleux
- la présence de levures et de filaments mycéliens visibles au microscope
- un pH vaginal inférieur à 4 (Sobel, 1997).

Il n'est pas rare d'observer dans les formes suraiguës des ulcérations associées à une sensation de brûlure insupportable (Catalan et *al.*, 2000).

• **Le diagnostic**

En cas de vulvo-vaginite aiguë, sans contexte de récurrence, l'examen clinique permet à lui seul de faire le diagnostic. Dans le cas de candidose vulvo-vaginale récidivante, il est nécessaire de réaliser un prélèvement vaginal qui permettra d'identifier l'agent pathogène responsable de la symptomatologie et de mettre en place une stratégie thérapeutique optimale (Bohbot, 2007).

➤ **Diagnostic clinique**

L'examen clinique permet d'observer en général un œdème et une crevasse de la vulve, une muqueuse vaginale inflammatoire recouverte de pseudomembranes blanches ayant l'aspect de «lait caillé» (Anofel, 2010).

➤ Diagnostic biologique

Un prélèvement vaginal est réalisé à l'aide d'un écouvillon au niveau des parois vaginales et du cul de sac ensuite analysé selon les examens mycologiques suivants :

- la mesure du pH vaginal : un pH normal varie entre 4 et 4,5 (Anofel, 2010).
- l'examen direct est réalisé avec du sérum physiologique ou une solution KOH 10 % qui est plus sensible (65 à 85 %) dans la détection des blastospores levures ou des mycéliums. La coloration de Gram ainsi que celle au méthylrosaniline chlorure sont deux méthodes efficaces ayant une sensibilité et spécificité respective de 65-100 % et 88,3-96,1 % (Anofel, 2010).
- la culture de la levure est réalisée sur une gélose au sang ou sur un milieu de Sabouraud glucosé auquel on additionne des antibiotiques (chloramphénicol et / ou gentamicine), ce qui permet d'inhiber la croissance des bactéries. Après 24-48 heures d'incubation à 37°C, on observe la formation de colonies de quelques millimètres de diamètre, de couleur claire, blanche, crème ou beige, d'aspect crémeux (Anofel, 2010).
- l'identification de *Candida albicans* est réalisée selon différents tests :
 - ❖ Le test de Blastèse ou test de filamentation en sérum à 37°C, qui permet de rechercher des tubes germinatifs caractéristiques de *Candida albicans* (Anofel et al., 2010)
 - ❖ Le test de Chlamydosporulation sur un milieu pauvre RAT (Riz-Agar-Tween), où l'on recherche la présence de chlamydozoures (spores de résistance) associées aux blastospores et au pseudomycélium (Anofel et al., 2010).
 - ❖ La recherche de la formation de pseudomycélium ou de mycélium vrai sur un milieu pauvre RAT ou PCB (Pomme de terre-Carotte-Bile) qui se forme après 24-48 heures d'incubation (Anofel et al., 2010).
 - ❖ L'étude de l'assimilation des sucres réalisée à l'aide de galeries prêtes à l'emploi (Amouri et al., 2010).
- L'antifongogramme permet d'identifier les antifongiques auxquels est sensible la levure isolée (Anofel et al., 2010).

• Le traitement

Le traitement des mycoses superficielles à *Candida albicans* relève aujourd'hui essentiellement des dérivés azotés (Butoconazole, Clotrimazole, Econazole, Fenticonazole, Miconazole, Nystatine, Sertaconazole, Ticonazole, Terconazole). Ils sont en général bien supportés et ils peuvent être administrés en comprimés *per os* et/ou en topiques (crèmes, ovules, comprimés gynécologiques, gels).

Ils agissent en bloquant la synthèse de l'Ergostérol (l'équivalent fongique du cholestérol humain) produisant ainsi des lésions dans la paroi du champignon.

L'effet fongistatique devient fongicide à doses élevées. Cette inhibition se fait par le biais du cytochrome oxydase P450 avec laquelle ces produits se lient.

Les derniers-nés, triazolés (Itraconazole, Fluconazole, Perconazole et Vibunazole) ont des demi-vies plus élevées que les imidazolés (Ketoconazole et précédents). De plus, le Fluconazole est un excellent médicament pour les mycoses systémiques. Il peut être donné d'ailleurs par voie intraveineuse (Catalan et *al.*, 2000 ; Babula et *al.*, 2003 ; Cutler et *al.*, 2007 ; Amouri et *al.*, 2010 ; Benchellal et *al.*, 2011).

Le traitement par les polyènes (Nystatine) est souvent bien toléré mais les taux de guérison à long terme et même à court terme sont très inférieurs à ceux des Imidazolés (Babula et *al.*, 2003). Par contre, son association aux imidazolés topiques, semble donner de meilleurs résultats dans les récurrences, peut-être en agissant sur le réservoir digestif (Catalan et *al.*, 2000).

2.2.3. Autres pathologies

2.2.3.1. La gonococcie et les infections à *Neisseria*

Cette infection due au gonocoque (*Neisseria gonorrhoeae*). Sa prévalence est la plus élevée dans les groupes sexuellement actifs entre 20 et 25 ans.

La transmission est favorisée, par le contact vaginal, anal ou pharyngé non protégés car la bactérie responsable trouve dans les régions chaudes et humides, un environnement favorable à sa multiplication. L'infection débute généralement au niveau du col d'où elle peut s'étendre vers les régions voisines (urètre, vagin, anus), les organes annexes (endomètre, trompes de Fallope, péritoine) provoquant une inflammation pelvienne source d'obturation tubaire et de stérilité, lorsqu'elle est bilatérale.

Certaines souches particulières de Gonocoques ont une tendance marquée à disséminer dans l'organisme et provoquer des arthrites voire une septicémie qui justifie l'hospitalisation (Masi et *al.*, 1981).

Les signes cliniques évocateurs d'une infection due au gonocoque apparaissent entre 2 et 10 jours après un contact sexuel avec un partenaire infecté. La femme ressent une douleur, ou une sensation de brûlure à la miction ; des leucorrhées purulentes, l'atteinte de l'appareil génital inférieur est complète, associant urétrite, vulvo-vaginite, cervicite; il existe un œdème vulvaire important, avec infection des glandes de Skène, et parfois bartholinite associée. L'apparition de douleurs du bas-ventre, de méno-métrorragies, voire des vomissements et/ou de fièvre qui évoquent essentiellement une progression ascendante de l'infection.

Le diagnostic se fait au laboratoire par la mise en évidence des gonocoques à l'examen direct dans les prélèvements, complété par une culture et un antibiogramme.

La culture du gonocoque est délicate et nécessite l'ensemencement immédiat du prélèvement sur un milieu enrichi avec du sang cuit ou des vitamines et rendu sélectif par addition d'antibiotiques. La culture est incubée en atmosphère enrichie avec 5 à 10% de gaz

carbonique (jarre, sachets générateurs d'anhydride carbonique, cloche, bougie, incubateur à CO₂) (Catalan et *al.*, 2000).

La gonococcie se traite en première intention par la ceftriaxone (500 mg) en une seule injection intramusculaire ou intraveineuse. En cas de contre-indication aux bêta-lactamines, la spectinomycine à la posologie de 2 g peut être préconisé en monodose par voie intramusculaire, et en cas de refus ou d'impossibilité d'administrer un traitement par voie parentérale la céfixime à la posologie de 400 mg peut être prescrit par voie orale en monoprise (AFSSAPS, 2008).

2.2.3.2. Les infections à *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis représente la principale cause d'infection sexuellement transmissible bactérienne. La forme virulente de la chlamydia est le corps élémentaire. Celui-ci est adapté à la survie dans le milieu extérieur, sans possibilité de multiplication mais avec l'aptitude de pénétrer par phagocytose à l'intérieur de la cellule-hôte.

Dans la vacuole de phagocytose, le corps élémentaire se transforme en 6 à 8 heures en corps réticulé, élément plus grand dont l'ADN est réticulé, qui est responsable de la multiplication des *Chlamydia*. La cellule-hôte va ensuite éclater et libérer les corps élémentaires qui, à leur tour, vont recommencer un nouveau cycle de multiplication intracellulaire. L'atteinte des voies génitales hautes (utérus et trompes de Fallope) se manifeste sous forme d'inflammations pelviennes aiguës ou chroniques (salpingites) qui peut se compliquer de douleurs chroniques, de grossesse extra-utérine et d'infertilité tubaire.

Chlamydia trachomatis est la cause principale des stérilités tubaires (anomalies des trompes) dans les pays industrialisés.

Les personnes les plus touchées par *Chlamydia trachomatis* sont les femmes de 18-24 ans.

L'isolement de la bactérie par culture cellulaire est la technique la plus spécifique. Cependant, elle reste très spécialisée, longue et coûteuse. Des tests rapides de diagnostic direct comme l'immunofluorescence directe, les techniques immuno-enzymatiques et apparentées ont été développés et appliqués à la détection des antigènes de la bactérie. Les techniques de détection des acides nucléiques et en particulier les techniques d'amplification génique apportent une contribution nouvelle au diagnostic de ces infections.

La sérologie est un témoin plus tardif de l'infection et se positive significativement lorsque les voies génitales hautes sont contaminées.

Le traitement des infections dues à *Chlamydia trachomatis* nécessite des antibiotiques à diffusion intracellulaire : tétracyclines de synthèse, fluoroquinolones ou macrolides. La durée du traitement est fonction du site et de l'ancienneté de l'infection (Stephens, 1994 ; Hackstadt et *al.*, 1995; Hamdad et *al.*, 2004).

2.2.3.3. Les vaginites à *Trichomonas vaginalis*

C'est une infection sexuellement transmissible (IST), bénigne, cosmopolite et fréquente, due à *Trichomonas vaginalis*, protozoaire flagellé, parasite des voies uro-génitales.

Il s'agit d'une parasitose très fréquente puisque l'OMS estime que 170 millions de personnes sont atteintes chaque année dans le monde dont 5 millions uniquement aux Etats-Unis.

On peut noter la fréquente coexistence *Trichomonas/ Candida albicans*, mais également l'association avec d'autres microorganismes : gonocoque, Chlamydiae, mycoplasmes, VIH (Virus d'Immunodéficience Humaine).

Les manifestations cliniques sont importantes chez la femme. La forme classique de la vulvo-vaginite aigüe à *T. vaginalis* (25 % des vulvo-vaginites) associée à des leucorrhées spumeuses, aérées, jaune-vertes, (parfois blanchâtres) continues et nauséabondes, un prurit vulvaire avec sensation de brûlure, des dyspareunies et parfois une cystite (dysurie, pollakiurie, brûlures mictionnelles).

Le diagnostic se fait par examen direct d'un prélèvement frais (la glaire cervicale). Ce dernier doit être effectué le plus rapidement possible dans de l'eau physiologique à 37°C. Cet examen permet de repérer les parasites mobiles, réfringents de forme ovale ou arrondie. On peut également réaliser un frottis séché et fixé par alcool-éther puis coloré au Giemsa (les parasites apparaissent avec un cytoplasme bleu et un noyau rouge). Pour augmenter la sensibilité du diagnostic, la mise en culture est possible à 37°C (milieu de Roiron), le résultat demande un délai de 24 à 48 heures. Une PCR, sensible, est également disponible.

Le traitement repose sur la prescription de nitro-imidazolés (métronidazole, tinidazole, secnidazole) et dans tous les cas le traitement simultané du (ou des) partenaire(s) est indispensable (Fourmaux et Bebear, 1997).

2.2.3.4. Les vaginoses bactériennes

La vaginose bactérienne est une infection polymicrobienne qui est due à une association de *Gardnerella vaginalis* avec le plus souvent des bacilles Gram négatif anaérobie (*Prevotella* sp. et *Bacteroides* sp.), des coques Gram positif anaérobie (*Peptostreptococcus* sp.), des mycoplasmes (*Mycoplasma* sp. et *Ureaplasma* sp.) et parfois des bacilles, Gram variable, anaérobies (*Mobiluncus* sp.) (Pybus et Onderdonk, 1999).

Cette infection est l'une des pathologies infectieuses génitales les plus fréquentes. En chiffre, la vaginose c'est 30% des femmes sexuellement actives qui en souffrent et 46% des infections vaginales chez les femmes en âge de procréer responsable de prématurité, d'avortement spontané et favorise l'acquisition d'infections sexuellement transmissible (Reid et Bruce, 2003 ; Dols et Boon, 2012; Bohbot et Lepargneur, 2012).

Elle désigne un syndrome caractérisé par un déséquilibre qualitatif et quantitatif de la flore microbienne vaginale avec la quasi disparition des lactobacilles (le pH vaginal sera supérieur à 4,5) (Lepargneur, 2009; Gil *et al.*, 2010; Dols et Boon, 2012; Udayalaxmi *et al.*, 2012).

la vaginose bactérienne est caractérisée par:

- une leucorrhée transparente, grisâtre, homogène et laiteuse
- une odeur offensive de poisson avarié due à un relargage d'amines volatiles
- un pH vaginal supérieur à 4,5

- la présence de cellules épithéliales vaginales ponctuées de bactéries « *clue cells*» (Famularo *et al.*, 2001).

Le diagnostic bactériologique repose sur la réalisation du Score de Nugent, Cette exploration microscopique est actuellement plus sensible et spécifique que le diagnostic clinique des vaginoses bactériennes. En explorant par examen direct, après coloration de Gram, des sécrétions vaginales prélevées au niveau du cul-de-sac postérieur ou latéral du vagin on peut établir le score de Nugent qui divise la flore vaginale en trois groupes :

- Groupe 1 : flore normale, à prédominance de lactobacilles (Score compris entre 0 et 3)
- Groupe 2 : flore intermédiaire, avec des lactobacilles peu abondantes et associées à d'autres morphotypes bactériens peu différenciés en petites quantités (Score compris entre 4 et 6).
- Groupe 3 : flore évocatrice d'une vaginose bactérienne. Les lactobacilles ont disparu, au profit d'une flore anaérobie abondante et polymorphe (Score compris entre 7 et 10). (Nugent *et al.*, 1991).

Les schémas thérapeutiques recommandés pour la vaginose bactérienne sont le métronidazole (par voie orale ou vaginale) ou la clindamycine (par voie vaginale) (ACOG, 2006). Bien que ces options thérapeutiques produisent un taux de guérison acceptable immédiatement après le traitement, les récurrences sont fréquentes dans les semaines ou les mois qui suivent. Parmi les effets indésirables, on note une résistance au traitement fréquent (Bradshaw, 2006 ; Oduyebo, 2009). Selon les estimations, les taux de récurrence atteignent jusqu'à 30% en 3 mois et jusqu'à 80% en 9 mois. Ils nécessitent l'administration répétée d'antibiotiques. Cette exposition répétée aux antibiotiques majore le risque d'émergence de souches résistantes, l'altération du microbiote, et une persistance potentielle des pathogènes associés à la vaginose bactérienne (Sobel, 2006 ; Senok, 2009).

Chapitre 3

Bactéries lactiques et probiotiques

3.1. Bactéries lactiques

3.1.1. Caractères généraux

Le groupe de bactéries lactiques désigne un ensemble de bactéries à Gram positif, catalase négative, non sporulentes, avec un type respiratoire aéro-anaérobie facultative ou micro-aérophile, immobiles dont le trait commun est leur aptitude à produire de l'acide lactique suite à la fermentation des glucides (Stiles et Holzapfel, 1997).

Deux voies de fermentation peuvent être distinguées :

- La Voie d'Embden-Meyerhof : homofermentation, dont laquelle l'acide lactique est le principal ou le seul produit du métabolisme du glucose.
- La Voie de Dickens-Horecker : hétérofermentation, conduisant à l'acide lactique en mélange avec d'autres sous produits comme le CO₂, acide acétique, éthanol,... (Larpen et Larpen, 1997).

Les bactéries lactiques sont ubiquistes et on les trouve dans différentes niches écologiques riches en nutriments comme le lait et les produits laitiers, les végétaux, la viande, le poisson et dans les muqueuses humaines et animales (Carina Audistio et *al.*, 2011 ; Salimen et *al.*, 2004).

Elles ont un métabolisme chimio-organotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques.

Les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance : acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques, vitamine B, des acides gras et les sels (Roissart et Luquet, 1994).

3.1.2. Taxonomie

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques.

Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique constitue aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (Holzapfel et *al.*, 2001; Gevers, 2002; Temmerman, 2003; Temmerman *et al.*, 2004).

Les méthodes génotypiques les plus utilisés sont le séquençage de l'ADNr, le ribotypage, Le polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (Amplified Fragment Length Polymorphism / AFLP), l'électrophorèse en champ pulsé (Pulsed Field Gel Electrophoresis / PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré.

Douze genres bactériens appartiennent au groupe de bactéries lactiques:

Aerococcus, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* et *Vagococcus*, *Oenococcus* et *Weissella* (Pawlowska et *al.*, 2012).

Le genre *Lactobacillus* est quantitativement le plus important des genres du groupe des bactéries lactiques dont sa position phylogénétique est détaillée ci-dessous (Garrity *et al.*, 2004).

Règne : *Bacteria*
Division : *Firmicutes*
Classe : *Bacilli*
Ordre : *Lactobacillales*
Famille : *Lactobacillaceae*
Genre : *Lactobacillus*

3.1.3. Applications

3.1.3.1. Applications industrielles

Les bactéries lactiques interviennent dans de nombreuses transformations du lait (crème maturée, laits fermentés, Yaourts, fromages frais et affinés), mais également dans la fabrication des salaisons, la fermentation des végétaux (choucroute et ensilage), et levains en boulangerie. Les industries laitières représentent toutefois le principal secteur d'application des bactéries lactiques. Dans la fabrication fromagère, elles jouent un rôle primordial dans les premières étapes de la transformation du lait, mais elles interviennent aussi, dans la phase d'affinage (Pfeiler et Klaenhammer 2007).

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'alpha-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyle, l'acétoïne et 2,3-butanediol, l'éthanol, l'acétate, le formiate, ...etc.) principalement à partir du lactose, du citrate, des acides aminés et des matières grasses. Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne (Bourgeois et Larpent, 1996).

Certaines souches de bactéries lactiques ont la capacité de synthétiser et d'excréter, au cours de leur croissance, des exopolysaccharides (EPS), qui permettent d'améliorer la texture et la viscosité du produit fini (Dupont, 1998). En général, la présence de polysaccharides dans des produits fermentés, tels les yaourts, permet d'augmenter l'homogénéité du produit et rend sa présentation plus agréable (Desmazaud, 1983).

3.1.3.2. Conservation des aliments

Les bactéries lactiques jouent un rôle essentielle dans la conservation des produits alimentaires, elles sont capables de produire une variété de substances inhibitrices (acides organiques, peroxyde d'hydrogène et bactériocines) qui ont un effet important sur la flore indésirable ou pathogène (Piard et Desmazaud, 1991).

3.1.3.3. Application probiotique

De nombreuses applications des bactéries lactiques et notamment des lactobacilles dans le domaine des probiotiques sont proposées: traitement de l'intolérance au lactose, prévention et réduction de la durée des diarrhées à rotavirus chez l'enfant, diminution du cholestérol, régulation du transit intestinal, rééquilibrage de la flore intestinale après une antibiothérapie ou une infection par un pathogène et traitements des maladies inflammatoires du tube digestif (Stiles et Holzapfel, 1997 ; Tailliez, 2004). Leur efficacité au niveau intestinal est maintenant bien reconnue et leur application s'étend depuis peu à d'autres écosystèmes du corps humain tel que le vagin.

3.2. Action des probiotiques au niveau intestinal

3.2.1. Historique et définition

L'observation originale du rôle positif joué par quelques bactéries sélectionnées est attribué à Eli Metchnikoff, au début du siècle dernier et qui a suggéré que la dépendance des microorganismes intestinaux vis-à-vis des aliments rend possible l'adoption de mesures pour modifier la flore dans nos corps et remplacer les microorganismes dangereux par des microorganismes utiles (Metchnikoff, 1907). A cette époque, Henry Tissier, pédiatre français, a observé que les selles des enfants souffrant de diarrhée contenaient un petit nombre de bactéries caractérisées par une morphologie particulière en forme de Y. Ces bactéries "bifides" étaient au contraire abondantes chez les enfants sains (Tissier, 1906). A son avis, ces bactéries pourraient être administrées aux patients souffrant de diarrhée pour aider à rétablir une flore intestinale saine.

Les observations de Metchnikoff et de Tissier étaient attrayantes mais la découverte des antibiotiques avant et après la première guerre mondiale a provoqué un désintérêt pour ce nouveau concept. Quelques rares études ont été menées. Malheureusement, les résultats n'ont pas toujours été positifs (Pastaud, 2013).

Au cours des trente dernières années toutefois, la recherche dans le domaine probiotique a fait des progrès considérables en ce qui concerne la sélection et la caractérisation des cultures probiotiques spécifiques et la justification des allégations santé liées à leur consommation. L'essor récent du concept d'aliments fonctionnels a fortement relancé l'intérêt porté aux probiotiques.

La première définition officielle a été proposée par Fuller en 1989 : un probiotique est «un supplément alimentaire microbien vivant qui affecte bénéfiquement la santé de l'animal en améliorant sa balance microbienne intestinale». Cette définition a été révisée plusieurs fois, notamment par la «FAO» et la «WHO» (Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization) en 2001 : les probiotiques sont « des microorganismes vivants qui lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, produisent un effet bénéfique pour la santé de l'hôte » (Falagas *et al.*, 2006; Kaewsrirachan *et al.*, 2006 ; Barrons et Tassone, 2008 ; Bastani *et al.*, 2012).

3.2.2. Effets positifs sur la santé et mécanismes d'action

Les effets positifs des probiotiques au niveau intestinal sont multiples :

- Amélioration de la digestion du lactose par action de la β -galactosidase bactérienne qui hydrolyse le lactose (De Vrese et *al.*, 2001).
- Réduction du taux de cholestérol sanguin qui serait dû à l'assimilation du cholestérol par les bactéries et/ou l'hydrolyse des sels biliaires conjugués (Zhang et *al.*, 2007).
- Diminution des allergies alimentaires par diminution de la perméabilité intestinale très augmentée en période de réactivité allergique et donc diminution du passage des protéines alimentaires (Isolauri et *al.*, 1993).
- Réduction du risque de diarrhée grâce à la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, de bactériocines, l'action anti-toxines ou la stimulation du système immunitaire (Gill, 2003).
- Traitement des maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique...) certaines études ont suggéré des effets positifs de certaines souches de probiotiques dans la prévention des rechutes de colite ou encore de maladie de Crohn (Mimura et *al.*, 2004 ; Zocco et *al.*, 2006). Cependant des études supplémentaires sont encore nécessaires en vue de l'application clinique des probiotiques dans le traitement de ces pathologies.
- Prévention du cancer du côlon et autres cancers : par dégradation des carcinogènes, production de composés antimutagéniques, modification des enzymes fécales carcinogéniques et stimulation du système immunitaire. Les preuves expérimentales directes manquent mais il existe de nombreuses preuves indirectes ouvrant des perspectives pour l'application des probiotiques dans la prévention de certains types de cancer (Rafter, 2002).

3.2.3. Critères de sélection

Les microorganismes potentiellement probiotiques doivent être sélectionnés selon ces critères :

➤ Critères de sécurité

- Souche pour l'usage humain d'origine humaine (isolé du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire (utilisé dans les produits fermentés). L'origine de la souche est également une condition importante car l'interaction spécifique avec l'hôte est maximisée lorsqu'elle provient du même habitat (Alvarez-Olmos et Oberhelman, 2001).
- Souche déposée dans une collection de cultures reconnue internationalement.
- Souche caractérisée par des techniques phénotypiques et génotypiques.
- Historique de non pathogénicité.
- Pas de déconjugaison excessive des sels biliaires au risque d'induire des lyses cellulaires.
- Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques.
- Pas de dégradation excessive du mucus.

➤ Critères fonctionnels

- Tolérance à l'acidité et aux enzymes digestives gastriques.
- Tolérance à la bile.
- Adhésion aux cellules intestinales et persistance dans le tractus gastrointestinal.
- Immunostimulation.
- Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes.
- Aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé de l'hôte.

➤ Critères technologiques

- Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini.
- Conservation des propriétés probiotiques après production (Klaenhammer et Kullen, 1999 ; Salminen *et al.*, 2002 ; Gueimonde et Salminen, 2006 ; Mattila-Sandholm *et al.*, 1999 ; Saarela *et al.*, 2000).

Parmi l'ensemble des critères cités, l'aptitude à produire des effets bénéfiques sur la santé demeure encore délicate à évaluer dû notamment au fait que les modes d'action par lesquels les probiotiques exercent un rôle fonctionnel *in vivo* sont méconnus (Klaenhammer et Kullen, 1999). La compréhension des mécanismes d'action représente un des défis scientifiques majeurs dans le domaine des probiotiques.

La dose recommandée de consommation de probiotiques est de 10^9 à 10^{10} bactéries par jour afin d'avoir en général 10^8 à 10^9 bactéries vivantes accédant au duodénum et capables d'exercer leurs effets (Sanders et Huisint Veld, 1999). L'apport de probiotiques doit être régulier, car des études ont montré qu'ils disparaissent du tractus au bout d'une à deux semaines après arrêt de l'administration.

3.3. Développement des probiotiques au niveau vaginal

3.3.1. Définition

En gynécologie, les probiotiques sont des lactobacilles utilisés surtout pour la normalisation et la stabilisation du milieu vaginal par l'apport de souches sélectionnées (Bohbot et Lepargneur, 2012). Pour cela, les probiotiques peuvent être administrés par voie orale ou vaginale ; cependant il n'est pas clair, jusqu'aujourd'hui, quel itinéraire est plus efficace. La durée du traitement et la dose la plus efficace doit être aussi prise en compte en fonction des besoins (prévention ou traitement), du type de trouble et de la souche utilisée (Falagas *et al.*, 2006 ; Bastani *et al.*, 2012). Chaque biotope exerce une pression de sélection : un crible de sélection spécifique au milieu vaginal est donc nécessaire. Cependant, les critères fonctionnels appliqués au niveau vaginal sont moins exigeants qu'au niveau intestinal car les souches ne doivent pas, par exemple, résister au pH acide et tolérer la bile.

L'écosystème vaginal est moins complexe que l'écosystème intestinal. En effet, seul un groupe de bactéries composé de lactobacilles et constituant la flore de Döderlein domine à 95% : il joue un rôle essentiel dans la protection de la muqueuse vis-à-vis des pathogènes.

L'application des probiotiques au niveau vaginal est une voie en pleine expansion. Dans les années 1930, Mohler et Brown furent les premiers à proposer un traitement des vaginites et de la vaginose avec une culture de bacilles de Doderlein. Depuis, différentes études ont montré l'efficacité de l'application de souches de lactobacilles exogènes au niveau vaginal pour lutter contre les infections urinaires, la vaginose bactérienne et les vaginites (Hallen *et al.*, 1992 ; Hilton *et al.*, 1992).

3.3.2. Mécanismes d'action des souches probiotiques

Certaines souches de lactobacilles ont pu prouver leurs performances au niveau du vagin, et elles ont comme effets ce qui suit (Kerchove, 2011 ; Wilson *et al.*, 2011) :

- Constitution d'une barrière de protection contre les microorganismes pathogènes.
- Conservation de l'intégrité et du bon fonctionnement de la muqueuse.
- Stimulation du système immunitaire local.
- Neutralisation de certains produits toxiques.
- Production des substances antimicrobiennes.
- Contribution au maintien de la santé vaginale.
- Rééquilibre la flore vaginale.

3.3.3. Critères de sélection

Plusieurs critères de sélection des probiotiques à usage vaginal ont été établis :

➤ Critères de qualité

- Viabilité, stabilité génétique et non pathogénicité.
- D'origine humaine.
- Identification taxonomique précise.

➤ Critères d'efficacité

- Capacité de coloniser et de persister dans l'écosystème vaginal.
- Production de substances antimicrobiennes et antagonisme envers les pathogènes et stimulation de l'immunité locale.
- Etre compatible dans le cas d'usage de deux souches probiotiques.
- Résistance à l'acidité, à la bile et aux enzymes digestives (cas de prises orales), aux substances antimicrobiennes et aux spermicides.

➤ Critères technologiques

- Bonne production à l'échelle industrielle.
- Stabilité durant la fabrication et dans le produit fini.
- Conservation des propriétés probiotiques (Rousseau, 2004).

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Chapitre 1

Isolement et caractérisation de microorganismes de différents biotopes

1.1. Les différents prélèvements

1.1.1. Prélèvements vaginaux

L'étude pratique a porté sur 50 prélèvements vaginaux qui ont été effectués chez des femmes de différents âges, présentant ou non des infections vaginales (tableau 2). Ces femmes sont soit, soumises à une consultation ambulatoire, soit hospitalisées pour un suivi de grossesse ou pour un accouchement au niveau de l'hôpital spécialisé Abdallah Nouaouria d'El-Bouni, l'hôpital Ibn Roched, secteur sanitaire de Hadjer-Ediss à Annaba, et à l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya, polyclinique Tebal Abdelmadjid, laboratoire d'hygiène à Jijel.

Ces prélèvements sont réalisés à l'aide d'écouvillons, par un gynécologue ou une sage femme. Il existe plusieurs techniques de prélèvements vaginaux, celle utilisée dans cette étude vise la flore résidente vaginale normale et la flore responsable de vaginites. Cette technique consiste à prélever de la paroi latérale, de l'exocol et du cul de sac postérieur, sous spéculum avec un éclairage adapté et dans les conditions d'asepsie rigoureuses (Béraud, 2001).

Pour chaque femme on a utilisé trois écouvillons, le premier est introduit dans un tube de bouillon glucosé tamponnée (BGT), le deuxième dans un tube de milieu MRS broth (De Man et *al.*, 1960) dans le but de réaliser des cultures microbiennes et le troisième écouvillon a servi pour l'examen direct (état frais et coloration de Gram). Les tubes étiquetés sont transportés au laboratoire à froid (+4°C) dans un délai qui ne dépasse pas deux heures.

Tableau 2. Présentation des différents prélèvements vaginaux

N° de prélèvement vaginal	Date	Lieu	Age	Grossesse éventuelle	Signes locaux	Traitement éventuel
PV1	20/04/2012	Secteur sanitaire de Hadjer-Ediss. Annaba	24 ans	-	asymptomatique	-
PV2	01/07/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	35 ans	-	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
PV3	01/07/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	32 ans	-	prurit vulvaire	-
PV4	04/09/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	35 ans	-	sécrétion vaginale épaisse, prurit vulvaire	-
PV5	27/09/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	42 ans	-	/	antibiotiques
PV6	15/10/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	36 ans	-	/	-
PV7	19/10/2012	laboratoire d'hygiène. Jijel	30 ans	-	/	-
PV8	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	40 ans	-	asymptomatique	-
PV9	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	31 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV10	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	25 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV11	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	28 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV12	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	28 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV13	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	25 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/
PV14	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	32 ans	+ (à terme)	/	/
PV15	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	32 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV16	08/05/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	34 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/
PV17	03/06/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	27 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/
PV18	03/06/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	24 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV19	03/06/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	31 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV20	03/06/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	22 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV21	03/06/2013	hôpital Ibn Roched. Annaba	27 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV22	18/12/2013	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	29 ans	+ (7 ^{ème} mois)	asymptomatique	/
PV23	18/12/2013	hôpital Abdallah Nouaouria El- Bouni. Annaba	25 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/

Tableau 2(suite 1). Présentation des différents prélèvements vaginaux

N° de prélèvement vaginal	Date	Lieu	Age	Grossesse éventuelle	Signes locaux	Traitement éventuel
PV24	18/12/2013	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	35 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/
PV25	18/12/2013	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	34 ans	+ (à terme)	asymptomatique	/
PV26	23/12/2013	polyclinique Tebal Abdelmadjid. Jijel	33 ans	-	prurit vulvaire, sensation de brûlure	antibiotiques
PV27	24/12/2013	polyclinique Tebal Abdelmadjid. Jijel	28 ans	-	asymptomatique	/
PV28	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	22 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV29	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	19 ans	-	asymptomatique	/
PV30	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	33 ans	-	sécrétion vaginale épaisse, prurit vulvaire	/
PV31	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	24 ans	-	/	/
PV32	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	24 ans	+ (5 ^{ème} mois)	prurit vulvaire	-
PV33	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	29 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV34	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	35 ans	-	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
PV35	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	40 ans	-	prurit vulvaire	-
PV36	26/12/2013	l'hôpital de Mohamed Sadik Ben Yahiya. Jijel	21 ans	-	asymptomatique	-
PV37	09/01/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	33 ans	-	asymptomatique	-
PV38	09/01/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	41 ans	-	/	chimiothérapie
PV39	09/01/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	28 ans	-	/	-

Tableau 2 (suite 2). Présentation des différents prélèvements vaginaux

N° de prélèvement vaginal	Date	Lieu	Age	Grossesse éventuelle	Signes locaux	Traitement éventuel
PV40	09/01/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El 22 ans	+ (3 ^{ème} mois)	asymptomatique	-
PV41	09/01/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El 30 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV42	09/01/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El 32 ans	+ (à terme)	/	/
PV43	22/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 19 ans	+ (à terme)	prurit vulvaire	/
PV44	22/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 28 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV45	22/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 33 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV46	22/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 26 ans	+ (à terme)	asymptomatique	-
PV47	22/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 26 ans	-	prurit vulvaire	-
PV48	28/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 33 ans	-	sécrétion vaginale épaisse, prurit vulvaire	chimiothérapie
PV49	28/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 22 ans	-	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
PV50	28/05/2014	hôpital Abdallah Bouni. Annaba	Nouaouria El- 32 ans	-	/	-

1.1.2. Prélèvements bucco-dentaires

Onze prélèvements bucco-dentaires provenant de trois sites à savoir la salive, la plaque supra gingivale et la carie dentaire ont été réalisés au cours de cette étude dans le but d'isoler des souches appartenant au genre *Lactobacillus* (tableau 3). La localisation des lactobacilles dans la bouche (salive et tissu mous) ainsi que leur rôle dans la diffusion du processus carieux et leur rôle dans la formation de la plaque dentaire conditionnent le choix de ces sites (Mouton et *al.*, 1994).

Les prélèvements ont été effectués en utilisant des écouvillons stériles chez des patients n'ayant pas subi de brossage dentaire au préalable. Par la suite, l'écouvillon a été introduit dans un tube de MRS broth pour enrichissement. Les tubes étiquetés sont transportés à froid (+4°C) au laboratoire dans un délai qui ne dépasse pas deux heures.

Tableau 3. Présentation des différents prélèvements bucco-dentaires

N° de prélèvement bucco-dentaire	date	Age	sexe	Site de prélèvement	Antibiothérapie
PB1	05/01/2012	26 ans	Féminin	salive	-
PB2	05/01/2012	24 ans	Féminin	plaque supra gingivale	Ofloxacin
PB3	05/01/2012	25 ans	Féminin	plaque supra gingivale	Augmentin
PB4	05/01/2012	20 ans	Féminin	carie dentaire	-
PB5	15/01/2012	22 ans	Féminin	salive	-
PB6	01/07/2012	51 ans	Féminin	carie dentaire	-
PB7	01/07/2012	37 ans	Féminin	plaque supra gingivale	-
PB8	01/07/2012	11 ans	Féminin	salive	-
PB9	27/08/2012	34 ans	Féminin	salive	-
PB10	27/08/2012	11 ans	Féminin	salive	-
PB11	11/12/2012	24 ans	Féminin	salive	-

1.1.3. Prélèvement rectal chez les nourrissons allaités au sein

Cinq prélèvements rectaux ont été réalisés chez des nourrissons allaités au sein dans le but d'isoler des souches appartenant au genre *Lactobacillus* (tableau 4). Un écouvillonnage rectal a été effectué à l'aide d'écouvillon humidifié au sérum physiologique ou eau stérile introduit au niveau intra-rectal profond pour recueillir des matières fécales.

Les écouvillons ont été introduits dans des tubes contenant du MRS broth en vue d'enrichissement des Lactobacilles. Les tubes étiquetés sont transportés à froid (+4°C) au laboratoire dans un délai qui ne dépasse pas deux heures. (Archambaud et Clave, 2008).

Tableau 4. Présentation des différents prélèvements rectaux

N° du prélèvement	Date	Age	Sexe	Traitement éventuel
PF1	05/03/2012	4 mois	Féminin	-
PF2	22/04/2012	2 mois	Masculin	-
PF3	09/07/2012	3 mois	Féminin	-
PF4	02/10/2012	9 mois	Féminin	-
PF5	06/12/2012	6 mois	Masculin	-

1.1.4. Prélèvements du lait maternel

Le lait maternel a été recueilli chez douze femmes volontaires et en bonne santé de la région d'Annaba (service de maternité- hôpital Abdallah Nouaouria d'El-Bouni, Annaba) (tableau 5).

Tableau 5. Présentation des différents prélèvements du lait maternel

N° du prélèvement	Date	Age	Traitement éventuel	pH
LM1	05/03/2012	36 ans	-	6,8
LM2	11/03/2012	42 ans	-	6,5
LM3	12/03/2012	/	-	/
LM4	13/03/2012	37 ans	-	6,9
LM5	13/03/2012	/	-	/
LM6	13/03/2012	34 ans	-	7,02
LM7	13/03/2012	31 ans	-	/
LM8	13/03/2012	41 ans	-	7,20
LM9	13/03/2012	24 ans	-	6,8
LM10	14/03/2012	26 ans	-	6,9
LM11	14/03/2012	42 ans	-	/
LM12	27/08/2012	34 ans	-	6,9

Avant chaque prélèvement, les mamelons et les aréoles mammaires sont nettoyés ainsi que les premiers gouttes de lait (500 µl) sont jetés (Bhatt et *al.*, 2012).

Les échantillons de lait ont été récoltés dans des tubes stériles par expression manuelle en utilisant des gants stériles.

Les tubes étiquetés sont transportés à froid (+4°C) au laboratoire dans un délai qui ne dépasse pas deux heures.

1.2. Isolement des microorganismes

1.2.1. Isolement des microorganismes vaginaux potentiellement pathogènes

Une étape d'enrichissement précède l'isolement des microorganismes potentiellement pathogènes. Les tubes du bouillon glucosé tamponnée (BGT) contenant les prélèvements ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

Après enrichissement, l'ensemencement sur différents milieux coulés préalablement en boîtes de Pétri a été effectué par écouvillonnage.

Les milieux de cultures nutriment agar (FLUKA), brain heart infusion agar (FLUKA), macconkey agar (FLUKA), mannitol salt agar (FLUKA), blood agar (FLUKA), cetrimide agar (BIOKAR) ont été utilisés pour l'isolement des bactéries indicatrices. Tandis que le milieu sabouraud agar (FLUKA) a été utilisé pour l'isolement des levures.

Les boîtes de Pétriensemencés ont été incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

1.2.2. Isolement des lactobacilles de différents biotopes

a- Isolement des lactobacilles à partir de prélèvements vaginaux, prélèvements buccodentaires et prélèvements rectaux des nourrissons :

Les tubes du MRS broth contenant les différents prélèvements ont été incubés à 37°C pendant 24 heures.

Après enrichissement, l'ensemencement sur le MRS agar (contenant 0,05% L-cystéine, pH 5,4) en boîtes de Pétri a été effectué par écouvillonnage.

Les boîtes de Pétriensemencées ont été incubées en anaérobiose à 37°C pendant 72 heures.

b- Isolement des lactobacilles à partir du lait maternel :

Une série de dilution du lait maternel a été effectuée dans l'eau physiologique stérile. L'ensemencement des différentes dilutions par la technique d'inondation a été réalisé en boîtes de Pétri contenant du MRS agar (0,05% L-cystéine, pH 5,4). Les boîtes ont été incubées dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 72 heures.

1.3. Purification des microorganismes isolés

C'est la phase la plus délicate et la plus importante ; pour obtenir une culture de souches pures, plusieurs repiquages successifs sont nécessaires.

Les colonies de différents aspects sont testées par la coloration de Gram, le test de catalase et le test d'oxydase (les levures ne sont pas soumises à ces deux derniers tests). Celles ayant répondu aux critères caractéristiques de chaque groupe et présentant un seul type de cellule à l'observation microscopique ; sont repiquées sur des milieux solides spécifiques à chaque type de microorganisme et incubées à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Ces étapes sont répétées plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une culture pure.

1.4. Conservation des souches pures :

1.4.1. Conservation des lactobacilles :

Les souches de lactobacilles sontensemencées dans le MRS broth. Après incubation à 37°C pendant 24 à 30 heures, les cultures sont mélangées avec le glycérol stérile de telle sorte que sa concentration finale dans le mélange atteint 25%. Les souches sont ensuite conservés dans des cryotubes à -30°C et -80°C.

Une autre méthode de conservation consiste à repiquer les cultures pures sur la pente d'une gélose MRS inclinée en tube hermétiquement clos. Le tube est conservé au froid à + 4 °C à l'abri de la lumière.

1.4.2. Conservation des autres souches :

Les souches potentiellement pathogènes sontensemencées par piqûre centrale dans le culot d'une gélose de conservation.

Une autre méthode consiste à repiquer les cultures pures sur la pente d'une gélose inclinée en tube hermétiquement clos. Le tube est conservé au froid à + 4 °C à l'abri de la lumière.

NB : Il existe également d'autres techniques de conservation des souches microbiennes notamment la dessiccation et la lyophilisation (Larpent et Gourgaud, 1997).

1.5. Caractérisation des souches isolées

1.5.1. Caractérisation des microorganismes vaginaux potentiellement pathogènes

1.5.1.1. Tests préliminaires

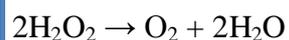
a- Coloration de Gram :

C'est une coloration différentielle qui divise les bactéries en deux classes : Gram+ et Gram-. Elle est basée sur la composition différentielle de la paroi en lipides qui sont élevés (20%) chez les Gram- et faibles chez les Gram+ (Nauciel et Vilde, 2005).

b- Recherche de la catalase:

La catalase est une enzyme qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée (H₂O₂) avec libération d'oxygène et formation d'eau (Denis et *al.*, 2007).

La réaction chimique est la suivante :

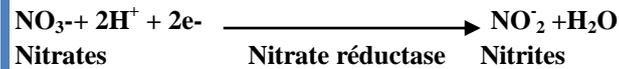


c- Recherche d'oxydase :

Le cytochrome oxydase est le dernier transporteur d'électrons dans la chaîne respiratoire. Il catalyse le transport d'hydrogène sur l'oxygène moléculaire ; ce qui aboutit à la formation de l'eau oxygénée (H₂O₂). Pour ce test, utiliser des disques (OX), imprégnés d'un substrat incolore qui est l'oxalate de N-diméthyle paraphényldiamine. Ce dernier sous l'action de l'oxydase, forme une semi-quinone de couleur rouge, instable qui s'oxyde rapidement en donnant un composé noirâtre.

d- Test de nitrate réductase

Certaines bactéries ont la capacité de réduire les nitrates en nitrite, puis parfois en diazote (N₂) (Delarras, 1998). La synthèse de nitrate réductase est inductible en anaérobiose (Béraud, 2001).

**1.5.1.2. Caractérisation biochimique (Système API, BioMérieux)****a- Système API 20E : (Bio Mérieux)**

L'API 20 E est un système miniaturisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bactéries Gram négatives. Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée. Les microtubes sont inoculés avec une suspension bactérienne qui reconstitue les milieux.

La technique d'ensemencement suit le protocole préconisé pour API 20 E dont l'incubation se fait à 37°C pendant 24 h.

La lecture se fait à l'aide du tableau des réactions, et l'identification est obtenue à l'aide d'un tableau analytique ou tableau d'identification (Joffin et Leyral, 1998).

b- Système API Staph : (bio Mérieux)

API Staph est un système d'identification des genres *Staphylococcus* et *Micrococcus* comportant des tests biochimiques standardisés et miniaturisés. Cette galerie comporte 20 microtubes contenant des substrats sous forme déshydratée, leur reconstitution se fait lors de l'addition à chaque tube de l'API d'un milieu API Staph Mediumensemencé avec la souche à étudier. La technique d'ensemencement suit le protocole préconisé pour API Staph. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 h. Les réactions produites pendant l'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés après l'utilisation de substrats ou révélés par l'addition de réactifs. La lecture se fait à l'aide du tableau des réactions, et l'identification se fait par l'utilisation du catalogue analytique API Staph (Joffin et Leyral, 1998).

c- Système API 20NE : (bio Mérieux)

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation, et une base de données. La galerie API 20 NE comporte 20 microtubes contenant des substrats déshydratés. Les tests conventionnels sont inoculés avec une suspension bactérienne saline qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Les tests d'assimilation sont inoculés avec un milieu minimum et les bactéries cultivent seulement si elles sont capables d'utiliser le substrat correspondant. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Joffin et Leyral, 1998).

d- Système API 20 Strep (bio Mérieux)

L'API 20 Strep est un système standardisé qui permet le diagnostic de groupe ou d'espèce pour la plupart des Streptocoques, Entérocoques et pour les germes apparentés les plus courants.

La galerie API20 Strep comporte 20 microtubes contenant les substrats déshydratés pour la mise en évidence d'activités enzymatique ou de fermentation de sucres. Les tests enzymatiques sont inoculés avec une suspension dense, réalisée à partir d'une culture pure, qui reconstitue les milieux. Les réactions produites pendant la période d'incubation se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés par l'addition de réactifs.

Les tests de fermentation sont inoculés avec un milieu enrichi (contenant un indicateur de pH) qui réhydrate les sucres.

La fermentation des carbohydrates entraîne une acidification se traduisant par un virage spontané de l'indicateur coloré. La lecture de ces réactions se fait à l'aide du Tableau de Lecture et l'identification est obtenue à l'aide du Catalogue Analytique ou d'un logiciel d'identification (Joffin et Leyral, 1998).

1.5.1.3. Antibiogramme

L'antibiogramme permet de déterminer la sensibilité d'une bactérie vis-à-vis des antibiotiques. Il est basé sur l'étude de la croissance bactérienne en présence d'un gradient de concentration de l'antibiotique. La détermination de la sensibilité aux antibiotiques est réalisée le plus souvent par diffusion en milieu solide (méthode des disques). La méthode utilisée est celle de Kirby-Bauer (Qin *et al.*, 2004) préconisée par le NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard).

Le milieu utilisé est le Mueller Hinton (MH) (Delarras, 1998 ; Hart et Shears, 1999).

L'interprétation des résultats a été réalisée selon les recommandations du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (Soussy, 2011).

Le choix des antibiotiques testés sur les différentes espèces bactériennes isolées, repose d'une part, sur l'identification du genre et son profil habituel vis-à-vis des antibiotiques (résistances naturelles et résistances acquises possibles), et d'autre part, sur le spectre d'activité de chaque antibiotique et son action sur les bactéries à Gram (-) et/ou sur les bactéries à Gram(+) (Grundmann *et al.*, 1993 ; Gray et George, 2000 ; Grare *et al.*, 2010). En plus, les antibiotiques ont été sélectionnés selon leur disponibilité. Les antibiotiques utilisés ont été cités dans le tableau 6.

Tableau 6. Liste des antibiotiques testés selon les bactéries isolées (Web 2)

Groupes bactériens	Antibiotiques testés	Abréviation	Charge du disque	Famille
Bacilles à Gram négatif (entérobactéries)	Amoxicilline/ acide Clavulanique	AMC	30µg/ml	
	Cefoxitine	FOX	30µg/ml	
	Imipénème	IMP	10µg/ml	
	Ticarcilline	TIC	75µg/ml	
	Pipéracilline	PIP	100µg	
	Céftriaxone	CRO	30µg	
	Céftazidime	CAZ	30µg/ml	
	Céfalotine	CF	30µg/ml	
	ampicilline	AM	10µg/ml	
	Ofloxacine	OFX	5µg/ml	
	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml	Quinolones
	Chloramphénicol	C	30µg/ml	Phénicolés
	Kanamycine	K	10µg/ml	
	Tobramycine	TM	30µg/ml	Aminosides
	Gentamicine	GM	10µg/ml	
	Nitrofurantoïne	F	300µg	Furanes
	Metronidazole	MT	5 µg	Macrolides
	Acide nalidixique	NA	30µg/ml	fluoroquinolones
	Triméthoprim/Sulfaméthoxazole	SXT	25µg/ml	Sulfamides
	Bacilles à Gram négatif (Pseudomonas)	Colistine	CT	10µg/ml
Ticarcilline		TIC	75µg/ml	
Céftazidime		CAZ	30µg/ml	
Imipénème		IMP	10µg/ml	β-lactamines
Pipéracilline		PIP	100µg	
Colistine		CT	10µg/ml	polymyxines
Amikacine		AK	10µg	Aminosides
Ciprofloxacine		CIP	5µg/ml	Quinolones
Gentamicine		GM	10µg/ml	Aminosides

Tableau 6 (suite 1). Liste des antibiotiques testés selon les bactéries isolées

Groupes bactériennes	Antibiotiques testés	Abréviation	Charge du disque	Famille
	Tobramycine	TM	30µg/ml	
Cocci à Gram positif (Staphylocoques)	Vancomycine	VA	30µg	Glycopeptides
	Pénicilline	P	10µg	β-lactamines
	Oxacilline	OX	5µg	
	Pristinamycine	PT	15µg	Macrolides
	Metronidazole	MT	5 µg	
	Gentamicine	GM	10µg/ml	Aminosides
	Kanamycine	K	10µg/ml	
	Rifampicine	RA	30µg	Rifamycines
	Tétracycline	TE	30µg	Tétracyclines
	Nitrofurantoïne	F	300µg	Furanes

1.5.2. Caractérisation des levures

1.5.2.1. Test de filamentation (blastèse)

Candida albicans et *Candida dubliniensis* sont les seules espèces qui produisent des tubes germinatifs en 3 heures à 37°C, dans un milieu pour blastèse ou dans du sérum. Au-delà de 4 heures, la germination n'est plus spécifique de *Candida albicans*/*Candida dubliniensis*, sachant que seul 2% des souches de *C. albicans*/*C. dubliniensis* ne produisent pas de tubes germinatifs.

Une suspension homogène d'une colonie de levures obtenues sur milieu de Sabouraud est réalisée dans 0,5 ml de sérum humain ou animal. Après 3 heures d'incubation à 37° C, une goutte de cette suspension est examinée au microscope optique entre lame et lamelle à un grossissement (x10) ou (x40). Le test est positif si environ 50% des levures présentent un "tube de germination" (et non un bourgeonnement) flexueux dont la longueur atteint au moins trois fois celle du diamètre de la levure. (Hart et Shears, 1999 ; Joffin et Leyral, 2006).

1.5.2.2. Antifongigramme

L'antifongigramme a été réalisé selon la méthode CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) du comité de standardisation des techniques biologiques à utilisation médicale NCCLS (CLSI, 2008).

La CMI est la plus petite concentration d'antifongique qui inhibe toute culture visible d'une souche fongique après 48 heures de culture à 37° C.

Dans une série de tubes (macrodilution), on répartit une quantité égale de bouillon sabouraud ensemencé d'un inoculum de concentration connue de la levure à étudier.

On distribue ensuite dans les tubes, l'antifongique à tester (le fluconazole) en quantité croissante (0,5, 1, 2, 4 jusqu'à 512 µg/ml). Le tube qui ne reçoit que la levure en suspension constitue le tube témoin (T) sans antifongique.

L'ensemble des tubes est mis à l'étuve à 37° C. La croissance microbienne dans chaque tube sera évaluée par rapport au témoin, la concentration qui donne le premier tube clair c'est-à-dire pas de croissance fongique, détermine la CMI.

Les seuils spécifiques de CMI définissant la sensibilité ou la résistance de *Candida* par la méthode CLSI ont été définis dans le tableau 7 (Cuenca-Estrella et al., 2005).

Tableau 7. Interprétation des CMI de *Candida* par les méthodes CLSI et EUCAST (Cuenca-Estrella et al., 2005).

		CMI (µg/ml)		
		Sensible	Sensible dose dépendant	Résistant
Fluconazole	CLSI	≤8	16-32	≥ 64
	EUCAST	≤ 0,25	0,5- 1,0	≥ 2

1.5.2.3. Amplification des régions intergéniques ITS1- ITS2 pour les souches de levures sélectionnées comme souches indicatrices

L'extraction de l'ADN génomique des levures sélectionnées a été effectuée selon Henrion et al. (1994) (Annexe 1).

Les régions intergéniques ITS1 et ITS2 sont considérées comme conservées au niveau intra-spécifique et variables entre espèces. Elles représentent un bon marqueur pour la détection des espèces de *Candida* (Fujita et al., 2001).

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été effectuée à l'aide de la paire d'amorces universelles ITS1 et ITS4 (White et al., 1990).

L'amplification s'est effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 10 à 15 ng de l'ADN extrait, 0,25 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTP), 0,5 µM de chaque amorce, 0,2 U de Taq polymérase, 2,5 µM du tampon et 1,75 µM de MgCl₂.

Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8. Amorces utilisées et conditions d'amplification (White et al., 1990)

Amorces	Séquences nucléotidiques 5'----- 3' →	Conditions
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	95°C 2min 1cycle
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	94°C 1min
		53°C 40 sec
		72°C 1min
		72°C 10min 1cycle

1.5.3. Caractérisation des lactobacilles de différents biotopes

1.5.3.1. Tests préliminaires

La caractérisation préliminaire des souches isolées a été réalisée via les tests : coloration de Gram, recherche de la catalase, d'oxydase et de la nitrate réductase. Le principe et le protocole des techniques cités ont été détaillés ci-dessus (voir paragraphe 1.5.1.1).

1.5.3.2. Tests physiologiques

a- Recherche du caractère homo-fermentaire/ hétéro-fermentaire

Il est déterminé par la méthode de Dicks et Van Vuuren (1987) dans un milieu de MRS (avec glucose au lieu du lactose).

L'atmosphère anaérobie est créée dans les tubes par une couche de paraffine liquide. Le CO₂ dégagé par la bactérie hétéro fermentaire s'accumule dans la cloche de Durham.

b- Croissance à différentes températures

Les tubes contenant du bouillon MRS sont amenés préalablement à la température de 15°C et 45° C puis inoculés à 1%.

Le développement des souches est apprécié après 24 et 48 h par comparaison avec un tube de milieu non ensemencé, incubé à la même température (appréciation visuelle de la turbidité) (Sozzi et al., 1973).

c- Culture sur MRS à différentes concentrations de NaCl

Des tubes de bouillon MRS à différentes concentration de NaCl (2%, 4% et 6,5%) ont été ensemencés et incubés à 30°C pendant 2 à 3 jours. On apprécie la croissance par apparition d'un trouble (Stiles et Holzapfel, 1997).

1.5.3.3. Antibiogramme

La détermination de la sensibilité aux antibiotiques a été réalisée par diffusion en milieu solide (méthode des disques). La méthode utilisée est celle de Temmerman et al., (2002) préconisée par le NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Le milieu utilisé est le MRS.

Les antibiotiques testés sont : la bacitracine (130 µg), l'optochine (5 µg), gentamycine (10 UI), acide nalidixique (30 µg), tetracycline (30 µg), metronidazole (5 µg), pénicilline (10UI), pefloxacin (5 µg), erythromycine (15 µg), kanamycine (30 µg), clindamycine (50 µg), chloramphenicol (30 UI), ampicilline (10 µg), pristnamycine (15 µg), vancomycine (30 µg), lincomycine (15 UI), streptomycine (500 µg), rifampicine (30 µg).

Des cultures bactériennes ont été réalisées dans le MRS broth à 37°C pendant 48heures. Après préparation d'une dilution de 1/10, l'inoculum a été ensemencé sur MRS agar. Les disques d'antibiotiques (Oxoid) ont été déposés sur les boites de Pétri inoculées. Après incubation de 48 h à 37 °C, les zones d'inhibition autour des disques ont été mesurées. Les résultats ont été interprétés selon Charteris et al., (1998).

Chapitre 2

Sélection des lactobacilles à
propriétés probiotiques

2.1. Activité inhibitrice de la croissance des microorganismes pathogènes par les lactobacilles

2.1.1. Détection de l'activité antimicrobienne (Technique des disques)

La détection des propriétés antagonistes des lactobacilles vis-à-vis des autres microorganismes uropathogènes (*Escherichia coli* SI1, *Klebsiella oxytoca* SI3, *Staphylococcus aureus* SI8 et *Candida albicans* L2), a été effectuée par la méthode de diffusion sur gélose (Schillinger et al., 1993).

Tout d'abord, on a préparé les cultures microbiennes dans les conditions appropriées :

- Les souches indicatrices ont été cultivées dans les milieux Nutrient broth et Sabouraud broth, puis incubés à 37°C pendant 24 heures.
- Les lactobacilles à tester ont été cultivés dans le MRS broth puis incubés à 37°C pendant 24 heures.

Les souches indicatrices ($DO_{625} = 0,08 - 0,1$) ont été ensemencés par écouvillonnage sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Mueller Hinton (MH) (4 mm d'épaisseur).

Les disques stériles de papier buvard (6 mm de diamètre) ont été déposés, à l'aide d'une pince préalablement flambée. Par la suite, et à l'aide d'une micropipette, 20 μ l de chaque culture de souche de lactobacille ont été déposés sur le disque correspondant au numéro de la souche. Les boîtes ont été incubées à 37°C pendant 24 h.

La lecture se fait par la mesure du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque, l'importance du diamètre d'inhibition sera mentionnée comme suit :

- +++ : $\varnothing \geq 15\text{mm}$ (inhibition forte).
- ++ : $14\text{mm} \geq \varnothing \geq 10\text{mm}$ (inhibition moyenne).
- + : $9\text{mm} \geq \varnothing \geq 7\text{mm}$ (inhibition faible).
- : $\varnothing = 6\text{mm}$ (pas d'inhibition).
- / : Non déterminé.

N.B : Toutes les souches de lactobacilles à pouvoir inhibiteur, ont été cultivées sur gélose au sang afin de vérifier leur innocuité. Uniquement les souches dépourvues du pouvoir hémolytiques ont été pris pour le reste des tests probiotiques.

2.1.2. Détermination des conditions de cultures pour la mise en évidence des molécules inhibitrices (Technique des puits)

Cette méthode est décrite dans “ *the standard method for examination of dairy products* ” en 1960, puis elle a été modifiée par Tallon et al. (1980). Les souches indicatrices utilisées pour cette technique sont cités dans le tableau 9.

20 ml de MRS agar (gélose molle avec 9 g/l d'agar) à 45°C ont été mélangés avec 200 μ L d'une culture jeune de souche indicatrice développée en bouillon nutritif pour bactéries et bouillon de Sabouraud pour levures à 37 °C ($DO_{625} = 0.08 - 0.1$), et versés dans des boîtes de

Pétri. Après solidification, des puits ont été réalisés avec un cône stérile (Essid *et al.*, 2009 ; Yong *et al.*, 2010).

Les souches de lactobacille présumés à potentiel inhibiteur (technique des disques) ont été développées dans 10 ml de MRS broth pendant 24 h à 37°C. Après incubation, un surnageant sans cellule (CFS) a été obtenu en centrifugeant la culture (8000 × g / 15 minutes), suivie d'une filtration du surnageant par un filtre d'acétate de cellulose 0.2 µm de porosité (Kermanshahi et Peymanfar, 2012).

• Action de l'acidité

Afin de tester le pouvoir inhibiteur due à l'action d'acide, le CFS a été traité par la protéinase K (1 mg/ml) et incubé 1 heure à 37°C dans le but d'éliminer l'effet inhibiteur de bactériocines.

Un autre traitement par l'enzyme catalase (1 mg/ml) a été réalisé afin d'écarter l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène (Guillermo *et al.*, 1996 ; Essid *et al.*, 2009 ; Kermanshahi et Peymanfar, 2012)

Le CFS traité a été déposé dans les puits à raison de 100 µL/ puit. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition ont été mesurées (mm).

• Action du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

Afin de tester le pouvoir inhibiteur due au peroxyde d'hydrogène, le CFS a été traité par la protéinase K (1 mg/ml) et incubé 1heure à 37°C dans le but d'éliminer l'effet inhibiteur de bactériocines.

Une neutralisation du CFS par le NaOH (0,1N) a été réalisé pour écarter l'effet inhibiteur due à l'acidité (Essid *et al.*, 2009; Kermanshahi et Peymanfar, 2012).

Le CFS traité a été déposé dans les puits à raison de 100 µL/puit. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition ont été mesurées (mm).

• Action de bactériocine

Afin de tester le pouvoir inhibiteur due aux bactériocines, le CFS a été traité par l'enzyme catalase (1mg/ml) afin d'écarter l'effet inhibiteur du peroxyde d'hydrogène.

Une neutralisation du CFS par le NaOH (0,1N) a été réalisé pour écarter l'effet inhibiteur due à l'acidité (Guillermo *et al.*, 1996 ; Essid *et al.*, 2009 ; Kermanshahi et Peymanfar, 2012).

Le CFS traité a été déposé dans les puits à raison de 100 µl/puit. Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les zones d'inhibition ont été mesurées (mm).

Tableau 9. Souches indicatrices utilisées pour détermination de l'activité antimicrobienne des lactobacilles

<i>Souche indicatrice</i>	<i>code</i>	<i>origine</i>
<i>Escherichia coli</i>	SI 1	Prélevement vaginal N°12
<i>Klebsiella oxytoca</i>	SI 3	Prélevement vaginal N°35
<i>Enterobacter aerogenes</i>	SI 4	Prélevement vaginal N°43
<i>Enterobacter cloacae</i>	SI 60	Prélevement vaginal N°47
<i>Serratia marcescens</i>	SI 5	Prélevement vaginal N°45
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SI 6	Prélevement vaginal N°26
<i>Citrobacter freundii</i>	SI 7	Prélevement vaginal N°7
<i>Staphylococcus aureus</i>	SI 8	Prélevement vaginal N°20
<i>Staphylococcus aureus</i>	SI10	Prélevement vaginal N°32
<i>Enterococcus faecalis</i>	SI 71	Prélevement vaginal N°48
<i>Candida albicans</i>	L2	Prélevement vaginal N°2
<i>Candida glabrata</i>	L4	Prélevement vaginal N°48
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 29212	American type culture collection
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603	American type culture collection
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	American type culture collection
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 13880	American type culture collection
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	ATCC 43076	American type culture collection
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	American type culture collection
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC19434	American type culture collection

Des tests de caractérisation de bactériocines ont été réalisés notamment la précipitation au sulfate d'ammonium, la concentration du surnageant et la désorption des substances antibactériennes de la paroi des souches productrices.

N.B : la zone d'inhibition a été définie comme suit :

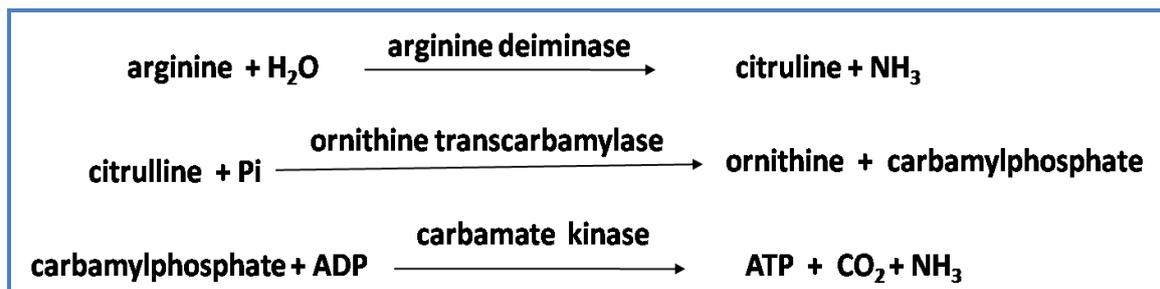
$$Z_i \text{ (mm)} = \text{le diamètre de la zone claire autour du puit (mm)} - \text{le diamètre du puit (mm)}.$$

Sachant que le diamètre du puit est de 8 mm, l'importance du diamètre d'inhibition a été mentionnée comme suit :

- +++ : $Z_i \geq 6$ mm (inhibition forte).
- ++ : $6 \text{ mm} \geq Z_i \geq 3$ mm (inhibition moyenne).
- +
- : $Z_i = 0$ mm (pas d'inhibition).

2.2. Activité de l'arginine déshydrogénase «ADH»

La voie de l'arginine déiminase est la principale voie chez les bactéries lactiques. La dégradation de l'arginine par cette voie est catalysée par une succession de trois enzymes.



Selon cette voie, 1 mole d'arginine est converti en 2 moles d'ammoniac, 1 mole d'ornithine, 1 mole d'ATP et 1 mole de dioxyde de carbone.

Donc, cette voie génère de l'énergie *via* la production d'ATP. Elle produit également de l'ammoniac qui contribue à la survie des bactéries lactiques en augmentant le pH de la culture (Marquis *et al.*, 1987 ; Montel et Champomier, 1987 ; Manca de Nadra *et al.*, 1988).

La dégradation de l'arginine par la voie de l'arginine déiminase (voie ADI) a été mise en évidence comme décrit par Spano *et al.*, (2002) avec quelques modifications.

Des cultures de souches appartenant au genre *Lactobacillus* sur gélose MRS ont été réensemencées dans le MRS broth et incubées pendant 24 heures.

La détection d'ammoniac a été évaluée en incubant les cultures bactériennes pendant 8 jours dans un milieu spécifique (0.5% de peptone ; 0.3% d'extrait de boeuf ; 0,3 % d'extrait de levure ; 0.15% de glucose ; 0.05% de pourpre de bromocrésol, pH est ajusté à 7) additionné de 0.5 % d'arginine (Biosynth). L'alcalinisation du milieu due au NH₃ se traduit par le virage de l'indicateur coloré au jaune indiquant un résultat positif.

2.3. Formation de biofilm sur les micro-plaques de polystyrène

La capacité des isolats à former un biofilm sur une surface abiotique a été déterminée quantitativement selon la méthode décrit par Toledo-Arana (2001) avec des modifications mineures.

Les souches appartenant au genre *Lactobacillus* sont cultivées dans le MRS broth pendant une nuit à 37°C. 20 µl de chaque culture ($DO_{625} = 0,1$) ont été utilisés pour inoculer les puits de la plaque de polystyrène (ST/BETA) contenant déjà 180 µl du MRS broth.

Après 24 h à 37°C, les puits ont été lavés trois fois délicatement avec 200 µl du tampon PBS (*Phosphate Buffered Saline*), séchés en position inversée, et remplis avec 200 µl de cristal violet à 1% pendant 15 minutes.

Les puits ont été rincés trois fois avec le tampon PBS, et le cristal violet retenu est solubilisé dans 200 µl d'éthanol-acétone (80 : 20, vol/vol).

La mesure de la densité optique a été déterminé à 595 nanomètre (DO_{595}) en utilisant un lecteur de microplate (multiskan scientifique thermo vont spectrophotomètre - aacid). L'essai a été réalisé en triple exemplaires.

Les résultats sont interprétés comme suit:

- (-) pas de formation du biofilm ($DO_{595} \leq 1$)
- (+) faible formation du biofilm ($1 \leq DO_{595} \leq 2$)
- (++) formation moyenne du biofilm ($2 \leq DO_{595} \leq 3$)
- (+++ forte formation du biofilm ($DO_{595} > 3$) (Toledo-Arana et al., 2001).

2.4. Production d'exopolysaccharides (EPS)

2.4.1. Détection de la production d'EPS (test préliminaire)

La production d'exopolysaccharide (EPS) a été détectée en ensemençant une culture fraîche des isolats de lactobacilles sur MRS agar (sans glucose) et supplémenté avec 2% (poids/volume) de sucrose. Après incubation à 37°C en anaérobiose pendant 72 h, la production des EPS se traduit par un aspect visqueux et envahissant des colonies (Ruas-Madiedo et Reyes-Gavilan, 2005).

2.4.2. Dosage des EPS par la méthode phénol-sulfurique

Les isolats EPS-positives ont été pris pour l'évaluation des EPS totaux (exprimée en mg/l) par la méthode phénol-sulfurique (Alp et Aslim, 2010). Après inoculation dans le MRS broth, les cultures bactériennes ont été incubées dans des conditions d'anaérobiose à 37°C pendant 18 heures. Par la suite, les cultures ont été bouillies à 100°C pendant 10 mn. Après refroidissement, les débris cellulaires et les protéines ont été éliminés par centrifugation. Les exopolysaccharides ont été précipités avec l'éthanol absolu, puis récupérée par centrifugation (14 000 x g / 20 minutes). À 1 ml d'échantillon, 1ml de phénol (5 %) (poids/volume) a été ajouté, suivi avec 5 ml d'acide sulfurique concentré. Les tubes témoin ont été maintenus dans la glace tout en ajoutant l'acide sulfurique. Le mélange a été incubé à température ambiante pour 20 minutes et l'absorbance est lue à 490 nanomètre. Le glucose a été employé comme étalon, une gamme de concentration de 0 à 100 µg d'une solution stock (1 mg/ml) a été effectuée.

2.5. Inhibition de la formation de biofilms des microorganismes uropathogènes

Les souches de lactobacilles à fort potentiel inhibiteur, ont été testées pour évaluer leur capacité d'empêcher la formation de biofilm des microorganismes uropathogènes (*Klebsiella pneumoniae* SI2, *Pseudomonas aeruginosa* SI6, *Candida albicans* L2 et *Candida glabrata* LA) selon le protocole décrit par Al-Mathkhury et Abed Assal (2012) avec quelques modifications.

Les lactobacilles sélectionnées ont été cultivés dans le MRS broth à 37°C pendant 24 heures. Après incubation, le surnageant « Cell Free Supernatant » (CFS) a été obtenu en centrifugeant la culture bactérienne (8000 × g / 15 minutes), suivie d'une filtration avec des filtres d'acétate de cellulose de porosité 0.2 µm (Kermanshahi et Peymanfar, 2012).

100 µl de chaque CFS a été utilisé pour inoculer un puit de la plaque de polystyrène (ST/BETA) contenant déjà 100 µl d'une culture jeune (DO₆₂₅ de 0,08 à 0,1) de chacune des souches indicatrices.

Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 24 heures. Le biofilm microbien a été détecté par le cristal violet.

Les puits contenant uniquement les souches indicatrices sans CFS de lactobacille ont été utilisés comme contrôle positif. Tandis que, les puits contenant 100 µl du milieu Luria Bertani (LB broth) stérile additionnées de 100 µl du MRS broth stérile représentent le contrôle négatif. L'essai a été réalisé en triple exemplaires.

Le nettoyage des plaques a été réalisé comme décrit précédemment et la mesure de la densité optique a été déterminé à 595 nanomètres (DO₅₉₅) en utilisant un lecteur de microplate (multiskan scientifique thermo vont spectrophotomètre - aacid).

2.6. Activité acidifiante

La production d'acide a été déterminée dans le MRS broth (pH 6.5). Les cultures ont été réalisées à 37°C pendant 24 heures en conditions d'anaérobiose. L'inoculum a été préparé à 1% d'une culture jeune (DO₆₂₅ de 0,08 à 0,1). Le pH a été mesuré avec un pH mètre (SensoDirect, Lovibond pH110, Allemagne) muni d'une électrode en verre calibrée. L'expérience a été réalisée en triple exemplaire et le ΔpH moyen (la différence de pH à T₀ et à T_{24h}) a été calculée (Dimitonovaa et al., 2007 ; Keller et al., 2011).

2.7. Production du peroxyde d'hydrogène

La production du peroxyde d'hydrogène par les souches appartenant au genre *Lactobacillus* a été mise en évidence selon le protocole décrit par Martín et al., (2006).

Chaque souche a été ensemencée sur MRS agar contenant 0,25 mg/ml du 3,3',5,5' tetramethyl-benzidine (Aldrich, Sigma) et 0,1 mg/ml de peroxidase type VI-A from horse (Aldrich, Sigma), puis incubée à 37°C pendant 48 heures en anaérobiose (Choi et al., 2006).

Après incubation, les boîtes de Pétri ont été exposées immédiatement à l'air pendant 30 minutes, le changement de couleur des colonies a été noté. Basé sur l'échelle du changement de couleur, les souches ont été classées en tant que producteurs forts (bleu), producteurs moyens (brun), producteurs faibles (brun clair) ou négatifs (colonies blanches) (Otero et Nader-Macias, 2006).

2.8. Résistance à différentes concentrations de Métronidazole, Clindamycine et Fluconazole

La méthode de dilution a été également employée dans le cas des antibiotiques (Metronidazole et clindamycine) et des drogues antifongiques (Fluconazole).

La CMI est la plus petite concentration d'antibiotique qui inhibe toute culture visible d'une souche bactérienne après 18 heures de culture à 37° C.

Dans une série de tubes, on répartit à quantité égale du bouillon nutritif ensemencé d'un inoculum connu de la souche bactérienne à étudier.

On distribue ensuite dans les tubes, l'antibiotique à tester en concentration croissante (0,5 ; 1 ; 2 ; 4 jusqu'à 512 µg/ml). Le premier tube qui ne reçoit que la bactérie en suspension constitue le tube témoin (T) sans antibiotique.

L'ensemble des tubes est mis à l'étuve à 37° C pendant 24 heures. La croissance bactérienne dans chaque tube sera évaluée par rapport au témoin (Boulahbal, 2006), la concentration qui donne le premier tube clair c'est-à-dire pas de croissance bactérienne, détermine la CMI (figure 9) (Rahal, 2005).

NB : pour les antifongiques, on a utilisé le même protocole à l'exception du bouillon nutritif qui a été remplacé par le Sabouraud broth et l'incubation sera de 48 heures.

Chapitre 3

*Identification phénotypique et
moléculaire des lactobacilles à potentiel
probiotiques*

3.1. Identification biochimique par Système API 50 CHL (Bio Mérieux)

API 50 CH est un système standardisé associant 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme des hydrates de carbone et dérivés (hétérosides, polyalcools, acide uronique) par les lactobacilles. API 50 CH est utilisé en combinaison avec API 50 CHL Medium pour l'identification des *Lactobacillus* et apparentés. Elle est constituée de 50 microtubes comportant chacun une zone d'anaérobiose (le tube), pour les études de fermentation, et une zone d'aérobiose (la cupule), pour les études d'oxydation et d'assimilation.

Les tubes contiennent des substrats déshydratés appartenant à la famille des hydrates de carbone et dérivés. Ces substrats peuvent être métabolisés par plusieurs voies : l'assimilation, l'oxydation et la fermentation.

La technique d'ensemencement suit le protocole préconisé pour API 50 CH. La lecture des galeries est réalisée à des temps d'incubation définis (24h, 48h), dépendant du microorganisme et du type de la réaction.

Le résultat est donné directement par le virage du milieu dans le tube : violet(-) et jaune(+). L'identification est obtenue à l'aide du logiciel Apilab Plus (version 5.1; BioMérieux) (Joffin et Leyral, 1998).

3.2. Identification moléculaire

3.2.1. Extraction de l'ADN génomique par la méthode CTAB/ NaCl

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon la méthode CTAB/ NaCl décrite par Wilson (1987) et modifiée en utilisant 1mg/ml de lysozyme (BIOMATIK). Après l'étape de lyse, l'ADN est purifié à partir du surnageant par les étapes consécutives de phénol-chloroforme-alcool iso amylique (25/24/1) et de précipitation par l'éthanol absolu (Annexe 2).

Après précipitation, le culot de l'ADN est lavé avec l'alcool à 70%, séché au miVac concentrateur, et dissous dans 50 µl TE (Tris-EDTA buffer) avec 10 µg/ml de RNase A (Sigma).

L'ADN est quantifié à l'aide du spectrophotomètre (NanoDrop 2000c Thermo Scientific) et conservé à -20°C pour une analyse ultérieure.

3.2.2. Amplification enzymatique de l'ADN par PCR

Dans la présente étude, nous avons effectué des réactions PCR qui ciblent des séquences conservées situées sur des gènes spécifiques : (i) de l'opéron ribosomique ADN_r 16S, (ii) des espaces intergéniques 16S-23S, (iii) des espaces intergéniques 23S-5S.

Les amplifications par PCR ont été effectuées dans un volume final de 25 µl.

Les réactions PCR sont réalisées dans les thermocycleurs (TM Ma Cycler, Bio-Rad ou Biometra) (figure 9).

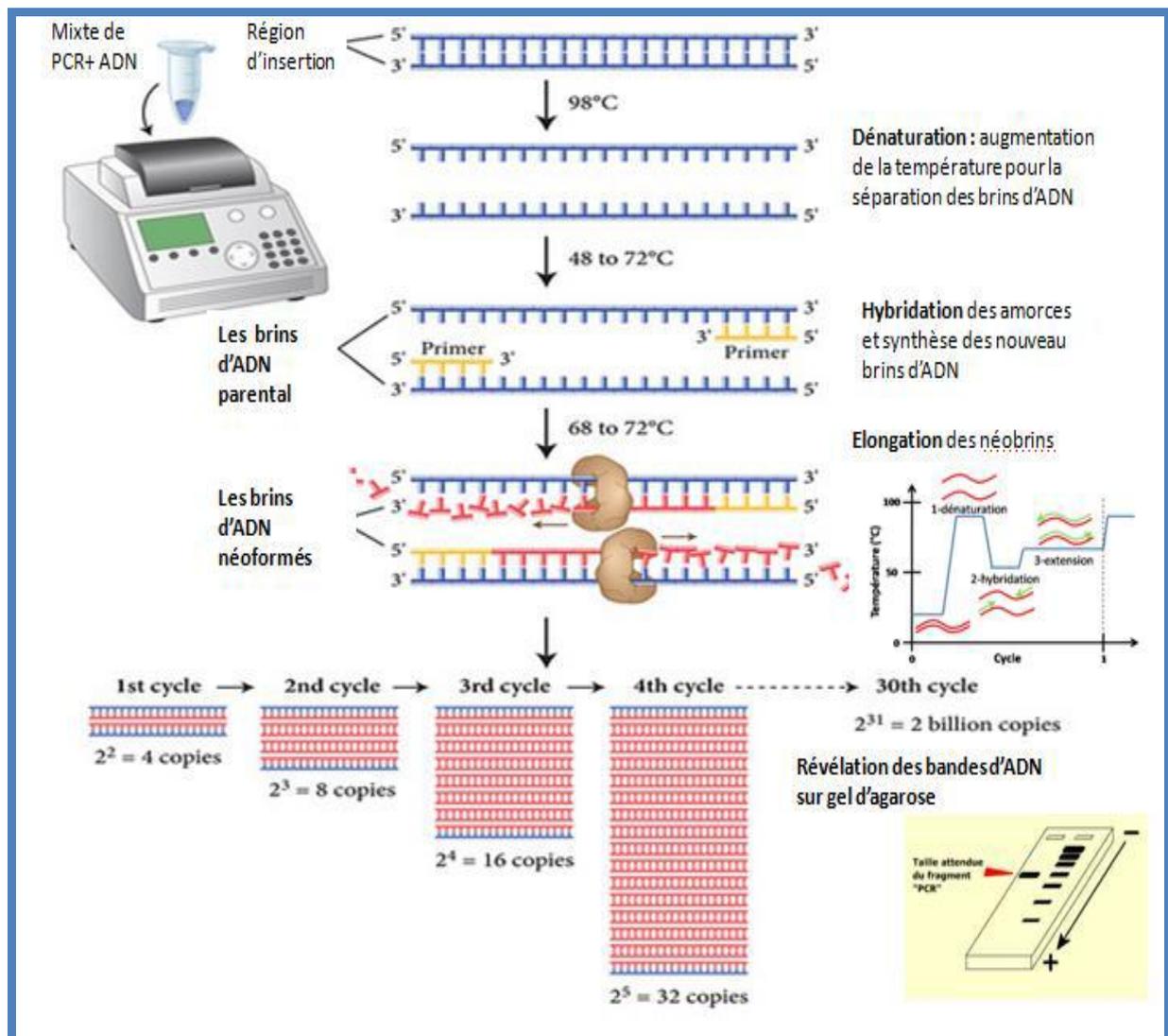


Figure 9 : Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) standard (Web 1).

3.2.2.1. Amplification des espaces intergéniques 16S-23S

L'amplification des régions intergéniques 16S-23S est réalisée en utilisant les amorces s-d-bact-1494-a-20 et s-d-bact-0035-a-15 (Daffonchio et *al.*, 1998). Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 10, alors que les mélanges réactionnels sont détaillés dans le tableau 12.

Tableau 10. Amorces, taille des amplicons attendus et conditions d'amplification.

Amorces	Séquences nucléotidiques 5'----- 3' →	Taille de l'amplicon (référence)	Conditions
ADNr 16S			
s-d-bact-0008-a-S-20	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1500 pb	95°C 3min 1cycle
s-d-bact-1495-a-A-20	CTACGGCTACCTTGTACGA	(Daffonchio et <i>al.</i> , 1998)	94°C 45s 55°C 1min 72°C 1min } 35 cycles 72°C 7min 1cycle
ITS 16S-23S			
s-d-bact-1494-a-20	GTCGTAACAAGGTAGCCGTA	Variables	95°C 3min 1cycle
s-d-bact-0035-a-15	CAAGGCATCCACCGT	(Daffonchio et <i>al.</i> , 1998)	94°C 45s 55°C 1min 72°C 1min } 35 cycles 72°C 7min 1cycle
ITS 23S-5S			
23-FI	CGGTCGAGGACTTAACCAAG		95°C 30s 1cycle
5-Ru	GGGAACAGGTGTATCCTC	Variables (Chen et <i>al.</i> , 2000)	95°C 30s 53°C 45s 72°C 1min } 35 cycles 72°C 5min 1cycle

3.2.2.2. Amplification de l'opéron ribosomique ADNr 16S

L'amplification de l'ADNr 16S est réalisée en utilisant les amorces s-d-bact-0008-a-S-20 et s-d-bact-1495-a-A-20 (Daffonchio et *al.*, 1998). Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 10, alors que les mélanges réactionnels sont détaillés dans le tableau 12.

3.2.2.3. Amplification des espaces intergéniques 23S-5S pour les souches affiliées à *Lactobacillus casei* et souches apparentées

L'amplification des régions intergéniques 23S-5S est réalisée en utilisant les amorces 23-FI et 5-Ru (Chen et *al.*, 2000). Les témoins positifs utilisés sont cités dans le tableau 11

Tableau 11 : Régions intergéniques 23S-5S des souches utilisés comme témoins positif

Témoin positif	Taille fragments (bp)
<i>L.casei</i> CIP 53.166	159bp 224 bp
<i>L. plantarum subsp. plantarum</i> CCM1904	398bp
<i>L. pentosus</i> NCFB 363T	398bp
<i>L.paraplantarum</i> NCFB 1088	398bp
<i>L. plantarum subsp. argenteratensis</i> LP85-2	398bp

Les conditions d'amplification sont résumées dans le tableau 10, alors que les mélanges réactionnels sont détaillés dans le tableau 12.

Tableau 12. Composition du mélange réactionnel utilisée pour les réactions PCR

Réactifs	16S PCR	ITS (16S-23S)	ITS (23S-5S)
Tampon 10x	1X	1X	5
MgCl ₂	1,5	1,5	/
dNTP (mM)	0,2	0,2	0,5
Amorce F (µM)	0,5	0,5	2
Amorce R (µM)	0,5	0,5	2
Taq polymérase	1U	0,5U	0,2U

3.2.3. Analyse électrophorétique (électrophorèse sur gel d'agarose)

La concentration du gel d'agarose est de 1,5%. Différents marqueurs de taille ont été utilisés selon le type et la taille du matériel nucléotidique (50pb, 100pb, 1Kb).

Les gels sont préparés dans le tampon TBE (Tris-Borate-EDTA) (0,5%) ou TAE (Tris-acetate-EDTA) (1%) et la migration est effectuée dans le même tampon, à voltage constant. La coloration des gels est réalisée avec une solution de bromure d'ethidium (BET : 0,5 mg/ml) puis visualisés sous UV et analysés en utilisant Gel Compare, Version 4.1 (Applied Maths, Kortrijk Belgium).

3.2.4. Séquençage de l'ADNr 16S par la méthode de Sanger et profils automatisés de visualisation de séquences d'ADN

➤ Principe de la technique

Le principe de la méthode de Sanger (1977) consiste à initier la polymérisation de l'ADN à l'aide d'un oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par une ADN polymérase thermostable, celle qui est utilisée pour la PCR.

Les quatre désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'une faible concentration de l'un des quatre didésoxynucléotides (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP).

Ces didésoxynucléotides, agissent comme des terminateurs de chaîne, une fois incorporés dans le nouveau brin synthétisé, ils empêchent la poursuite de l'élongation. Cette terminaison se fait spécifiquement au niveau des nucléotides correspondant au didésoxyribonucléotide incorporé dans la réaction. Pour le séquençage complet d'un même fragment d'ADN. On répète cette réaction quatre fois en parallèle, avec les quatre didésoxyribonucléotides différents.

La très grande majorité des séquences réalisées et publiées aujourd'hui sont réalisées sur des séquenceurs automatiques. Ceux-ci sont capables de réaliser les réactions de séquençage et de lire les séquences (figure 10).

➤ Séquençage par la technique de Sanger

Les amplifiats d'ADNr 16S de nos isolats de lactobacilles sélectionnés ont été purifiés avec l'exonucléase-I et la phosphatase alcaline (Exo-Sap, Fermentas, sciences de la vie) ou bien avec le kit Spin 400 Amersham en suivant le protocole standard du fabricant, pour une élimination optimale des amorces et des nucléotides non incorporés.

• Réaction de séquençage

Les amplicons ont été séquencés en utilisant un Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems) et les amorces utilisées pour la PCR (s-d-bact-0008-a-S-20 et s-d-bact-1495-a-A-20).

La réaction de séquençage consiste à avoir un mix composé de BigDye qui contient des ddNTPs (marqués chacun par un fluorochrome de couleur différente), des dNTP, la Taq polymérase dans du tampon (+ MgCl₂), tampon de séquençage 5X, plus un mélange (produit PCR, amorce et l'eau ultra pure).

• Purification des produits de la réaction de séquençage

Pour la purification des produits de la réaction de séquençage, on utilise le kit BigDye X Terminator (Applied Biosystems) constitué de deux réactifs (Solution SAM et X Terminator) en suivant le protocole standard du fabricant, afin d'éliminer les ddNTPs non incorporés et les amorces en excès.

Après réaction de séquençage, on centrifuge la plaque pendant 1 min à 1000 rpm puis on ajoute 45µl de la solution SAM et 10 µl du réactif X terminator, suite à une période d'agitation continue de 30 min à 1800 rpm.

Une seconde centrifugation de 2 min à 1000 rpm est nécessaire pour finaliser la préparation de la plaque pour le séquençage.

- **Lecture des séquences sur analyseur génétique (automate d'électrophorèse à seize capillaires, Applied Biosystems 3130XL)**

Les divers fragments séquencés sont d'abord séparés selon leur taille par électrophorèse capillaire. La séparation a lieu sous l'action d'un courant électrique. La visualisation de la fluorescence se fait par un détecteur- laser et l'analyse bioinformatique se fait grâce au logiciel data collection V3.0.1 (Applied Biosystems).

Les résultats sont présentés sous forme de courbes (électrophérogramme) de différentes couleurs selon la fluorescence détectée. L'interprétation est donnée en termes de base correspondante à chaque couleur de la courbe (figure 11) (Ennadir et *al.*, 2014).

3.2.5. Analyse des séquences et identification des bactéries

- **Alignement des séquences**

Les séquences obtenues sont alignées par le logiciel sequencing analysis V 5.3.1 (Applied Biosystems) et corrigées manuellement pour résoudre des anomalies entre les deux brins sens et antisens (Ennadir et *al.*, 2014).

- **Détermination de l'espèce bactérienne**

Les séquences sont comparées aux séquences homologues contenues dans les banques de données de séquence à travers le portail NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) : (<http://www.ncbi.gov/Blast.cgi>) en utilisant le programme Blast (*Basic Local Alignment Search Tools*) (Atschul et *al.*, 1990).

- **Critères d'identification**

L'identification du genre ou de l'espèce est effectuée selon les critères suivants :

- Si la comparaison de la séquence obtenue avec une séquence d'une espèce de référence classifiée a rapporté des pourcentages de similitude $\geq 99\%$, l'isolat inconnu sera assigné à cette espèce.
- Si les pourcentages sont entre 97% et 99% l'isolat inconnu sera assigné au genre correspondant.
- Si les pourcentages sont $< 97\%$, l'isolat inconnu sera assigné à une famille (Drancourt et *al.*, 2000).

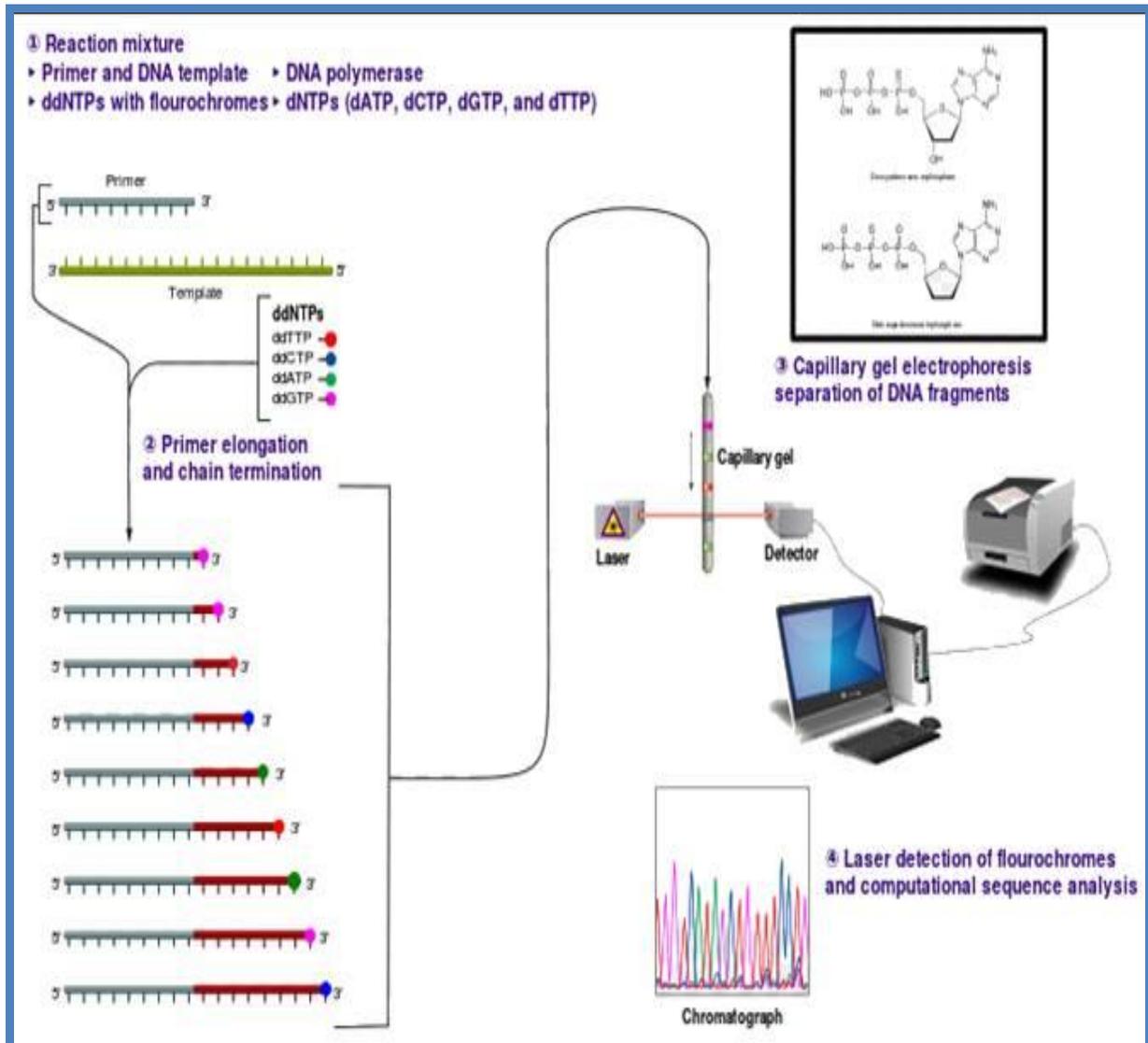


Figure 10 : Les étapes du séquençage par la méthode de Sanger et appareillage (Web 4)

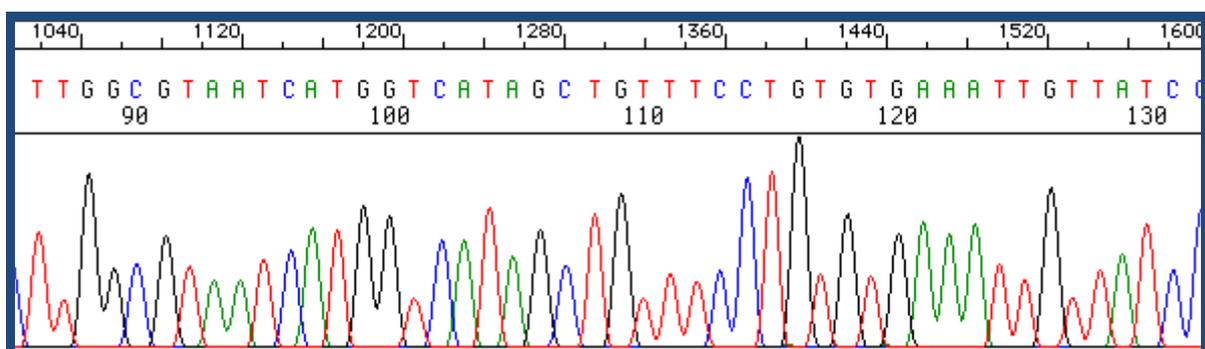


Figure 11 : Electrophérogramme des séquences de bases azotées correspondantes (Ennadir et al., 2014).

N.B : la soumission des séquences ADNr 16S des souches identifiés a été effectuée dans la base de données *Gene Bank* sous différents numéros d'accèsion.

3.2.6. Analyse phylogénétique

l'analyse phylogénétique des séquences de gènes ARNr 16S est traitée avec le logiciel MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), la version 5.1 (Tamura et *al.*, 2011).

Les arbres phylogénétiques sont construits selon la méthode de neighbor-joining (Saitou et Nei, 1987).

Chapitre 4
Mise en évidence de la diversité de la
flore lactique chez des femmes enceintes
par une technique de culture
indépendante

La connaissance de la biodiversité au sein des écosystèmes microbiens complexes d'origines humaines, environnementales ou alimentaires, s'est considérablement améliorée ces dernières années grâce aux apports de la biologie moléculaire et de la phylogénie (Giraffa et Neviani, 2001).

Les techniques moléculaires constituent des outils performants pour la détection, l'identification et la caractérisation des micro-organismes impliqués dans les variations de ces écosystèmes. Cependant, la biodiversité microbienne est très souvent sous-estimée lorsque son étude passe par la culture des bactéries. En effet, une majorité considérable des micro-organismes observés dans la nature, de l'ordre de 95 à 99 %, ne serait pas cultivable par la mise en œuvre des techniques culturales standards (Amann et *al.*, 1995). Pour remédier à ce biais méthodologique et pour s'affranchir de l'utilisation des milieux de cultures, des techniques dite culture-indépendantes ont été développées (Giraffa et Neviani, 2001).

Parmi ces techniques, certaines sont maintenant largement répandues en écologie microbienne. C'est le cas des techniques basées sur la séparation électrophorétique, en condition dénaturante, de fragments d'ADN générés par PCR comme la Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TTGE) ou la Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) (Muyzer et *al.*, 1999).

4.1. Principe de la technique DGGE

L'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant ou la DGGE, est à l'origine décrite par Myers et *al.* (1987). Elle est basée sur la séparation électrophorétique des molécules d'ADN ayant la même taille mais qui se différencient par leur séquence nucléotidique. La séparation électrophorétique est basée sur les propriétés de fusion de la molécule d'ADN double brin.

Les deux brins complémentaires d'ADN sont séparés (*fusion-out*) dans des conditions de température élevée ou sous l'influence de certains produits chimiques (appelés dénaturants). Une augmentation de la température et / ou la concentration d'un dénaturant chimique autour d'une molécule d'ADN va faire fondre le long de sa longueur dans des segments ou des régions discrètes, appelés domaines de fusion.

Les domaines de fusion varient en longueur entre environ 25 jusqu'à plusieurs centaines de bases (pb), et chacun se fond en coopération à une température distincte appelée T_m . La T_m d'un domaine de fusion est très dépendant de sa séquence nucléotidique, même une substitution d'une base unique est suffisante pour modifier la T_m d'un domaine.

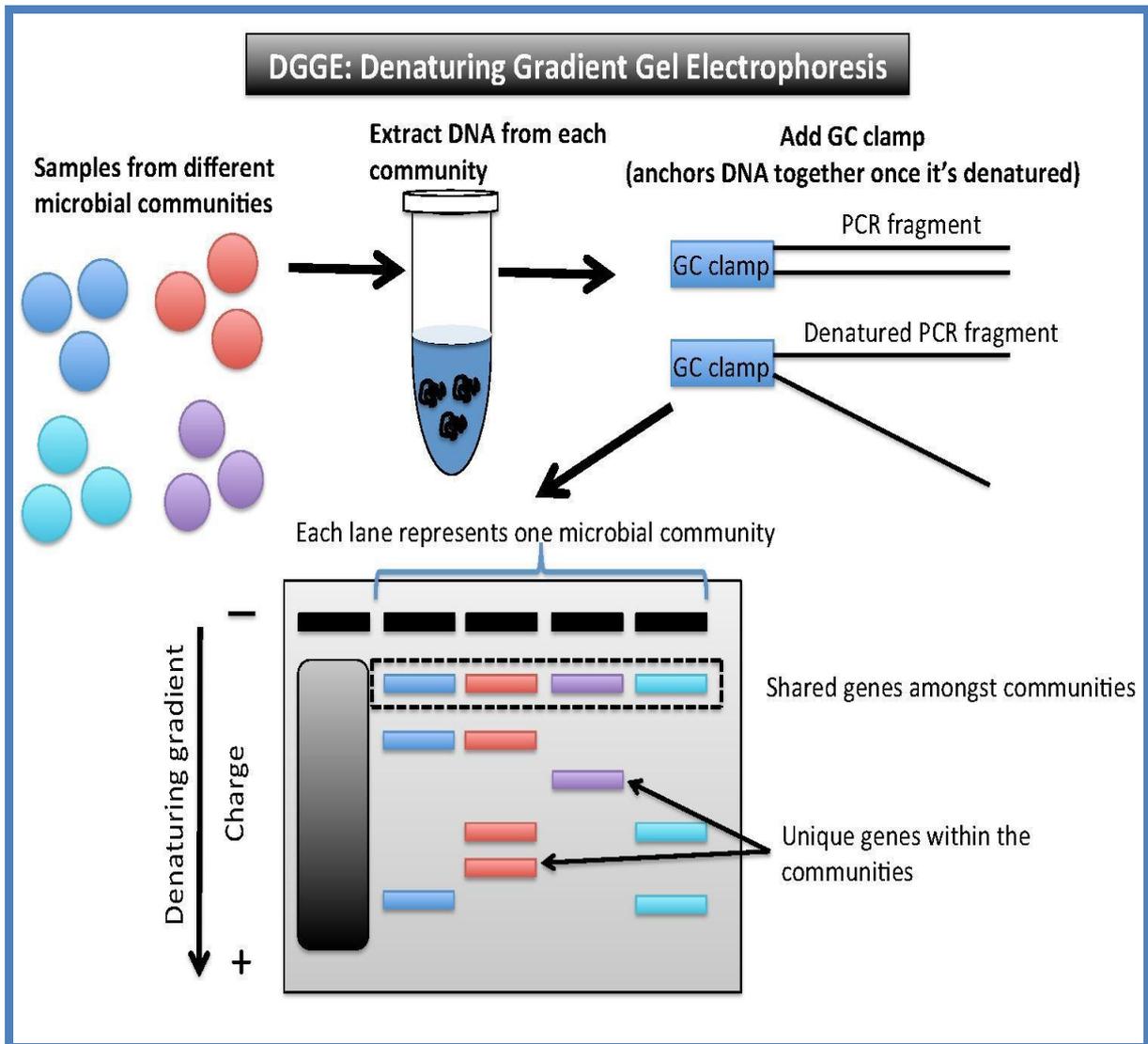


Figure 12 : Etapes de la technique DGGE (Web 5).

4.2. Prélèvements à analyser

Cette étude a été effectuée pendant la période de Novembre-2014 à Mars-2015.

Les prélèvements vaginaux provenant de quinze femmes ont été obtenus au niveau du service de gynécologie, de l'hôpital Abdallah Nouaouria d'EL Bouni – Annaba.

Ces femmes âgées entre 19 et 35 ans (moyenne d'âge 27.6 ans ; n=15), étaient enceintes à différents mois de grossesse et n'ayant été soumise à aucun traitement antimicrobien (tableau 13).

Pour cette analyse, l'échantillonnage a été réalisé à raison de 3 écouvillons par femme. Le prélèvement a été réalisé après insertion d'un spéculum non-lubrifié dans le fornix postérieur de la région vaginale et ceci par le gynécologue du service.

Tableau13. Présentation des différents prélèvements vaginaux analysés par la technique DGGE.

N° de prélèvement vaginal	Date	Lieu	Age	Grossesse éventuelle	Signes locaux	Traitement éventuel
51	05/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	24 ans	+	asymptomatique	-
52	05/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	26 ans	+	asymptomatique	-
53	05/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	21 ans	+	asymptomatique	-
54	05/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	35 ans	+	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
55	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	25 ans	+	asymptomatique	-
56	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	26 ans	+	asymptomatique	-
57	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	33 ans	+	asymptomatique	-
58	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	25 ans	+	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
59	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	27 ans	+	asymptomatique	-
60	09/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	22 ans	+	asymptomatique	-
61	11/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	19 ans	+	asymptomatique	-
62	11/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	32 ans	+	asymptomatique	-
63	11/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	27 ans	+	asymptomatique	-
64	11/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	24 ans	+	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-
65	11/11/2014	hôpital Abdallah Nouaouria El-Bouni. Annaba	34 ans	+	prurit vulvaire, sensation de brûlure	-

4. 3. Caractérisation des prélèvements vaginaux

4.3.1. Détermination du Score de Nugent

Les écouvillons contenant les prélèvements vaginaux ont été vigoureusement agités dans 1 ml d'eau distillée stérile. Une goutte a été déposée sur une lame propre, un frottis a été préparé en vue de réaliser une coloration de Gram. Après observation microscopique, le score de Nugent a été déterminé comme suit (tableau 14):

- Un sous-score a été attribué en fonction de 3 morphotypes bactériens
- La flore étudiée a été classé selon la valeur du score de Nugent définie par l'addition des 3 sous- scores précédents
 - Score \leq 3 (flore normale)
 - Score entre 4 et 6 (flore intermédiaire)
 - Score \geq 7 (vaginose bactérienne) (Chaijareenont et al., 2004).

Tableau 14. Calcul du score de Nugent après coloration de Gram (Chaijareenont et al., 2004)

	<i>Lactobacillus spp</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Mobiluncus spp</i>
Sous-score	Nombre de gros bacilles à Gram positif par champ	Nombre de petits bacilles à Gram négatif ou Gram variable par champ	Nombre de bacilles à Gram négatif incurvé par champ
0	>30	0	0
1	5- 30	<1	1-5
2	1-4	1-4	>5
3	<1	5-30	
4	0	>30	

4.3.2. Détermination du pH

Une goutte d'eau distillée stérile contenant le prélèvement vaginal a été déposée sur le papier indicateur de pH (Merck).

4.4. Préparation du système DGGE (INGENY)

4.4.1. Equipement de base

- deux plaques de verre d'environ 18x20 cm.
- élément d'espacement en forme de U.
- peignes 1mm d'épaisseur (20, 32 ou 48 puits).
- support DGGE pour la stabilisation de plaques de verre au cours du préparation du gel.
- fabricant de gradient (gradient maker), pour les petits volumes (jusqu'à environ 25 ml / chambre), et le tube approprié.

- agitateur magnétique et des petits aimants pour adapter le diamètre des chambres de fabricant gradient.
- Ruban.
- support d'électrodes (cassette d'électrophorèse).
- aquarium transparent ou réservoir avec couvercle (pour éviter l'évaporation excessive de tampon lors de l'électrophorèse).
- Élément de chauffage avec thermostat.
- Thermomètre pour surveiller la température pendant l'électrophorèse.
- Source de courant.
- Seringue et aiguilles pour débusquer les puits avant le chargement d'échantillons.
- Micropipette et embouts blancs pour le chargement des échantillons.
- plateau coloration.
- transilluminateur UV, longueur d'onde 256 nm.

4.4.2. Préparation du système tampon

Le système tampon doit être placé sur une surface horizontale et il faut s'assurer que la vanne inférieure sur le côté de l'instrument est fermée. Le réservoir est ensuite rempli (environ 17 litres) avec un tampon (0.5x TAE buffer) et le système a été branché pour rétablir le courant. La température souhaitée sera définie. Le chauffage du tampon de 20 °C à 60 °C prendra environ 45 minutes donc le couvercle doit être placé pour éviter l'évaporation du tampon.

4.4.3. Montage et préparation de la cassette d'électrophorèse

La plaque de verre est placée avec de grandes encoches sur une table propre, Sa surface est nettoyée par l'éthanol 96%.

L'élément d'espacement en forme de U est aussi nettoyé par l'éthanol 96% sur les deux côtés puis placé sur la plaque de verre, il faut s'assurer que les 3 côtés de l'élément d'espacement en forme de U soit en contact avec la plaque de verre.

La surface de la plaque de verre avec les petites encoches est ainsi nettoyée avec l'éthanol 96% et le côté propre est placé sur la plaque d'écartement en forme de U.

Les plaques de verre en sandwich sont insérées avec précaution dans la cassette d'électrophorèse dont la plaque de verre avec les grandes encoches doit être orientée vers l'intérieur de la cassette.

L'élément d'espacement en forme de U doit être tiré vers le haut aussi loin que possible sans soulever la plaque sandwich en verre. Par la suite, tous les vis seront serrés un peu pour fixer la position de l'élément d'espacement en forme de U.

Le peigne sera inséré de quelques millimètres dans les plaques de verre en sandwich.

4.4.4. Préparation de la solution dénaturante

Pour préparer le gel à gradient dénaturant les solutions suivantes sont nécessaires :

Solution "A" avec une forte concentration d'urée et de formamide

Solution "B" avec une faible concentration d'urée et de formamide

Tableau 15. Composition de la solution dénaturante

	0%	10%	20%	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
TAE 50x (ml)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Acry/Bis (ml)	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5	17,5
Formamide (ml)	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40
Urea (g)	0	4,2	8,4	12,6	16,8	21	25,2	29,4	33,6	37,8	42
Eau distillé	Ajusté à 100 ml										

Tout d'abord, on doit préparer 24 ml de la solution A et la solution B dans deux tubes séparés, puis on ajoutera 50 µl de la solution persulfate d'ammonium APS (20%), en plus de 50 µl N,N,N',N' Tetramethyl ethylene diamine (TEMED) dans les deux tubes.

4.4.5. Préparation du gradient dénaturant

La valve entre les deux compartiments du fabricant de gradient doit être fermée et ce dernier sera relié à la pompe péristaltique ainsi qu'une aiguille qui sera aussi relié à la sortie de la pompe et le peigne sera inséré entre les plaques de verre.

La solution avec la concentration la plus élevée sera versé dans le compartiment gauche du fabricant de gradient (le compartiment relié au tube) et il faut ouvrir et fermer rapidement la valve jusqu'à ce que le raccordement entre les deux compartiments soit simplement exempt d'air. La solution B sera versée dans le compartiment droit avec agitation. La pompe sera branché pour commencer la fabrication du gel dont il faut accorder approximativement une heure pour la polymérisation à 20°C.

4.5. Protocole de la DGGE

4.5.1. Extraction de l'ADN

Des suspensions de cellules microbiennes à partir de prélèvements vaginaux ont été sédimentées par centrifugation (10 000 g / 5 min) avant l'extraction de l'ADN en utilisant le kit ABIO pure (Bio Alliance Laboratories) selon les instructions du fabricant. L'ADN a été quantifié en utilisant le système de rétention de l'échantillon NanoDrop microvolume (Thermo Scientific Products Nanodrop).

La composition du gel doit contenir :

- 4.725 ml d'eau distillée
- 1.128 ml d'acrylate/acrylamide Bis
- 0.120 ml TAE
- 50µl APS à 20%
- 5µl TEMED après addition de chaque composant.

Cette solution sera introduite dans les plaques de verre en sandwich. La polymérisation de ce gel d'empilement dure environ 30 minutes.

4.5.4. Fonctionnement du gel

Le peigne doit être enlevé doucement et la cassette d'électrophorèse sera placée dans le réservoir.

Les produits de la PCR ont été séparés par DGGE selon Muyzer et *al.*, (1993) avec les modifications suivantes :

Les concentrations de la solution de polyacrylamide et tampon Tris-acétate étaient 8% et 50X, respectivement.

Les gels ont contenu un gradient d'urée et du formamide de 35 à 45%. Une solution dénaturante 100% contient 40% du formamide (vol/vol) et 7.0 M d'urée. 20µL des produits PCR ont été mélangés avec le bleu de charge, puis déposés dans les puits.

L'électrophorèse a été réglée pour 16 h avec une tension constante de 100 V à 60°C.

4.5.5. Manipulation du gel après électrophorèse

Après migration, les fils électriques seront démontés de la cassette et les plaques de verre en sandwich seront enlevées. Par la suite, la plaque de verre supérieure sera soulevée ainsi que l'élément d'espacement en forme de U ce qui rend le gel prêt à manipuler.

Après électrophorèse, le gel a été trempé pendant 20 minutes dans une solution de bromure d'éthidium (5µg/ml), lavé avec de l'eau distillé, visualisé sous UV et photographié.

4.5.6. Excision des bandes à partir du gel à gradient dénaturant, ré-amplification et séquençage

Les bandes de DGGE d'intérêt ont été excisées à partir du gel à gradient dénaturant avec un scalpel stérile et placées séparément dans des tubes Eppendorfs. Les fragments excisés ont été incubés pendant une nuit à 4°C dans 50 µl d'eau distillé stérile.

5 µl de la solution contenant les fragments du gel précédemment excisées ont été utilisés pour la PCR de ré-amplification. Le même mélange réactionnel a été préparé comme décrit ci-

dessus pour la PCR-DGGE avec un volume final de 25 µl. Les amorces utilisées sont : Lac1, Lac2, Lac3, 907R et 357F (Muyzer et *al.*, 1995; Muyzer, 1999; Walter et *al.*, 2001).

Le séquençage de ces fragments ré-amplifiés est effectué par un séquenceur d'ADN à électrophorèse capillaire (Applied Biosystems 3130XL) en utilisant un Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems).

Les similarités des séquences sont déterminés par analyse BLAST (Atschul et *al.*, 1990) en utilisant les bases de données d'ADN Gene Bank (www.ncbi.nih.gov) et le projet de base de données ribosomiques (RDP).

RÉSULTATS

Chapitre 1

Caractérisation des souches isolées

1.1. Pré-identification des microorganismes potentiellement pathogènes isolés de prélèvements vaginaux

La figure 13 présente la répartition des 97 souches pré-identifiées, isolés de prélèvements de femmes ayant une grossesse ou non. Leur répartition selon le Gram et le genre est montrée dans les figures 14 et 15.

Les résultats obtenus montrent 9 genres microbiens avec prédominance des bactéries entériques.

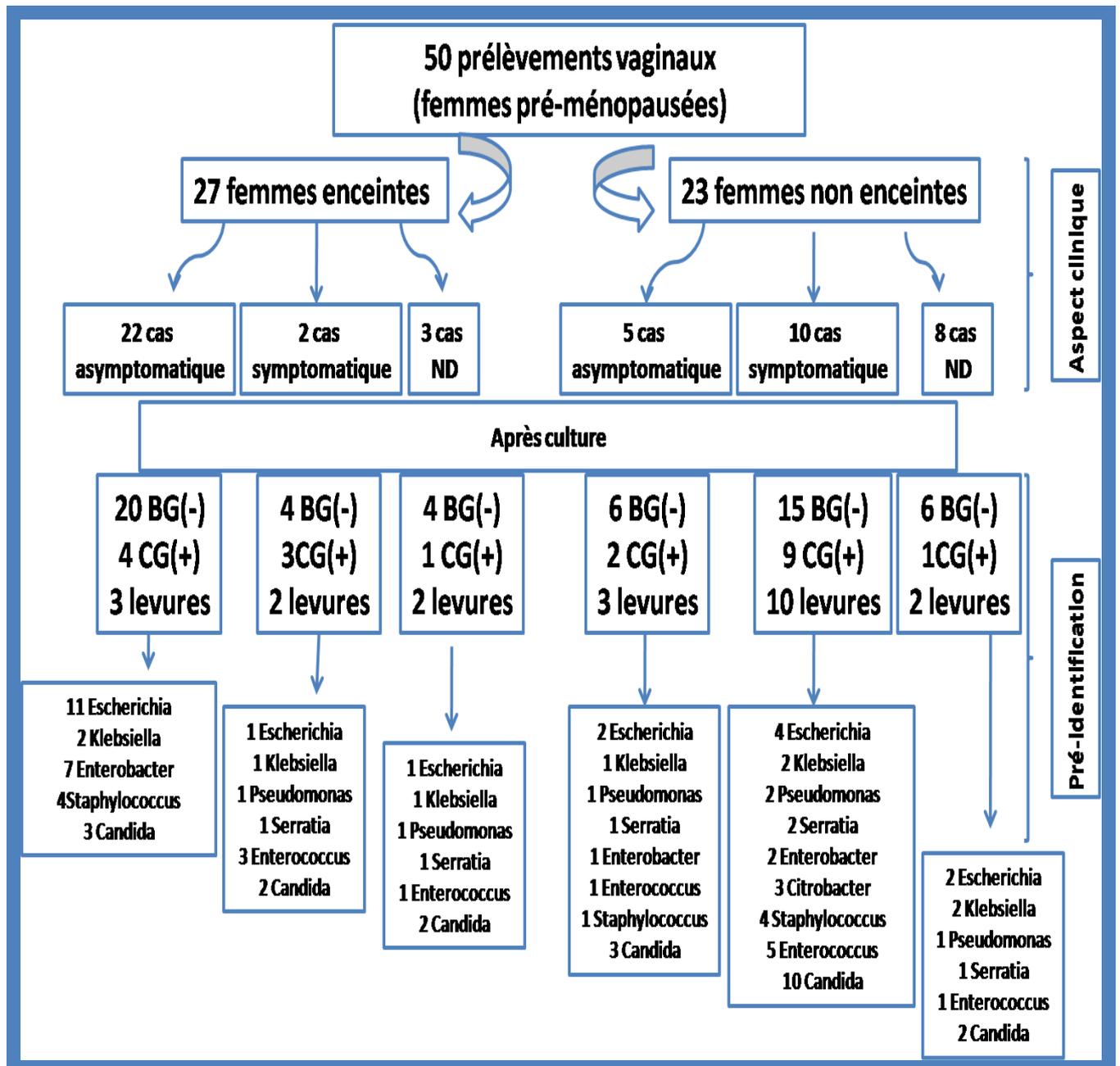


Figure 13 : Présentation des microorganismes potentiellement pathogènes.

ND : aspect clinique non déterminée ; BG(-) : bacille à Gram négatif ; CG(+) : cocci à Gram positif

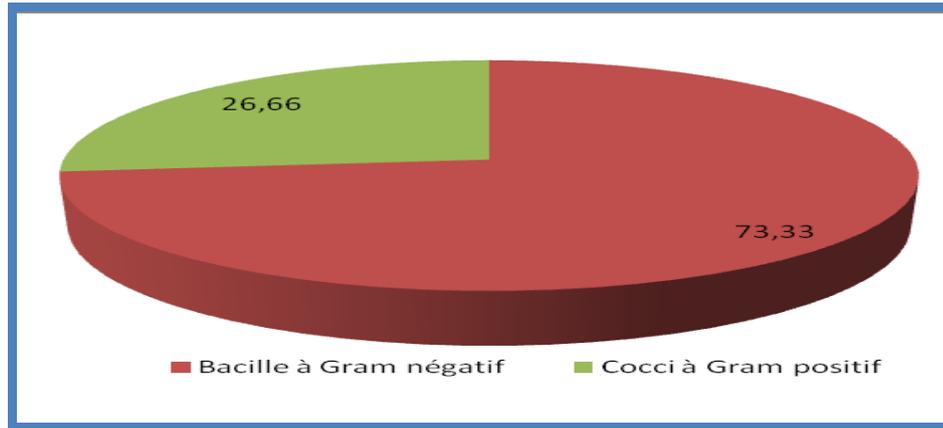


Figure 14: Répartition des bactéries potentiellement pathogènes selon le Gram.

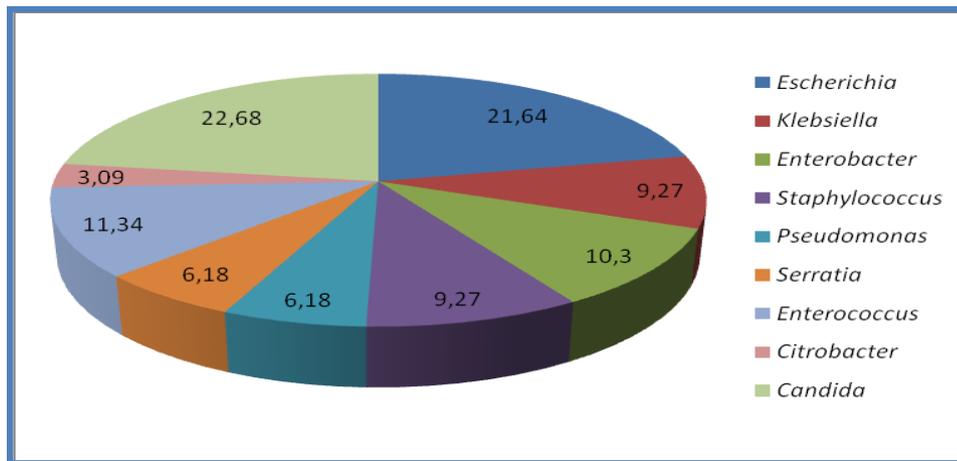


Figure 15: Répartition des microorganismes potentiellement pathogènes selon le genre.

Les entérobactéries (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* et *Citrobacter*) représentent 50,48 %, les enterocoques et les staphylocoques 11,34% et 9,27% respectivement et les *Candida* 22,68% des microorganismes isolés.

1.2. Caractérisation des bactéries utilisées comme indicatrices

1.2.1. Identification biochimique par système API (Bio Mérieux)

Les résultats d'identification biochimique ont été présentés dans les tableaux 18, 19 et 20.

Tableau 18. Résultats d'identification des entérobactéries par API 20 E.

Caractères biochimiques	ONPG	ADH	LDC	ODC	CTT	H2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	NO2
<i>E. coli</i>	+/-	-	+	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+/-	+/-	+/-	-	-	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	-	+	-	+	-	+/-	-	-	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	-
<i>K. oxytoca</i>	+	-	+	+/-	+	-	+/-	-	+	+/-	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. aerogenes</i>	+	+/-	+/-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+
<i>E. cloacae</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. marcescens</i>	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
<i>C. freundii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Tableau 19. Résultats d'identification des *Pseudomonas* par API 20 NE.

Caractères biochimiques	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CTT	PAC
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	-	+/-	+	-	+	-	+	-	-	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-

Tableau 20. Résultats d'identification des staphylocoques par API 20 Staph.

Caractères biochimiques	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDC	NAG	ADH	URE
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+/-

D'après les résultats d'identification biochimique, on remarque la prédominance de l'espèce *E. coli* chez les deux catégories de femmes enceintes et non enceintes (30,23% et 14,81% respectivement) (figure 16).

L'espèce *S. saprophyticus* a été identifiée uniquement chez les femmes enceintes tandis que l'espèce *C. freundii* a été détectée uniquement chez les femmes non enceintes (figure 16).

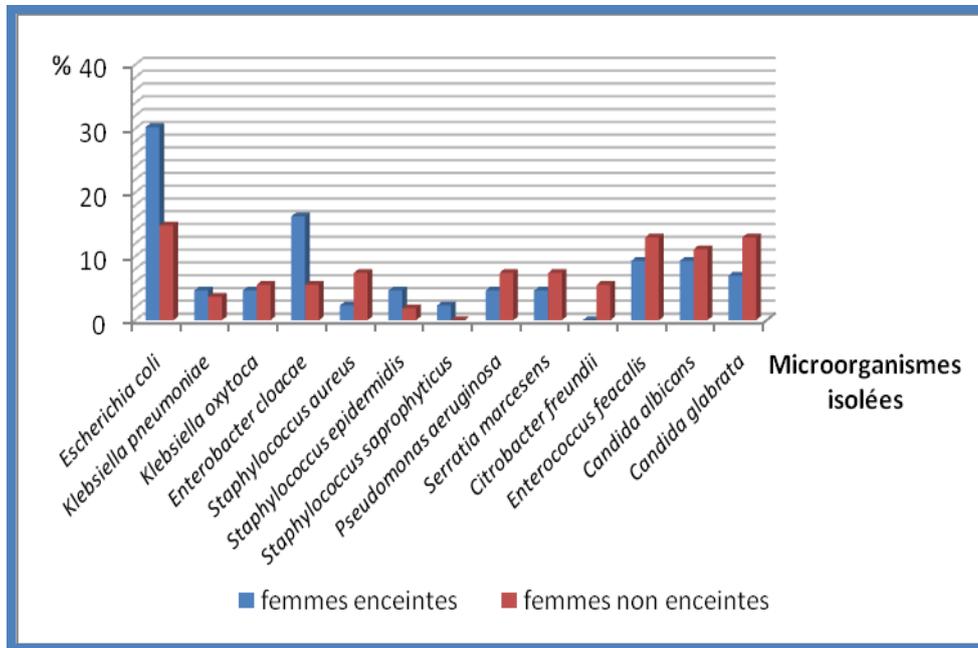


Figure 16: Répartition des microorganismes chez les femmes enceintes ou non.

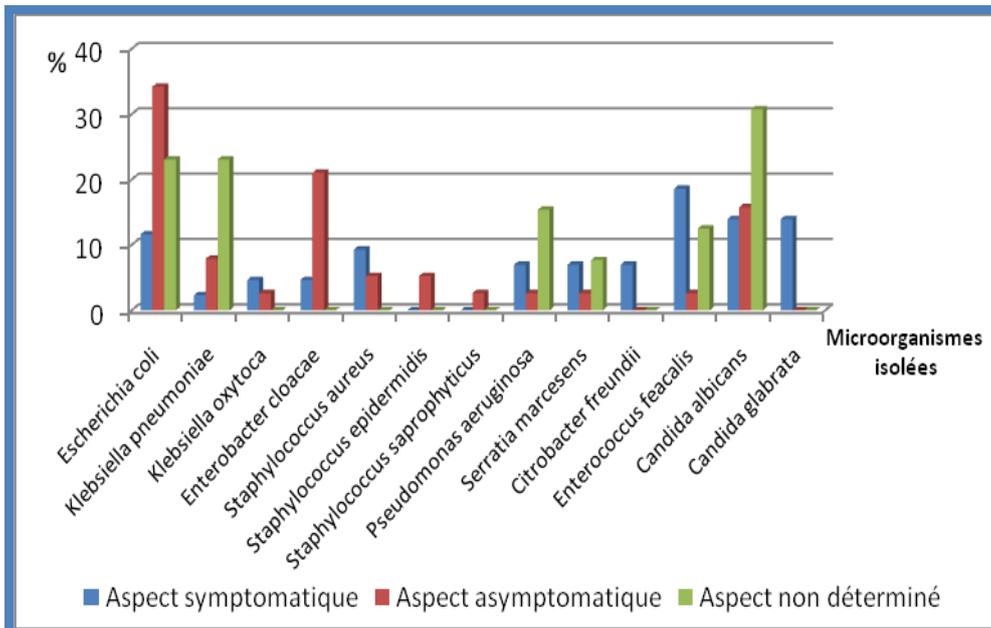


Figure 17: Répartition des microorganismes selon l'aspect clinique

Chez les femmes asymptomatiques, le pourcentage élevé est représenté par les espèces *E. coli*, *E. cloacae*, *C. albicans*, *S. epidermidis* et *S. saprophyticus*.

Chez les femmes symptomatiques le pourcentage élevé est représenté par les espèces *K. oxytoca*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. marcesens*, *C. freundii*, *E. faecalis* et *C. glabrata* (figure 17).

Dix bactéries vaginales potentiellement pathogènes ont été sélectionnées comme souches indicatrices selon l'aspect clinique symptomatique des femmes (aspect inflammatoire en présence de bactéries entériques suggère des cas de vaginites aérobie) et selon leur profil de résistances aux antibiotiques.

N.B. L'absence des bactéries pathogènes tels que *Neisseria*, *Gardrenella*, *Mycobacterium*, *Provotella*, *Bacteroides* qui peuvent causer des vaginoses bactériennes est due à la non disponibilité des conditions de cultures notamment l'anaérobiose et les milieux de culture spécifiques. C'est la raison pour laquelle cette étude a porté sur les microorganismes associés à deux types d'infections vaginales (vaginite aérobie et candidose vulvo-vaginale).

1.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des bactéries vaginales potentiellement pathogènes

1.2.2.1. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des entérobactéries et entérocoques

Les résultats de l'antibiogramme standard des bactéries vaginaux ont été présentés dans le tableau 21.

Les souches d'entérobactérie montrent une résistance vis-à-vis de la moitié des antibiotiques testés. Cette résistance est importante vis-à-vis de l'amoxicilline, ticarcycline, céfalotine, kanamycine, tobramycine, métronidazole, Triméthoprime/Sulfaméthoxazole et la colistine. On note néanmoins une sensibilité importante vis-à-vis de l'imipinème, pipéracilline, ciprofloxacine, chloramphénicol et nitrofurantoïne.

Les souches de *Serratia marcesens*, *Citrobacter freundii* et *Enterococcus faecalis* qui se sont montrées les plus résistantes sont des souches isolées chez des femmes non enceintes à aspect symptomatiques.

Tableau 21. Résultats d'antibiogramme standard des entérobactéries et entérocoques (*Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, Enterococcus*)

Antibiotiques	R		I		S	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
CRO	25	38,46	8	12,30	32	49,23
AMC	65	100	0	0	0	0
FOX	27	41,53	4	6,15	34	52,30
IMP	6	9,23	12	18,46	47	72,30
TIC	65	100	0	0	0	0
PIP	0	0	7	10,77	58	89,23
CRO	13	20	11	16,92	41	63,07
CAZ	39	60	4	6,15	22	33,84
CF	65	100	0	0	0	0
AM	12	18,46	12	18,46	41	63,07
OFX	29	44,61	4	6,15	26	40
CIP	11	16,92	6	9,23	48	73,84
C	0	0	0	0	65	100
K	65	100	0	0	0	0
TM	56	86,15	7	10,77	2	3,07
GM	32	49,23	4	6,15	29	44,61
F	2	3,07	7	10,76	56	86,15
MT	65	100	0	0	0	0
NA	23	35,38	7	10,77	35	53,84
SXT	46	70,76	2	3,07	17	26,15
CT	51	78,64	6	9,23	8	12,30

1.2.2.2. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des *Pseudomonas*

6 souches de *P. aeruginosa* ont été isolées au cours de cette étude, dont les pourcentages de résistance sont portés dans le tableau 22.

La résistance de ces isolats reste relativement faible à tous les antibiotiques testés à l'exception de la tobramycine (83,33%) et la ticarcylone (66,66%). Aucune résistance n'est détectée pour la colistine, l'amikacine, la ciprofloxacine, la gentamicine et le céftazidime.

Tableau 22. Résultats d'antibiogramme standard des souches de *Pseudomonas aeruginosa*.

Antibiotiques	R		I		S	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
TIC	4	66,66	1	16,66	1	16,66
CAZ	0	0	2	33,33	4	66,66
IMP	1	16,66	2	33,33	3	50
PIP	2	33,33	0	0	4	66,66
CT	0	0	1	16,66	5	83,33
AK	0	0	0	0	6	100
CIP	0	0	2	33,33	4	66,66
GM	0	0	1	16,66	5	83,33
TM	5	83,33	0	0	1	16,66

1.2.2.3. Etude de la sensibilité aux antibiotiques des *Staphylococcus aureus*

Parmi les 9 souches de *Staphylococcus* isolées, uniquement 6 souches appartenant à *S. aureus* ont été caractérisés pour leur profil de résistance en vue de sélectionner la plus résistante pour l'utiliser comme indicatrice.

Tableau 23. Résultats de l'antibiogramme standard des souches de *Staphylococcus aureus*

Antibiotiques	R		I		S	
	Effectif	%	Effectif	%	Effectif	%
VA	1	16,66	1	16,66	4	66,66
P	6	100	0	0	0	0
OX	2	33,33	2	33,33	2	33,33
PT	3	50	1	16,66	2	33,33
MT	6	100	0	0	0	0
GM	2	33,33	2	33,33	2	33,33
K	6	100	0	0	0	0
RA	5	83,33	0	0	1	16,66
TE	5	83,33	0	0	1	16,66
F	4	66,66	1	16,66	1	16,66

Les isolats de *S. aureus* montrent une grande résistance vis-à-vis de la majorité des antibiotiques testés à savoir les rifamycines, les tétracyclines et les furanes.

Une résistance totale a été également détectée vis-à-vis de la pénicilline, le métronidazole et la kanamycine.

Néanmoins, on note une bonne sensibilité vis-à-vis de la vancomycine (66,66%) (tableau 23).

Les souches de *S. aureus* qui se sont montrées les plus résistantes sont des souches isolées chez des femmes non enceintes à aspect symptomatique.

Les figures 18 et 19 illustrent le profil d'antibiorésistance de certaines bactéries vaginales potentiellement pathogènes.

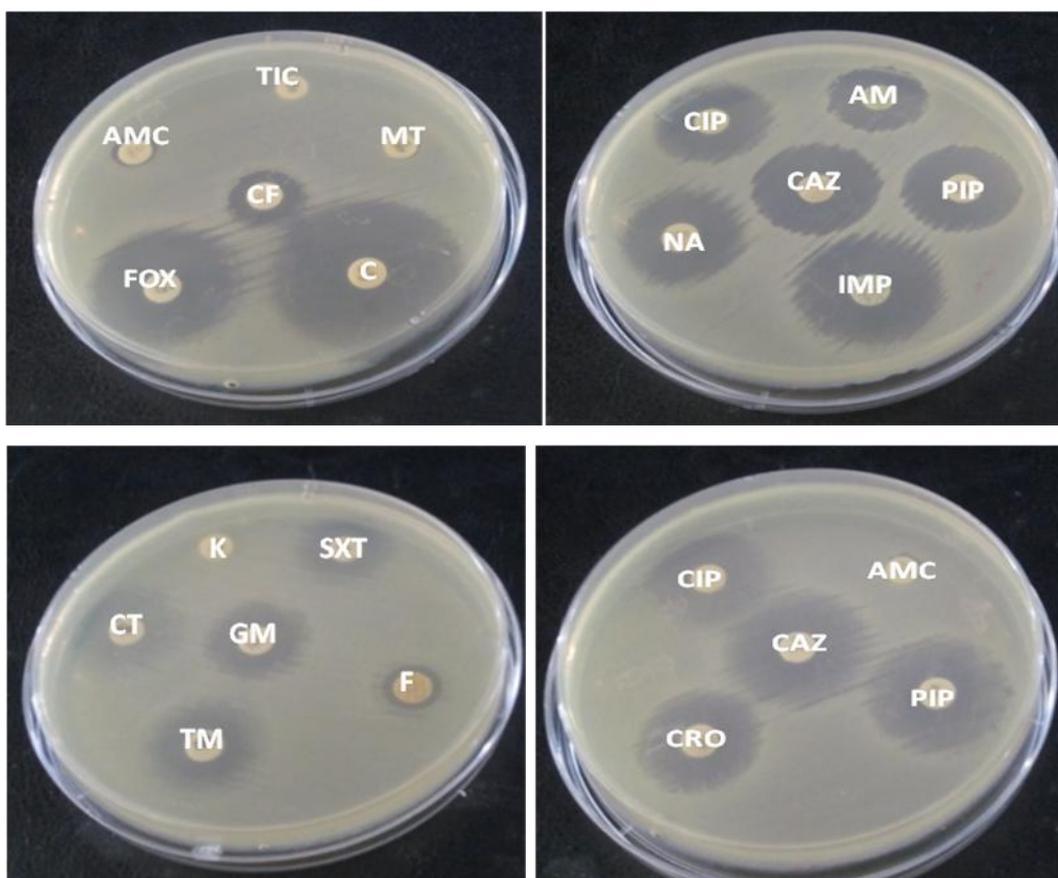


Figure 18 : Antibiogramme standard de la souche *Klebsiella oxytoca* SI3

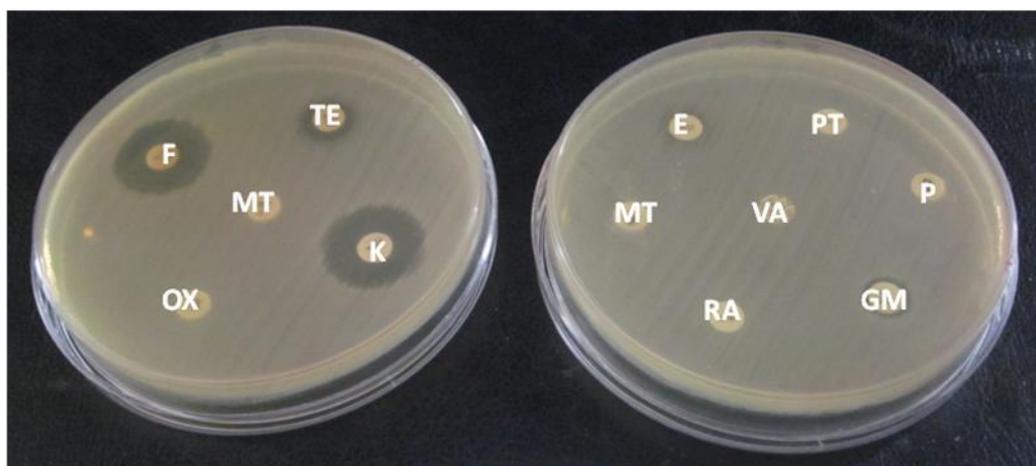


Figure 19 : Antibiogramme standard de la souche *Staphylococcus aureus* SI10.

1.3. Caractérisation des levures isolées

1.3.1. Morphologie

Les 22 souches de levures isolées sur milieu sabouraud apparaissent sous forme de colonies blanches - crémeuses de 1 à 2 mm de diamètre et sous forme de cellules arrondies ou ovoïdes sous microscope optique, morphologie caractéristique au genre *Candida*.

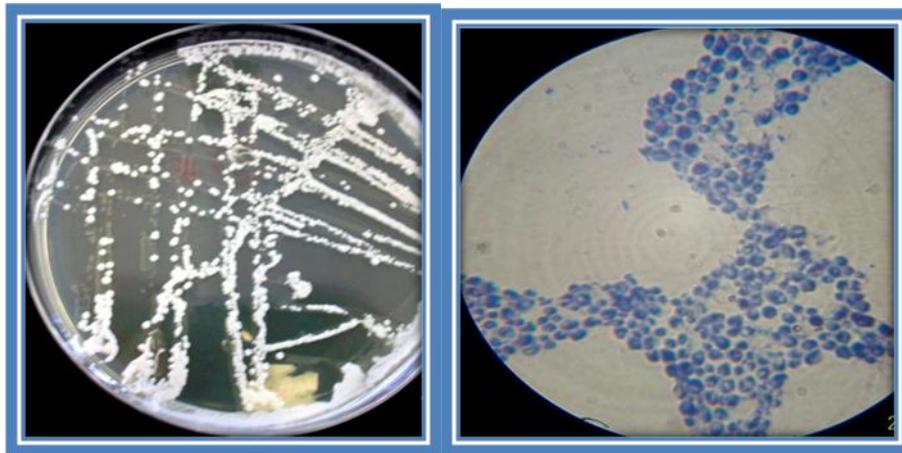


Figure 20 : Aspect macroscopique et microscopique (coloration au bleu de méthylène GX100) de *Candida albicans* L2.

1.3.2. Test de filamentation

Parmi les 22 souches de *Candida* isolées, 16 ont présentés un résultat positif au test de filamentation suggérant leur appartenance à l'espèce *Candida albicans*.

1.3.3. Antifongigramme

La CMI par macro-dilution a été effectuée pour l'antifongique fluconazole. Les 16 souches appartenant à *C. albicans* ont présenté une sensibilité totale à l'antifongique testé (CMI ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$). Par contre, les souches de *Candida* non *albicans* ont présenté un profil de résistance (CMI ≥ 256 $\mu\text{g/ml}$).

Parmi les levures pré-identifiées, nous avons sélectionnées deux *C. albicans* et deux *Candida sp.* pour l'identification moléculaire.

1.3.4. Identification moléculaire des levures sélectionnées

1.3.4.1. Amplification des régions intergéniques ITS1 et ITS4

Après migration électrophorétique des amplifiats des régions intergéniques ITS1 et ITS4, on a pu constater deux niveaux de migration: 2 bandes de 800 bp et 2 bandes de 500 bp (figure 21).

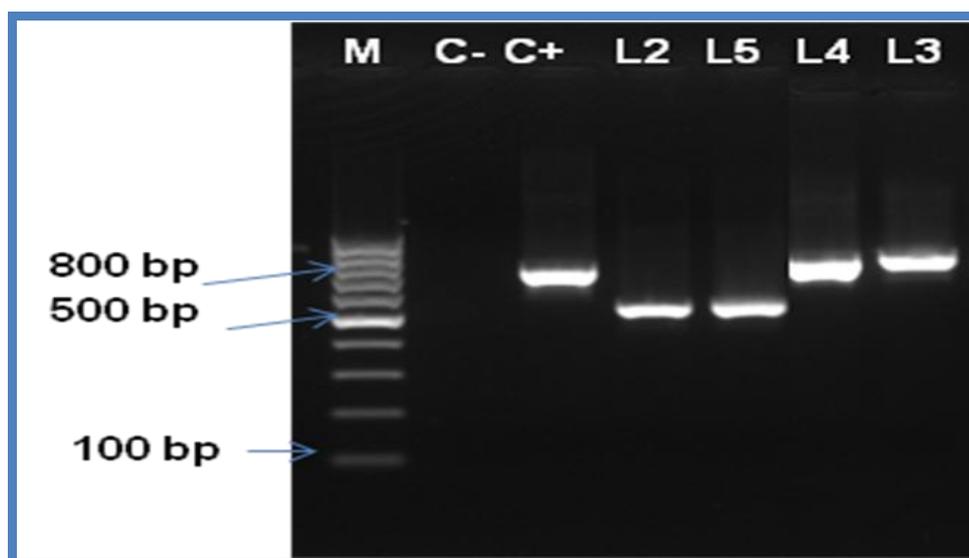


Figure 21: Amplification des régions intergéniques ITS1 et ITS4 chez les levures sélectionnées

M : marqueur de taille (100 bp), C-: contrôle négatif ; C+: contrôle positif ;
L2 : *Candida sp.* L2 ; L3 : *Candida sp.* L3 ; L4 : *Candida sp.* L4 ; L5 : *Candida sp.* L5.

1.3.4.2. Séquençage des produits PCR

Le séquençage a révélé l'appartenance des souches *Candida sp.* L2 et L5 (taille d'amplifiat 500 bp) à *Candida albicans*. Tandis que les souches *Candida sp.* L3 et L4 (taille d'amplifiat 800bp) appartiennent à *Candida glabrata* (tableau 24).

Tableau 24 : Résultats de séquençage des régions intergéniques ITS1-ITS4

Isolats de levure (abréviation)	Identification	% d'homologie	N° d'accession des souches les plus proches
L2	<i>Candida albicans</i>	98%	<i>Candida albicans</i> SC5314 (NW 139715)
L3	<i>Candida glabrata</i>	97%	<i>Candida glabrata</i> CBS 138 (NC_006035)
L4	<i>Candida glabrata</i>	99%	<i>Candida glabrata</i> CBS 138 (NC_006035)
L5	<i>Candida albicans</i>	99%	<i>Candida albicans</i> SC5314 (NW 139715)

1.4. Caractérisation des lactobacilles isolés de différents biotopes

1.4.1. Caractérisation phénotypique

Plusieurs aspects macroscopiques des souches appartenant au genre *Lactobacillus* ont été observés sur les milieux de culture MRS et LAMVAB (figure 22).

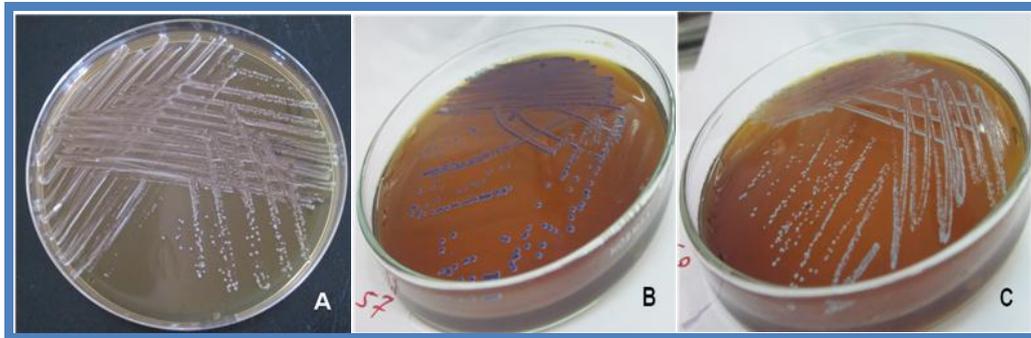


Figure 22: Aspect macroscopique de quelques souches de *Lactobacillus* sp. de différents biotopes sur MRS agar (A) et milieux LAMVAB (B, C).

Parmi les bacilles à Gram positifs isolés, 100 souches ont été pré-identifiées *Lactobacillus*, dont la répartition selon le biotope est représentée dans la figure 23.

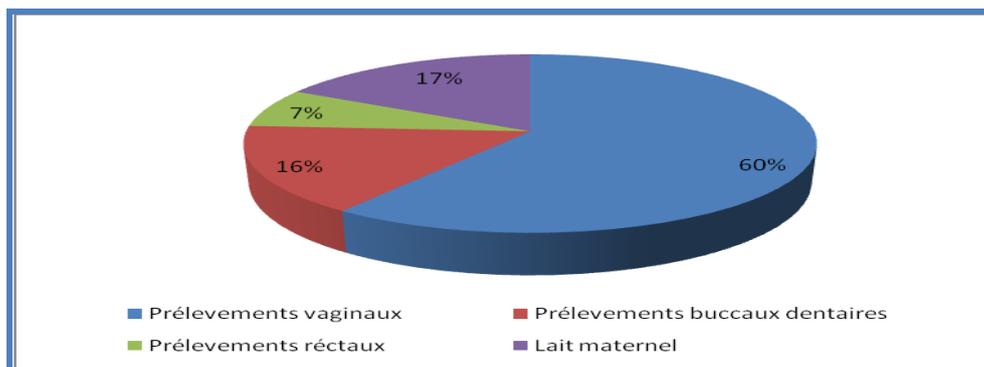


Figure 23: Répartition des lactobacilles isolés selon le type de prélèvement

1.4.2. Antibiogramme

La sensibilité aux antibiotiques des souches de lactobacilles isolées a été étudiée par la méthode de diffusion sur gélose.

Des taux élevés de résistance ont été observés pour l'optochine, l'acide nalidixique, le métronidazole, la péfloxacine, la kanamycine, la colistine et la vancomycine.

Alors que tous les isolats sont sensibles à la bacitracine, la tétracycline, l'érythromycine, la Pristinamycine, lincomycine et rifampicine, à l'exception de 90,9% à l'ampicilline et 45,45% à la pénicilline G.

Les profils à la streptomycine et la gentamycine sont variables selon l'espèce (figure 24). Les souches *Lactobacillus sp.* LB57 et *Lactobacillus sp.* LB44-1 ont montré des profils identiques à tous les antibiotiques testés.

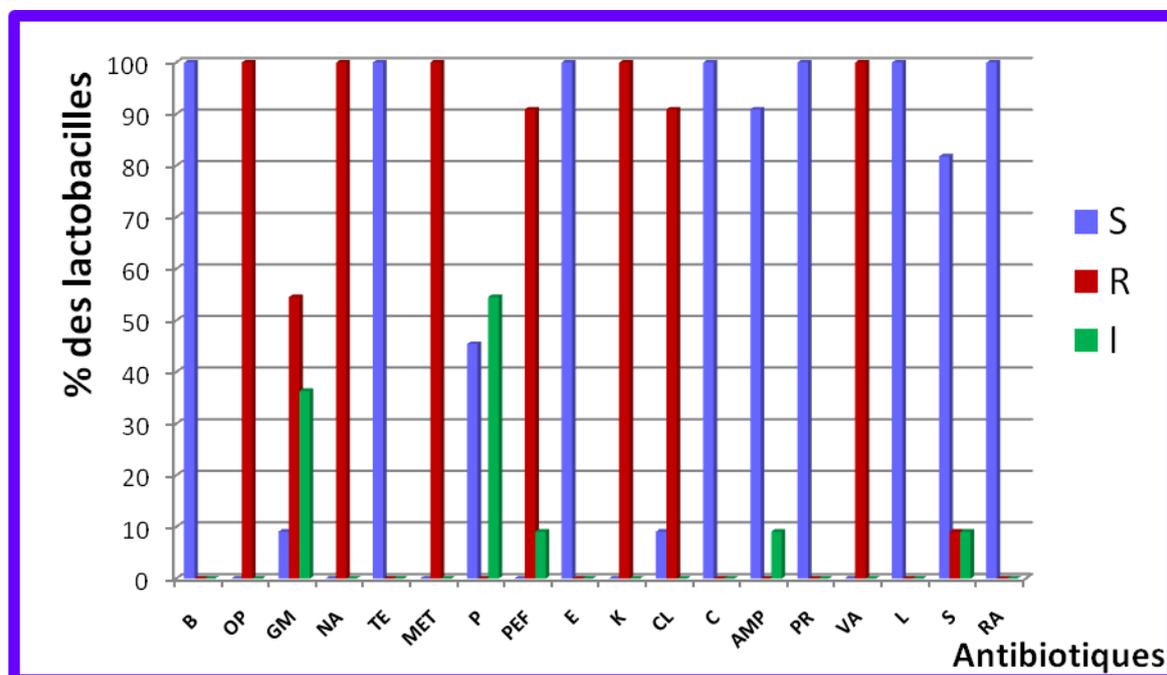


Figure 24: profil d'antibiorésistance des souches appartenant au genre *Lactobacillus*

Chapitre 2
Sélection des lactobacilles à propriétés
probiotiques

2.1. Inhibition de la croissance des microorganismes uropathogènes

2.1.1. Détection de l'activité antimicrobienne par diffusion sur gélose (technique des disques)

Cette technique nous a permis de sélectionner les souches de lactobacilles à fort et moyen pouvoir inhibiteur vis-à-vis des souches indicatrices (*Escherichia coli* SI1, *Klebsiella oxytoca* SI3, *Staphylococcus aureus* SI8 et *Candida albicans* L2) (figure 25).

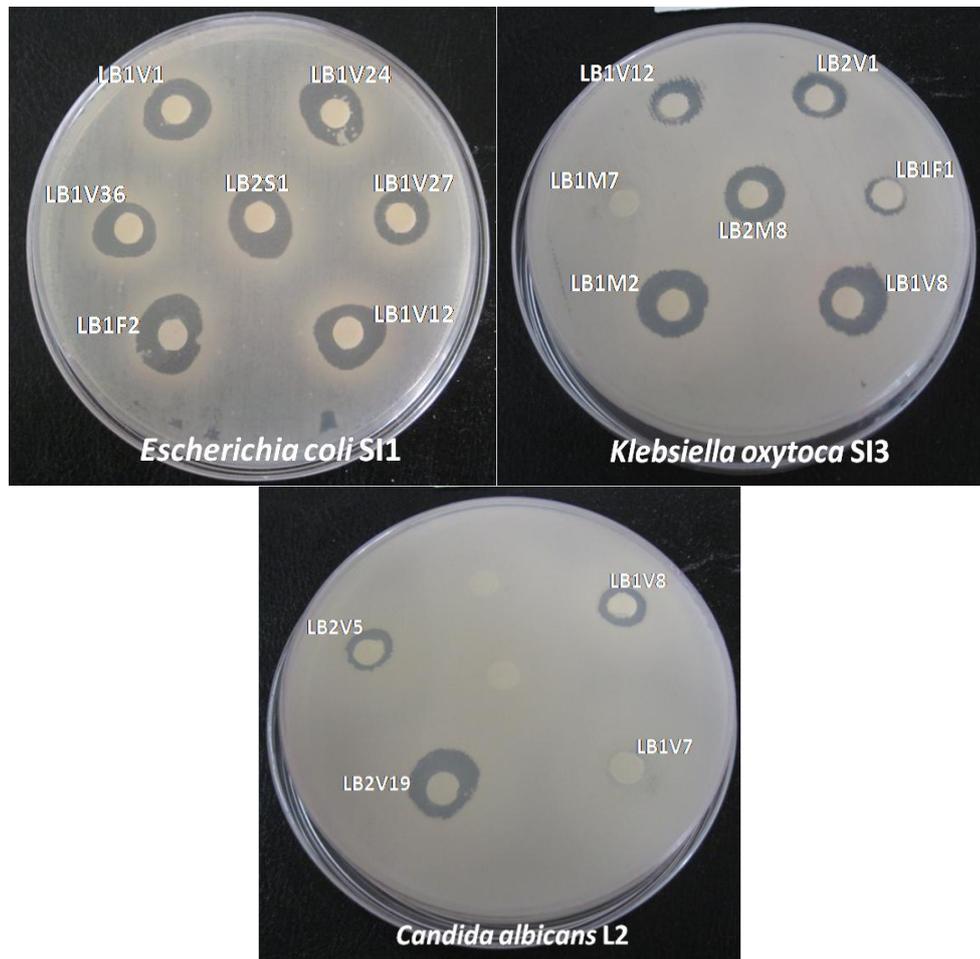


Figure 25 : Zones d'inhibition par les lactobacilles vis-à-vis d'*Escherichia coli* SI1, *Klebsiella oxytoca* SI3 et *Candida albicans* L2 (technique des disques).

Selon l'origine des prélèvements, les lactobacilles vaginaux ont présenté l'activité inhibitrice la plus importante (19,16%), suivi par les lactobacilles du lait maternel et des prélèvements rectaux chez les nourrissons allaités au sein (17,64% et 14,28% respectivement). Par contre, les lactobacilles d'origine bucco-dentaire ont présenté l'activité inhibitrice la plus faible (7,8%) (figure 26).

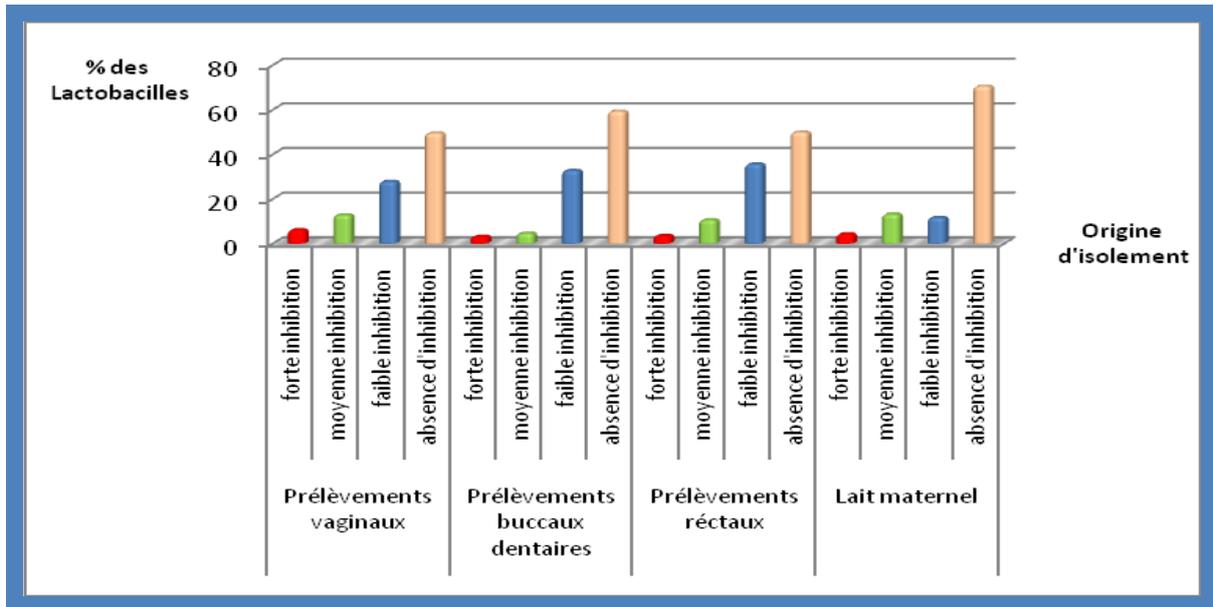


Figure 26: Répartition des lactobacilles à pouvoir inhibiteur selon l'origine des prélèvements

Une activité antimicrobienne forte ($\varnothing \geq 15\text{mm}$) a été signalée chez 9% des lactobacilles isolées vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* SI8. Aussi bien, chez 8% des Lactobacilles vis-à-vis d'*E. coli* SI1 (figure 27).

Les souches de lactobacilles à forte et moyenne activité inhibitrice ($\varnothing \geq 10\text{mm}$) ont été sélectionnées pour le reste de l'étude (figure 27).

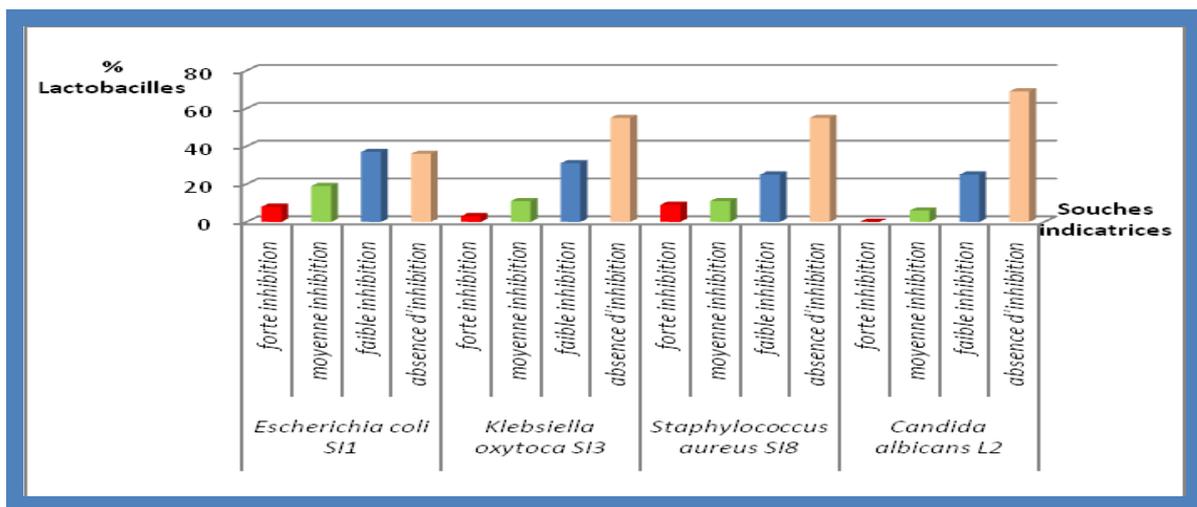


Figure 27: Répartition des lactobacilles de différents biotopes à fort potentiel inhibiteur vis-à-vis des souches indicatrices.

Le tableau 25 présente les 30 souches de lactobacilles pré-sélectionnées selon l'importance de leur pouvoir inhibiteur.

Tableau 25: Zones d'inhibition de lactobacilles pré-sélectionnés à pouvoir inhibiteur important (technique des disques).

Souches pré-sélectionnés		Origine d'isolement	Diamètre d'inhibition (mm)			
N° de souche	N° d'origine		<i>Escherichia coli</i> SI1	<i>Klebsiella oxytoca</i> SI3	<i>Staphylococcus aureus</i> SI8	<i>Candida albicans</i> L2
LB1V1	LB12	Prélèvement vaginal	13	8	13	9
LB2V1	LB84	Prélèvement vaginal	14	9	15	8
LB1V5	LB24	Prélèvement vaginal	14	8	16	8
LB2V5	LB55	Prélèvement vaginal	15	13	14	9
LB1V7	LB29	Prélèvement vaginal	13	8	6	6
LB1V8	LB49	Prélèvement vaginal	15	14	9	8
LB2V8	LB51	Prélèvement vaginal	14	8	12	8
LB1V11	LB40	Prélèvement vaginal	12	6	6	6
LB1V12	LB33	Prélèvement vaginal	12	8	9	6
LB1V19	LB57	Prélèvement vaginal	15	14	14	6
LB2V19	LB39	Prélèvement vaginal	15	13	16	13
LB1V24	LB59	Prélèvement vaginal	13	15	14	9
LB1V28	LB30	Prélèvement vaginal	13	9	8	9
LB2V28	LB60	Prélèvement vaginal	14	8	13	13
LB1V29	LB62	Prélèvement vaginal	14	9	8	9
LB1V36	LB72	Prélèvement vaginal	12	14	15	9
LB1V37	LB74	Prélèvement vaginal	15	13	9	14
LB1V40	LB80	Prélèvement vaginal	14	9	6	6
LB1V43	LB81	Prélèvement vaginal	15	25	15	14
LB1V45	LB37-1	Prélèvement vaginal	13	8	8	6
LB1V46	LB44-1	Prélèvement vaginal	15	7	14	6
LB1V47	LB79	Prélèvement vaginal	6	15	13	6
LB2S1	LB82	Prélèvement bucco-dentaire	14	13	15	6
LB1S6	LB89	Prélèvement bucco-dentaire	14	8	7	6
LB1S11	LB65	Prélèvement bucco-dentaire	8	7	15	9
LB1F2	LB21	Prélèvement rectal	14	14	14	14
LB1M2	LB90	Lait maternel	15	13	14	13
LB1M9	LB94	Lait maternel	14	9	14	6
LB1M12	LB97	Lait maternel	9	13	15	9
LB2M12	LB86	Lait maternel	14	13	15	14

2.1.2. Détermination de l'activité antimicrobienne vis-à-vis de 19 souches indicatrices (Technique des puits)

Avant de mettre en évidence la nature des molécules inhibitrices chez les lactobacilles sélectionnés, la confirmation du pouvoir inhibiteur a eu lieu par la technique des puits vis-à-vis de 19 souches indicatrices (figure 28).

Le pouvoir inhibiteur des lactobacilles sélectionnés vis-à-vis des 19 souches indicatrices est représenté dans la figure 29.

Les souches LB84, LB24, LB55, LB57, LB30, LB62, LB72, LB80, LB81, LB37-1, LB44-1, LB79, LB82, LB89, LB65 et LB86 inhibent plus de 80% des souches indicatrices avec des diamètres d'inhibition supérieur à 14 mm.

Nos résultats montrent que les souches de lactobacilles sélectionnées ont un pouvoir inhibiteur (fort ou moyen) vis-à-vis de tous les pathogènes étudiés (figure 30).

Une deuxième sélection a été effectuée afin de choisir les lactobacilles à pouvoir inhibiteur le plus important, dix souches ont été retenues pour caractériser leurs molécules inhibitrices.

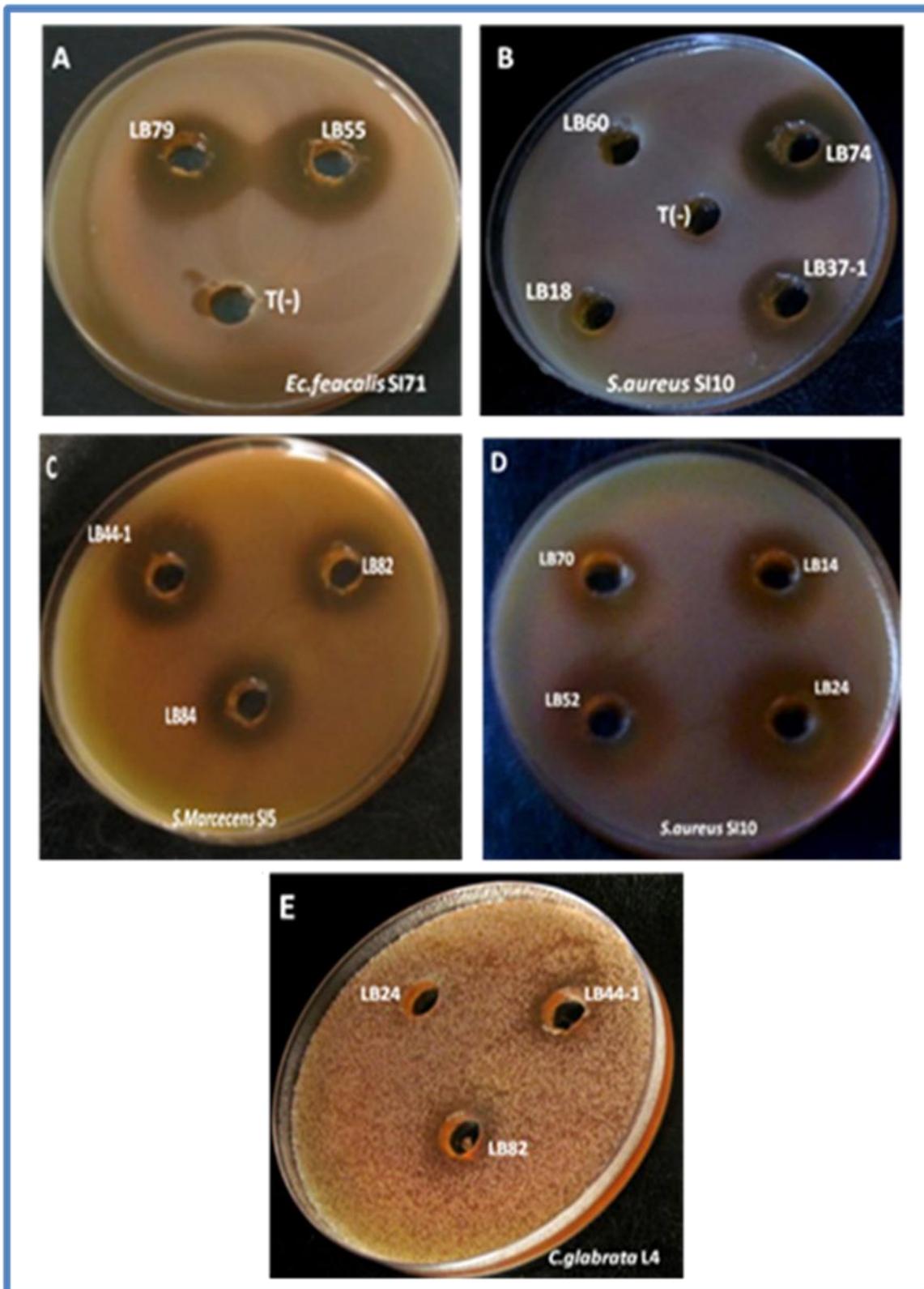


Figure 28: Activité inhibitrice du CFS de lactobacilles vis-à-vis de *Ec. faecalis* SI71 (A), *S. aureus* SI10 (B, D), *S. marcescens* SI5 (C) et *C. glabrata* L4 (E).

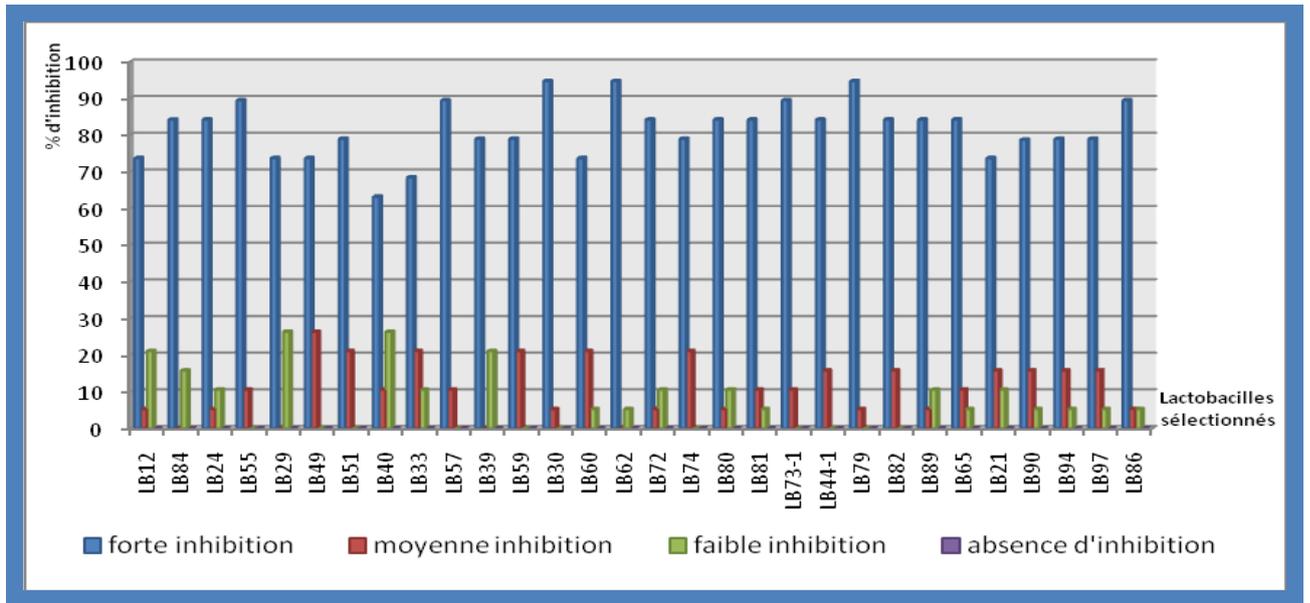


Figure 29: Pouvoir inhibiteur des CFS des lactobacilles sélectionnés

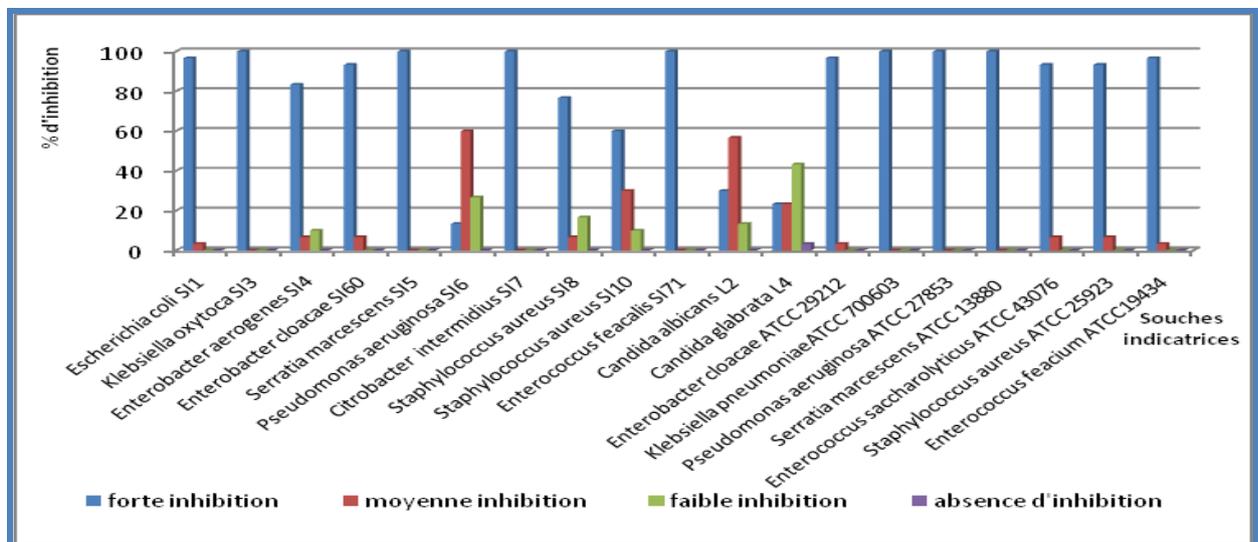


Figure 30: Spectre d'inhibition des lactobacilles à pouvoir inhibiteur

2.1.3. Mise en évidence des molécules inhibitrices (Technique des puits)

Le CFS de chaque lactobacille a subi des traitements différents afin de mettre en évidence les molécules inhibitrices (figure 31).

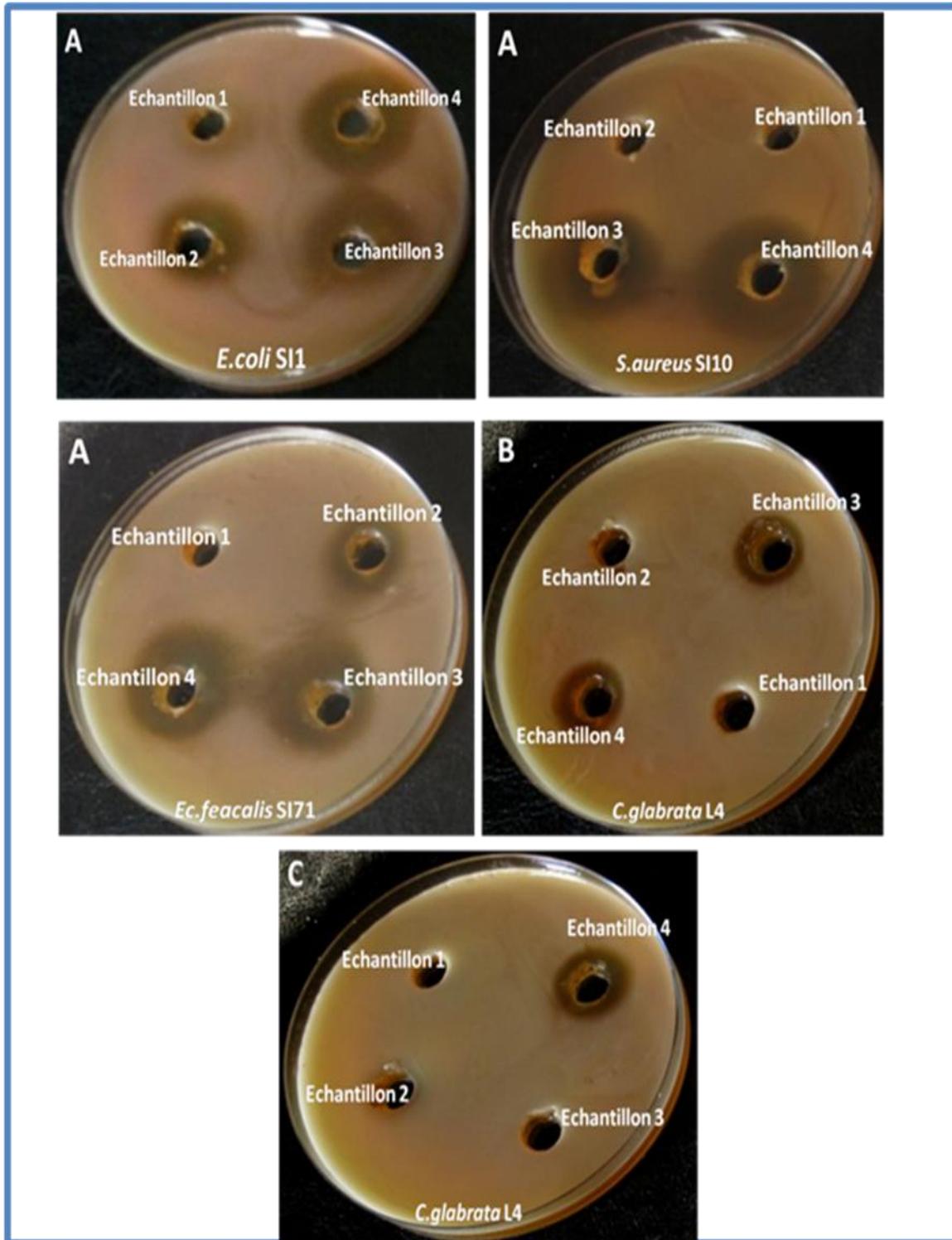


Figure 31: Activité inhibitrice du surnageant après traitement des souches de lactobacilles (LB24: A, LB57: B, LB30: C) vis-à-vis de certaines souches pathogènes. (Echantillon 1: CFS + NaOH+ Catalase, Echantillon 2: CFS + NaOH+ Proteinase K, Echantillon 3: CFS + Catalase + Proteinase K, Echantillon 4: CFS).

D'après les résultats obtenus, toutes les souches de lactobacilles testées ne présentent pas de zones d'inhibition pour les échantillons à pH ajusté à 6,5 avec addition de catalase; mais ils affichent des zones d'inhibition après le traitement avec la protéinase K, ce qui prouve que l'activité antagoniste est due à l'acide et au peroxyde d'hydrogène soit une inhibition de remplacement ou bien simultanée (tableau 26, figure 32).

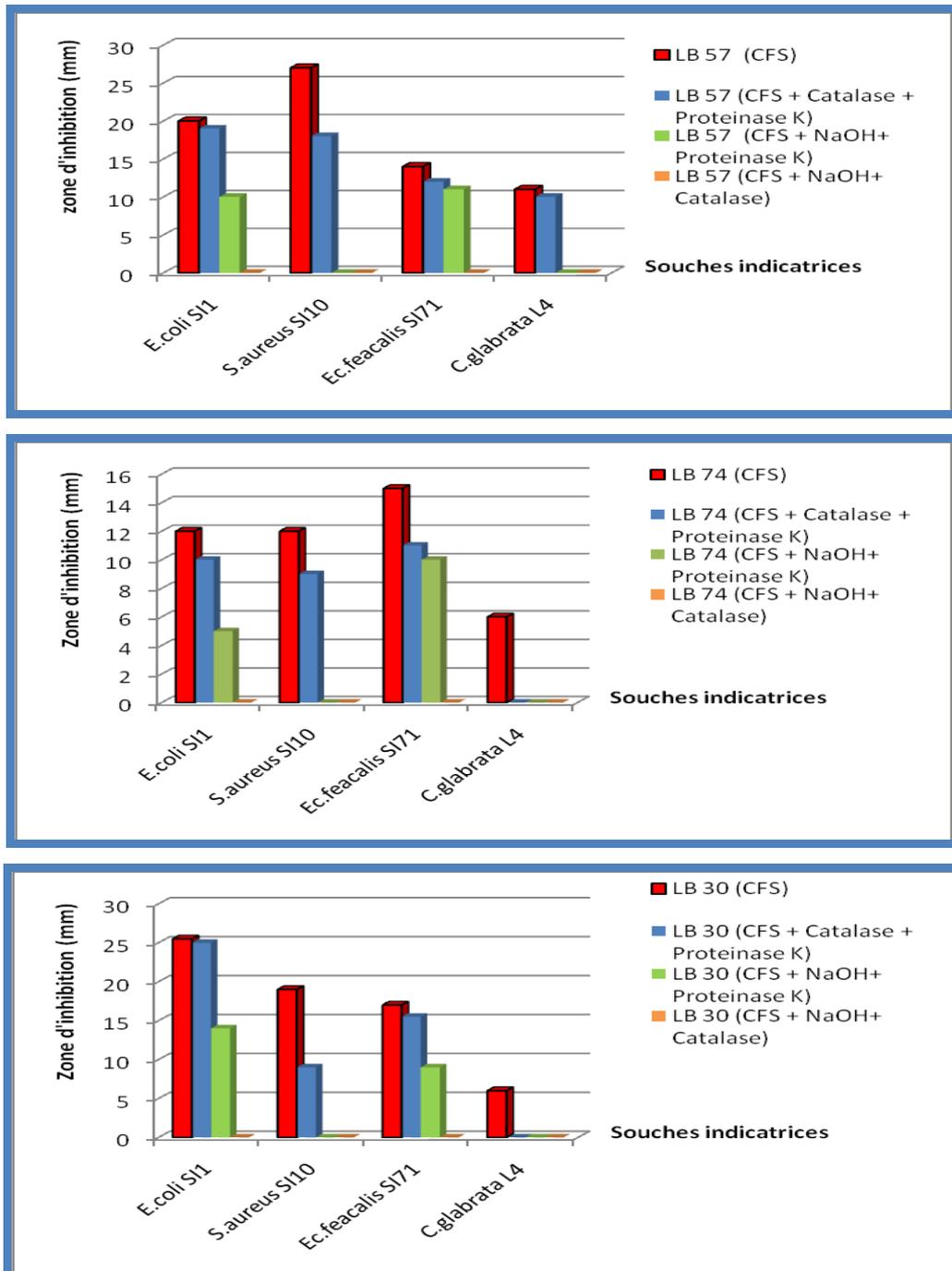


Figure 32: Résultats de mise en évidence des molécules inhibitrices dans les surnageants des lactobacilles LB57, LB74 et LB30.

L'activité antimicrobienne de *Lactobacillus sp.* (LB55, LB84, LB62, LB44-1 et LB37-1) était due uniquement à la production d'acide lactique. Tandis que L'activité antagoniste de *Lactobacillus sp.* (LB74, LB82, LB57, LB30 et LB79) est due à l'inhibition simultanée de l'acide et du peroxyde d'hydrogène (figure 32).

Dans la présente étude, l'activité inhibitrice des souches de lactobacilles sélectionnés s'est observée pour les bactéries pathogènes; mais aussi pour les levures *C. glabrata* et *C. albicans*.

La caractérisation de la nature des molécules inhibitrices chez les lactobacilles sélectionnées a été détaillée dans le tableau 26.

Tableau 26. Activité antimicrobienne du CFS (sous différents traitements) des lactobacilles sélectionnés.

N° de souche	N° d'origine	Molécules inhibitrices (A mettre en évidence)	Conditions de culture	Souches indicatrices							
				<i>E.coli</i> SI1		<i>S.aureus</i> SI10		<i>Ec.feacalis</i> SI71		<i>C.glabrata</i> L4	
				Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)
LB2S1	LB 82		CFS	22	14	27	19	20	12	13	5
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	20	12	22	14	18	10	12	4
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	19	11	8	0	8	0	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB1V29	LB 62		CFS	27,5	19,5	28,5	20,5	25	17	15,5	7,5
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	26	18	25	17	24	16	15,5	7,5
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	23	15	8	0	16	8	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB1V19	LB 57		CFS	28	20	35	27	22	14	19	11
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	27	19	26	18	20	12	18	10
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	18	10	8	0	19	11	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB2V5	LB 55		CFS	27	19	26	18	19	11	15,5	7,5
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	17	9	17	9	17	9	15,5	7,5
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	8	0	8	0	8	0	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB1V37	LB 74		CFS	20	12	20	12	23	15	14	6
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	18	10	17	9	19	11	8	0
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	13	5	8	0	18	10	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB2V1	LB 84		CFS	27	19	26	18	17,5	9,5	18	10
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	17	9	24	16	17	9	8	0
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	8	0	8	0	8	0	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0

CFS : Cell- Free Supernageant; Ø(mm): Diamètre d'inhibition en millimètre; Zi(mm): Zone d'inhibition en millimètre.

Tableau 26 (suite 1): Activité antimicrobienne du CFS (sous différents traitements) des lactobacilles sélectionnés.

N° de souche	N° d'origine	Molécules inhibitrices (A mettre en évidence)	Conditions de culture	Souches indicatrices							
				<i>E.coli</i> SI1		<i>S.aureus</i> SI10		<i>Ec.feacalis</i> SI71		<i>C.glabrata</i> L4	
				Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)	Ø(mm)	Zi(mm)
LB1V28	LB30		CFS	33,5	25,5	27	19	25	17	14	6
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	33	25	17	9	23,5	15,5	8	0
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	22	14	8	0	17	9	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB145	LB 37-1		CFS	27	19	17,5	9,5	19	11	13	5
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	22	14	17	9	17	9	12	4
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	8	0	8	0	8	0	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB1V47	LB 79		CFS	27	19	26	18	15	7	16	8
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	27	19	18	10	15	7	8	0
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	25	17	8	0	14	6	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0
LB1V46	LB 44-1		CFS	22	14	26	18	20	12	13	5
		Acides organiques	CFS + Catalase + Proteinase K	20	12	24	16	18	10	12	4
		Peroxyde d'hydrogène	CFS + NaOH+ Proteinase K	19	11	8	0	13	5	8	0
		bactériocine	CFS + NaOH+ Catalase	8	0	8	0	8	0	8	0

2.2. Activité de l'arginine désaminase, pouvoir acidifiant, production du peroxyde d'hydrogène et production d'exopolysaccharides

D'après les résultats obtenus par les tests de quantification de l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène, une production appréciable et à des degrés différents selon les isolats a été notée (tableau 27, figure 33).

La capacité des souches de *Lactobacillus* à hydrolyser l'arginine est variable (Tableau 27). Seules les espèces LB82, LB57, LB30, LB74 et LB79 ont montré une activité positive.

La production d'exopolysaccharides a été détectée chez 80% des souches de lactobacilles sélectionnées (tableau 27). Parmi eux, 7 souches ont produit plus de 100 mg/l d'EPS solubles. *Lactobacillus sp.* LB 74 et *Lactobacillus sp.* LB 30 ont produits respectivement 1150 et 1010 mg /l d'EPS solubles.

Tableau 27: Activité de l'arginine désaminase, pouvoir acidifiant, production du peroxyde d'hydrogène et production d'exopolysaccharides

N° de souche	N° d'origine	Δ pH	Activité de l'arginine dihydrolase	Production H ₂ O ₂	Production EPS (mg/l)
LB2S1	LB 82	2,50± 0,16	+	++	165,02±0,02
LB1V29	LB 62-1	2,71± 0,04	-	+	-
LB1V19	LB 57	2,71± 0,01	+	+	325±0,005
LB2V5	LB55	2,70± 0,02	-	-	-
LB1V37	LB 74	2,62± 0,03	+	++	1150,04±0,04
LB2V1	LB 84	2,65± 0,04	-	-	345,02±0,04
LB1V28	LB 30	2,59± 0,03	+	+++	1010,03±0,04
LB1V45	LB 37-1	2,68± 0,03	-	-	150,04±0,04
LB1V47	LB 44-1	2,71± 0,01	+	+	90,07±0,06
LB1V46	LB 79	2,69± 0,04	-	+++	430,02±0,02

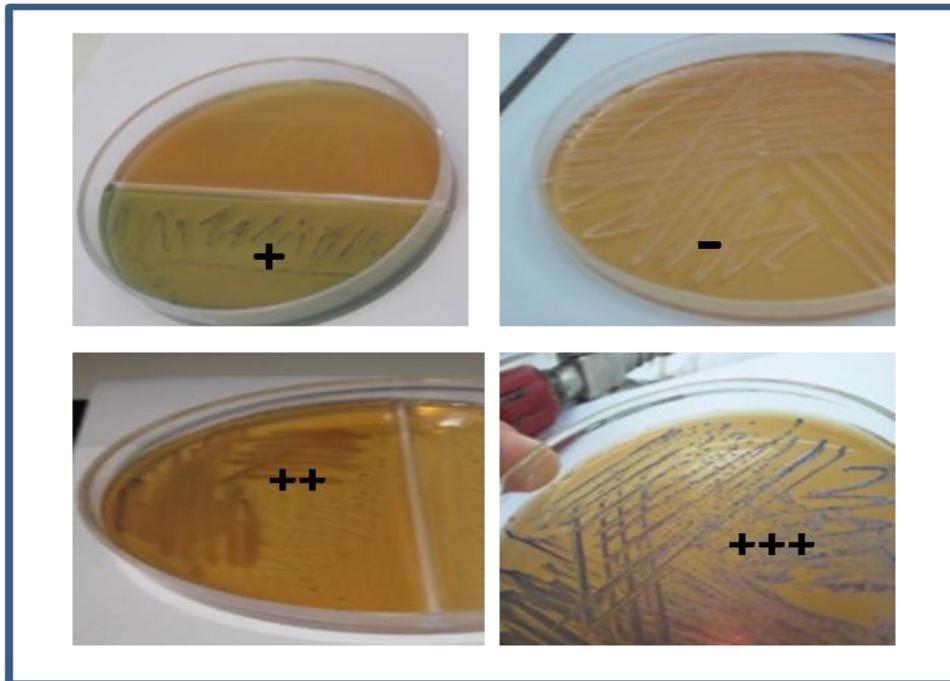


Figure 33: Couleur des colonies de lactobacilles producteurs du peroxyde d'hydrogène

(+++ : forte production ; ++ : production moyenne ; + : production faible ; - : pas de production).

2.3. Formation de biofilm sur les micro-plaques de polystyrène

La capacité de formation de biofilm par les souches de *Lactobacillus* sélectionnées est illustrée dans la figure 34.

Les résultats indiquent que chaque souche présente un potentiel différent pour former un biofilm dans les mêmes conditions d'expérimentation. Les souches ayant formé des biofilms importants sont LB30, LB74, LB84 et LB44-1.

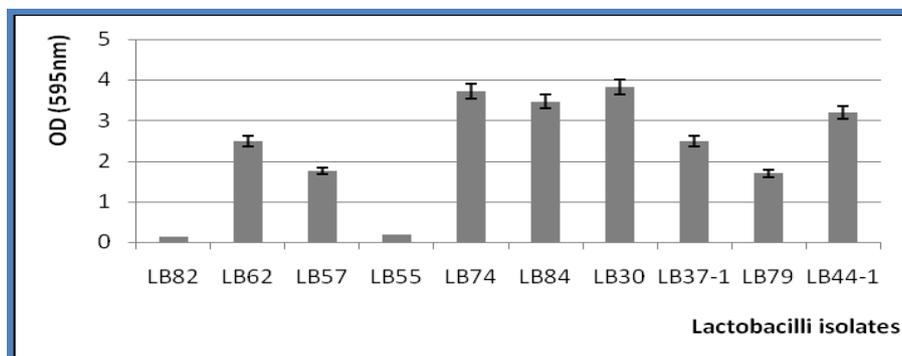


Figure 34: Niveaux de biofilms formés sur microplaques de polystyrène par les lactobacilles sélectionnés.

2.4. Inhibition de la formation de biofilms des microorganismes uropathogènes

Le surnageant exempt de cellules (CFS) des souches de lactobacilles sélectionnée a été testé pour sa capacité à inhiber la formation de biofilm de *K. pneumoniae* SI2, *P. aeruginosa* SI6, *C. albicans* L2 et *C. glabrata* L4.

Une inhibition importante de la formation de biofilm a été observée quand les cultures de souches indicatrices ont été mélangées avec le CFS.

Une réduction de plus de 50% dans la liaison au cristal violet a été observée dans le cas de *K. pneumoniae* SI2, *C. albicans* L2 et *C. glabrata* L4. Les souches de lactobacilles les plus inhibitrices sont *Lactobacillus* sp. LB44-1, LB 57 et LB74.

Dans le cas du *P. aeruginosa* SI6, la réduction de l'adhérence est supérieure à 80%, les souches les plus inhibitrices sont *Lactobacillus* sp. LB 82, LB 74, LB 44-1 et LB 30 (figure 35).

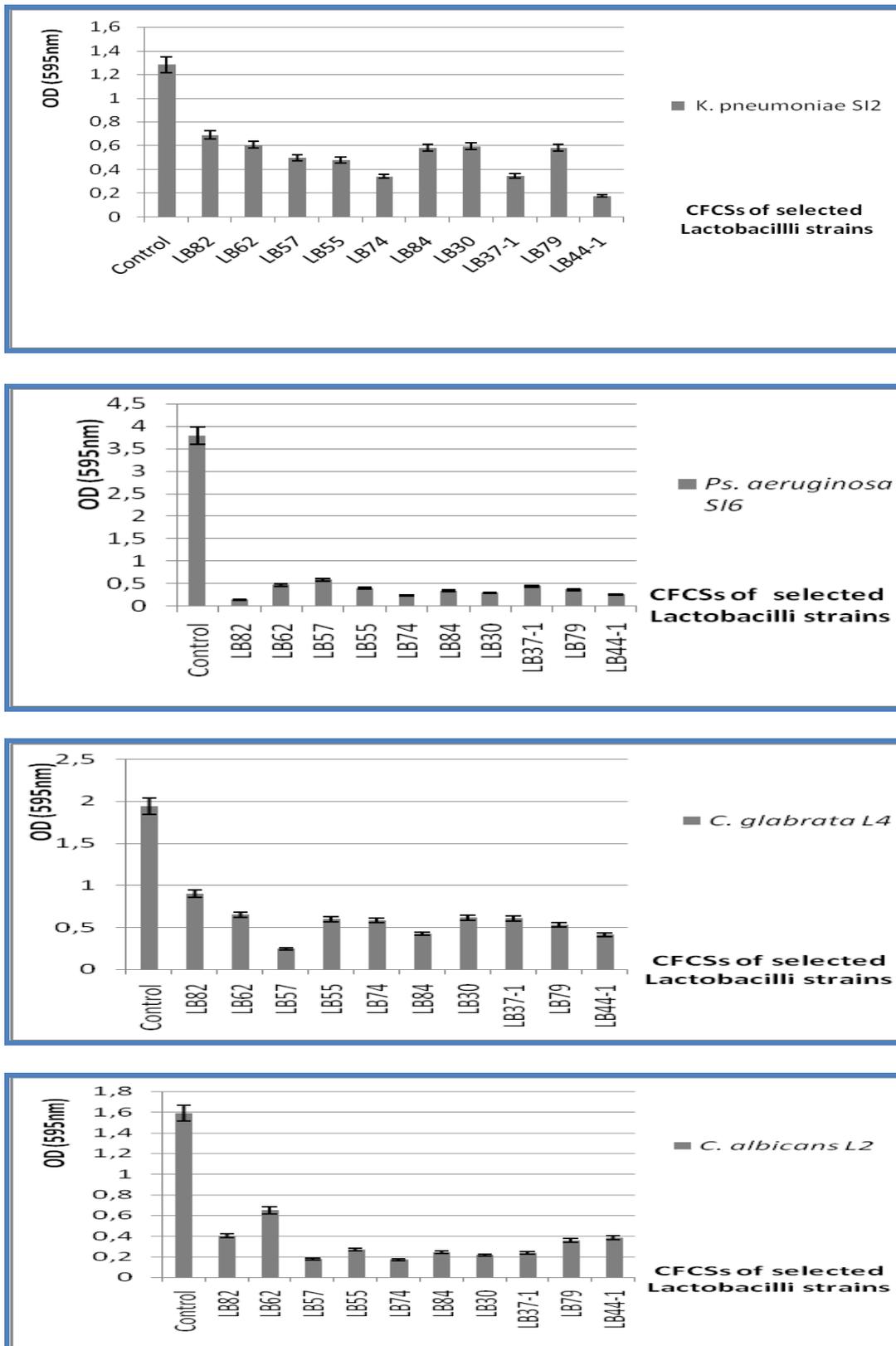


Figure 35: Résultats d'inhibition de biofilms des microorganismes uropathogènes (*K. pneumoniae* SI2; *Ps. aeruginosa* SI6; *C. glabrata* L4; *C. albicans* L2) par le CFS des lactobacilles sélectionnés.

2.5. Résistance à différentes concentrations de métronidazole, clindamycine et fluconazole

Un niveau élevé de résistance au métronidazole (CMI > 1024 µg/ml), clindamycine (CMI > 1024 µg/ml) et fluconazole (CMI > 1024 µg/ml) a été obtenu chez toutes les souches de *Lactobacillus* sélectionnées.

Ce caractère de résistance est un autre critère de sélection dans le choix des lactobacilles probiotiques vaginaux.

Chapitre 3

**Identification phénotypique et
moléculaire des lactobacilles à potentiel
probiotiques**

3.1. Identification biochimique par Système API 50 CHL (Bio Mérieux)

Les souches de lactobacilles ont été testées pour leur capacité à fermenter 49 hydrates de carbone à l'aide du système de API50CHL (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches fermentent le glucose, le fructose et le galactose. L'acide n'a pas été produit à partir de glycérol, érythritol, xylose, méthyl-βD-xylopyranoside, glycogène, fucose et arabinose. En outre, les souches ont montré des différences dans les capacités de fermentation de certains sucres. L'identification jusqu'à l'espèce est donnée par le logiciel Apilab Plus (la version 5.1; BioMérieux) (tableau 28).

D'autre part, les résultats des tests physiologiques (recherche du caractère homo-fermentaire/hétéro-fermentaire et la croissance à différentes températures) nous ont permis de classer les lactobacilles sélectionnés en trois groupes :

- *Lactobacillus sp.* LB82, LB57 et LB30 dans le groupe Betabacterium
- *Lactobacillus sp.* LB62-1, LB55, LB74, LB84 et LB37-1 dans le groupe Streptobacterium
- *Lactobacillus sp.* LB79 dans le groupe Thermobacterium (tableaux 28- 29).

Tableau 28. Résultats de caractérisation biochimique et physiologique des lactobacilles sélectionnés

Isolats	LB82	LB62	LB57	LB55	LB74	LB84	LB30	LB37-1-	LB79	LB44-1-
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
production d'indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate réductase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
production de gaz	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Croissance à 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 4% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 6,5% NaCl	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Croissance à 15 °C	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Croissance à 45 °C	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Test API 50 CHL:										
Glycerol	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	+/-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-adonitol	+/-	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-
Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	-	+	+	+	-	+	+/-	+
L-sorbose	-	+	+/-	-	-	+	-	-	-	+
L-Rhamnose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
inositol	-	+	+/-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-
D-Mannitol	+	+	-	+	+/-	+	-	+	-	+
D-Sorbitol	-	+	-	-	+/-	+	-	+	-	+
Methyl-D-Mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau28 (suite 1). Résultats de caractérisation biochimique et physiologique des lactobacilles sélectionnés

Isolats	LB82	LB62	LB57	LB55	LB74	LB84	LB30	LB37-1-	LB79	LB44-1-
Methyl-D-Glucopyranoside	-	+	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+
N-Acetylglucosamine	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Amygdaline	-	+	-	+	+/-	+/-	-	+/-	+	+
Arbutine	-	+	-	+	+/-	+	-	+	+	+
Esculine citrate de fer	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Salicine	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Maltose	+/-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	+/-
D-Lactose	+	+	+	+	+/-	+	-	+	-	+
D-Melibiose	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
D-Saccharose	+	-	+	+	+/-	+	+	+	+	+/-
D-Trehalose	+	+	-	+	+/-	+	-	+	+	+
inulin	+/-	-	+/-	+	-	+	-	+/-	-	-
D-Melezitose	+	+	-	-	+	+	+	+	+/-	+
D-Raffinose	-	-	+	-	-	-	+	+/-	+	-
Amidon	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+	-
Glycogene	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Gentiobiose	-	-	-	+	+	+	-	+/-	+/-	+
D-Turanose	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
D-lyxose	-	-	+/-	-	-	+	-	-	-	-
D-Tagatose	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+
D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Aarabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gluconate	+	+	+	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-
2- ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5-ketogluconate	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+

Tableau 29. Résultats d'identification des isolats de lactobacilles à propriétés probiotiques

N° de souche	N° d'origine	Type fermentaire	Identification par API 50 CHL	% d'identification
LB2S1	LB 82	Betabacterium	<i>L. paracasei ssp paracasei 1</i>	99%
LB1V29	LB 62-1	Streptobacterium	<i>L. rhamnosus</i>	99,9%
LB1V19	LB 57	Betabacterium	<i>L. fermentum</i>	n.d
LB2V5	LB55	Streptobacterium	<i>L. paracasei ssp paracasei 3</i>	98,4%
LB1V37	LB 74	Streptobacterium	<i>L. paracasei ssp paracasei 1</i>	99,9%
LB2V1	LB 84	Streptobacterium	<i>L. paracasei ssp paracasei 1</i>	99,8%
LB1V28	LB 30	Betabacterium	<i>L. buchneri</i>	96%
LB1V45	LB 37-1	Streptobacterium	<i>L. paracasei ssp paracasei 1</i>	96,5%
LB1V47	LB 44-1	Streptobacterium	<i>L. rhamnosus</i>	99,9%
LB1V46	LB 79	Thermobacterium	<i>L. crispatus</i>	n.d

n.d : non déterminée

3.2. Identification moléculaire

3.2.1. Amplification des espaces intergéniques 16S-23S

7 différents ITS-haplotypes désignés de A à G ont été distingués. ITS-PCR ont montré des motifs 1 à 4 bandes reproductibles allant de 250 à environ 860 pb (figure 36).

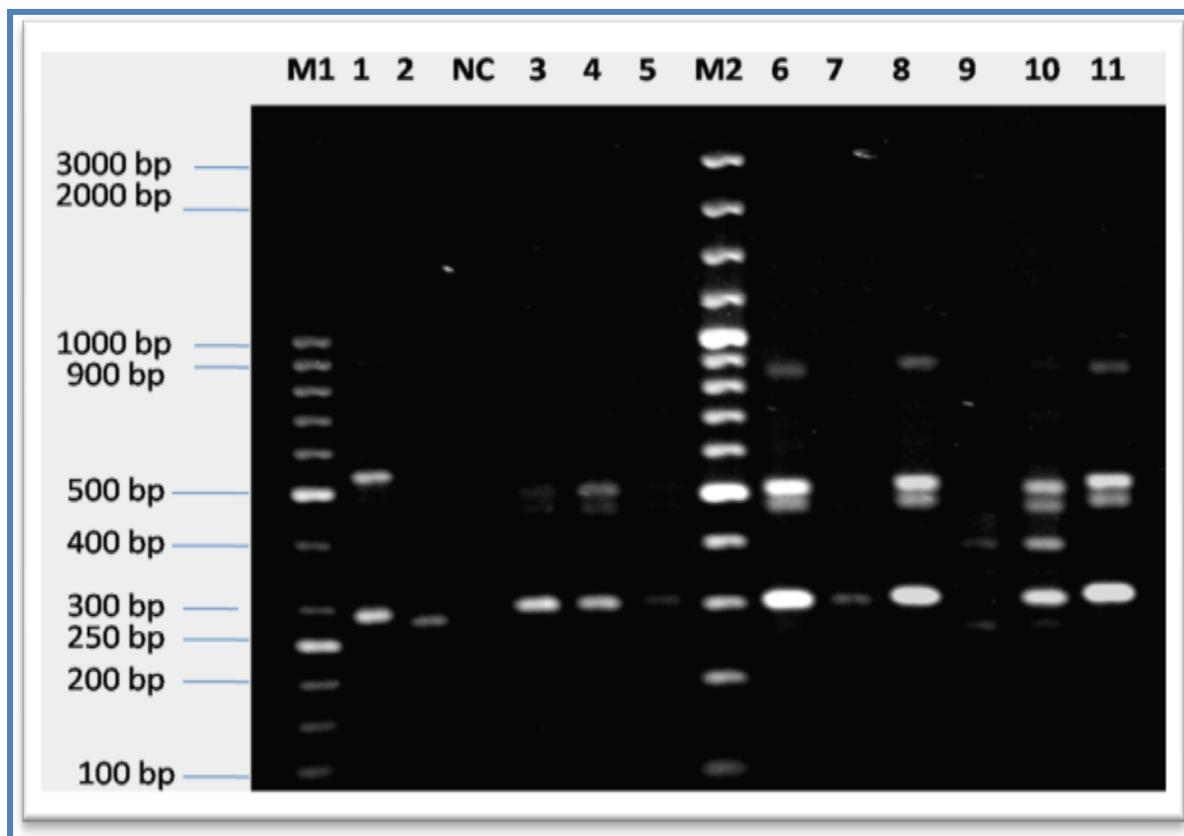


Figure 36: régions intergéniques ISR 16S–23S rDNA des souches de lactobacilles sélectionnées.

M1, marqueur de taille (50bp); M2, marqueur de taille (100bp); NC, contrôle negative; puit1, ITS haplotype A; puit 2, ITS haplotype B; puit 3 and 4, ITS haplotype C; puit 5 and 7, ITS haplotype D; puit 6-8 et 11, ITS haplotype E; puit 9, ITS haplotype F; puit 10, ITS haplotype G.

Après l'identification phénotypique par l'API 50 CHL, une deuxième identification par séquençage de l'ADNr 16S a été effectuée pour déterminer la phylogénie des bactéries.

3.2.2. Amplification de l'opéron ribosomique ADNr 16S

L'identification des souches par l'analyse des séquences de l'ADNr 16S a confirmé l'identification phénotypique des isolats, sauf le cas de LB82 et LB30 dont les profils métaboliques sont proches à *L. paracasei* et *L. buchneri* respectivement.

Alors que, les résultats du séquençage de l'ADNr 16S ont montré que LB82 à une homologie de 98% avec *L. brevis* et LB30 a une homologie de 99% avec *L. parabuchneri* (tableau 30).

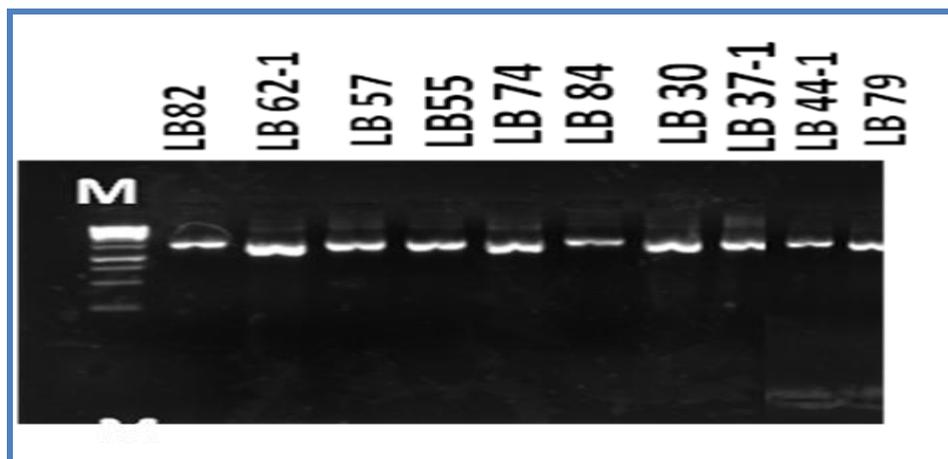


Figure 37: Amplifiats de l'ADNr 16S des souches sélectionnées

Tableau 30. Résultats d'alignement des séquences de l'ADNr 16S des dix souches de lactobacilles

N° de souche	N° d'origine	Identification 16 r DNA		
		Identification	% d'homologie ^a	Numéro d'accession ^b
LB2S1	LB 82	<i>L.brevis</i>	98% (JX185494.1) ^b	KM051985
LB1V29	LB 62-1	<i>L.rahmnosus</i>	99 % (KJ 939337.1) ^b	KP347975.1
LB1V19	LB 57	<i>L.fermentum</i>	99% (KJ 690765.1) ^b	KM051977
LB2V5	LB55	<i>L.casei/paracasei</i>	99% (HM2185381) ^b	KM051978
LB1V37	LB 74	<i>L.paracasei /casei</i>	98% (DQ486146.1) ^b	KM051979
LB2V1	LB 84	<i>L.casei/paracasei</i>	98% (HM2185161) ^b	KM051980
LB1V28	LB 30	<i>L.parabuchneri</i>	99% (JX003594.1) ^b	KM051981
LB1V45	LB 37-1	<i>L.casei/paracasei</i>	98% (KJ764647.1) ^b	KM051982
LB1V47	LB 44-1	<i>L.rhamnosus</i>	99% (KJ702505.1) ^b	KM051984
LB1V46	LB 79	<i>L.crispatus</i>	98% (AB9114591) ^b	KM051983

^a Souches bactériennes dans Gene Bank utilisées pour comparaison avec nos souches.
^b Numéros d'accession de nos souches de lactobacilles identifiés (Annexe 3).

3.2.3. Analyse phylogénétique

Une analyse phylogénétique a révélé la différenciation des quatre groupes de souches appartenant au genre *Lactobacillus* (figure 38).

Groupe 1 formé par les souches de *L. casei* / *paracasei* et *L. rhamnosus* correspondant à l'ITS-type C, D, E.

Le groupe 2 représenté par les souches *L. brevis* (ITS de type G) et *L. parabuchneri* (type ITS L, F).

Tandis que, le troisième groupe a été représenté que par la souche *L. fermentum* (ITS-type B).

Le groupe 4 représenté par la souche *L. crispatus* (ITS-type A).

Nos résultats ont révélé une corrélation entre l'identification métabolique et phylogénétique, sauf pour *Lactobacillus* LB82 dont les résultats de séquençage ADNr 16S ne sont pas en corrélation avec son profil métabolique. Les résultats des tests physiologiques, les modèles ITS-PCR et les résultats de séquençage ADNr 16S confirme que *Lactobacillus* sp. LB82 appartenait à *L. brevis*.

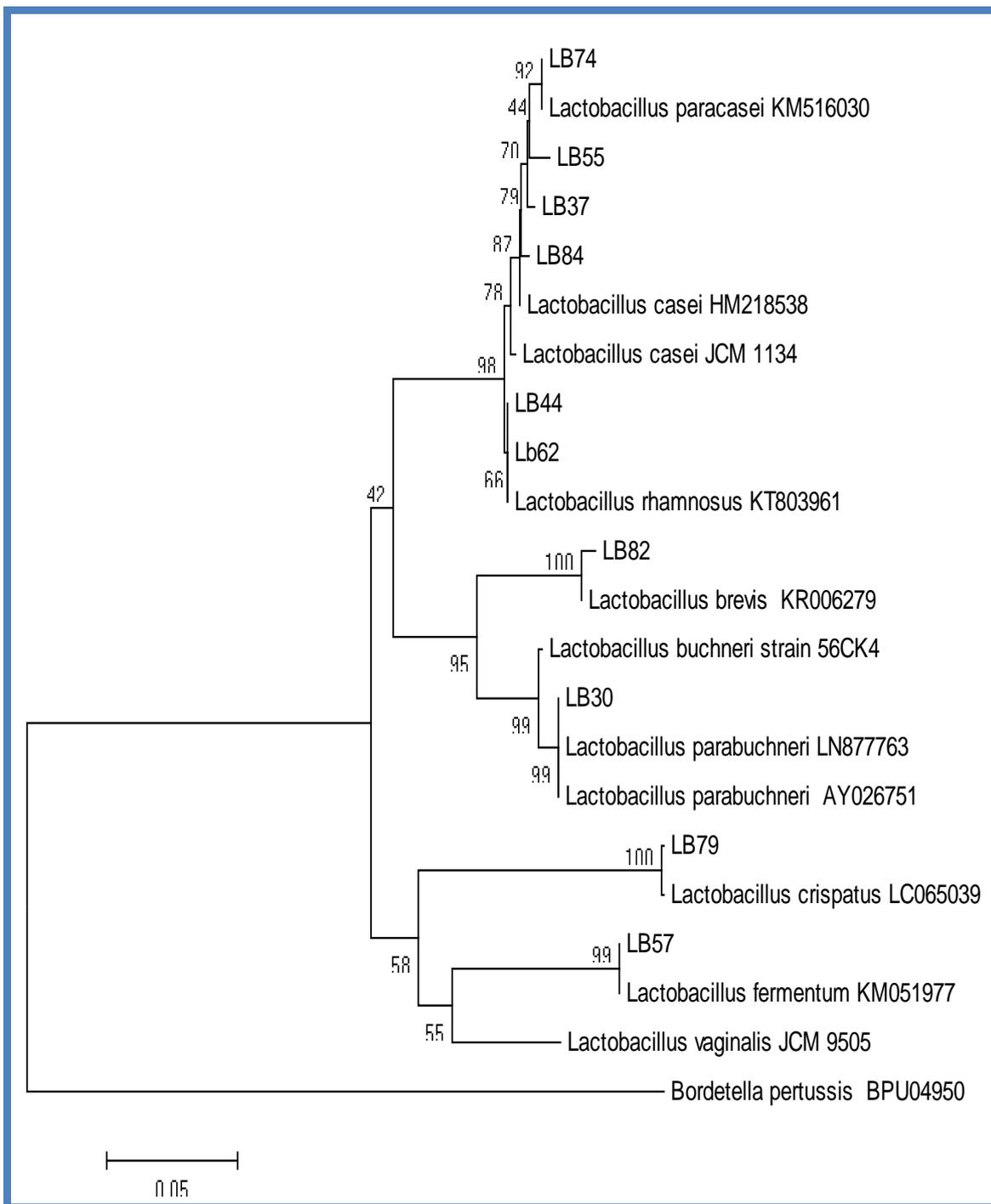


Figure 38: arbre phylogénique des isolats des bactéries lactiques basées sur des séquences d'ADNr partielles 16S.

L'analyse a été effectuée en utilisant la méthode de neighbor-joining dans le logiciel MEGA-5. *Bordetella pertussis* BPU04950 a été utilisé comme groupe de destination. Les valeurs bootstrap pour un total de 1000 répétitions sont présentées au niveau des nœuds de l'arbre. La barre d'échelle correspond à 0,05 unités du nombre de substitutions de base par site.

Chapitre 4

Diversité de la flore lactique chez des femmes enceintes en utilisant une technique de culture indépendante

4.1. Détermination du Score de Nugent et mesure de pH des prélèvements vaginaux

Selon le score de Nugent, les 15 femmes enceintes ont été réparti en trois groupes : une flore intermédiaire est détectée chez 8 cas, une vaginose bactérienne chez 4 cas et une flore saine chez 3 cas (tableau 31).

Pour les prélèvements vaginaux des femmes ayant des scores de Nugent intermédiaires, le pH est compris entre 4 et 5. Tandis que, le pH des prélèvements de femmes ayant une flore normale ou une vaginose bactérienne était à pH 4 et pH 5, respectivement (tableau 31).

Table 31. Caractéristiques des prélèvements vaginaux des 15 femmes enceintes.

N° de prélèvement vaginal	Abréviation	Age	Score de Nugent	Grade de Nugent	pH Vaginal
51	W01	24	6	Flore intermediaire	4
52	W02	26	3	Flore normale	4
53	W04	21	5	Flore intermediaire	5
54	W05	35	7	Vaginose bactérienne	5
55	W06	25	3	Flore normale	4
56	W09	26	4	Flore intermediaire	4
57	W11	33	6	Flore intermediaire	5
58	W12	25	8	Vaginose bactérienne	5
59	W13	27	3	Flore normale	4
60	W14	22	4	Flore intermediaire	5
61	W15	19	5	Flore intermediaire	4
62	W16	32	6	Flore intermediaire	5
63	W17	27	5	Flore intermediaire	4
64	W18	24	7	Vaginose bactérienne	5
65	W19	34	7	Vaginose bactérienne	5

4.2. Identification taxonomique de la flore lactique vaginale par utilisation des amorces spécifiques Lac2-Lac3 et Lac1-Lac2 et les amorces universels 907R-357F.

Les produits de PCR utilisant des amorces spécifiques de *Lactobacillus* et des amorces universelles ont été analysés par DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Les résultats ont montré que les échantillons ont donné typiquement $2,4 \pm 0,95$ fragments dominants par échantillon.

Chez les femmes avec score de Nugent noté flore normale $2,66 \pm 0,94$ fragments d'ADN dominants ont été observés, et ces fragments, lorsqu'ils sont séquencés, étaient homologues à *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus delbrukii* et *Streptococcus agalataiae*.

Chez les femmes avec score de Nugent noté flore intermédiaire $2,12 \pm 0,92$ fragments d'ADN dominants ont été observés, et ces fragments, lorsqu'ils sont séquencés, étaient homologues à *Aerococcus urinae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus spp.*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus* et *Streptococcus anginosus* avec prédominance d'*Enterococcus faecalis* (33,25%).

Chez les femmes avec score de Nugent noté vaginose bactérienne $2,75 \pm 0,82$ fragments d'ADN dominants ont été observés, et ces fragments lorsqu'ils sont séquencés, étaient homologues à *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus spp* et *Streptococcus anginosus*, avec une prédominance d'*Enterococcus faecalis* (40%).

L'homologie entre les séquences obtenue à partir des bandes DGGE et les espèces les plus proches de la base de données Gene Bank sont présentés dans le tableau 32.

12 espèces bactériennes ont été identifiées chez les 15 femmes enceintes.

Parmi eux plusieurs espèces de *Lactobacillus* ont été détectés: *Lactobacillus iners* et *Lactobacillus delbrueckii* dans le cas de la flore normale. *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* et *Lactobacillus iners* dans le cas de la flore intermédiaires et *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus spp.* dans le cas de la vaginose bactérienne (figures 39-40-41).

Il a été observé que la faible détection d'espèces de *Lactobacillus* est en corrélation avec un score Nugent élevé (figure 42).

En outre, chaque échantillon de femme a été représenté par une seule espèce (ou groupe d'espèces étroitement apparentées) de *Lactobacillus*.

Nos résultats montrent l'absence d'*Enterococcus* chez les femmes ayant une flore normale. Par contre, l'espèce *Enterococcus faecalis* prédomine chez les femmes avec flore intermédiaire et les femmes avec vaginose bactérienne. Cette espèce peut être considérée comme un indicateur de déséquilibre de l'écosystème vaginal.

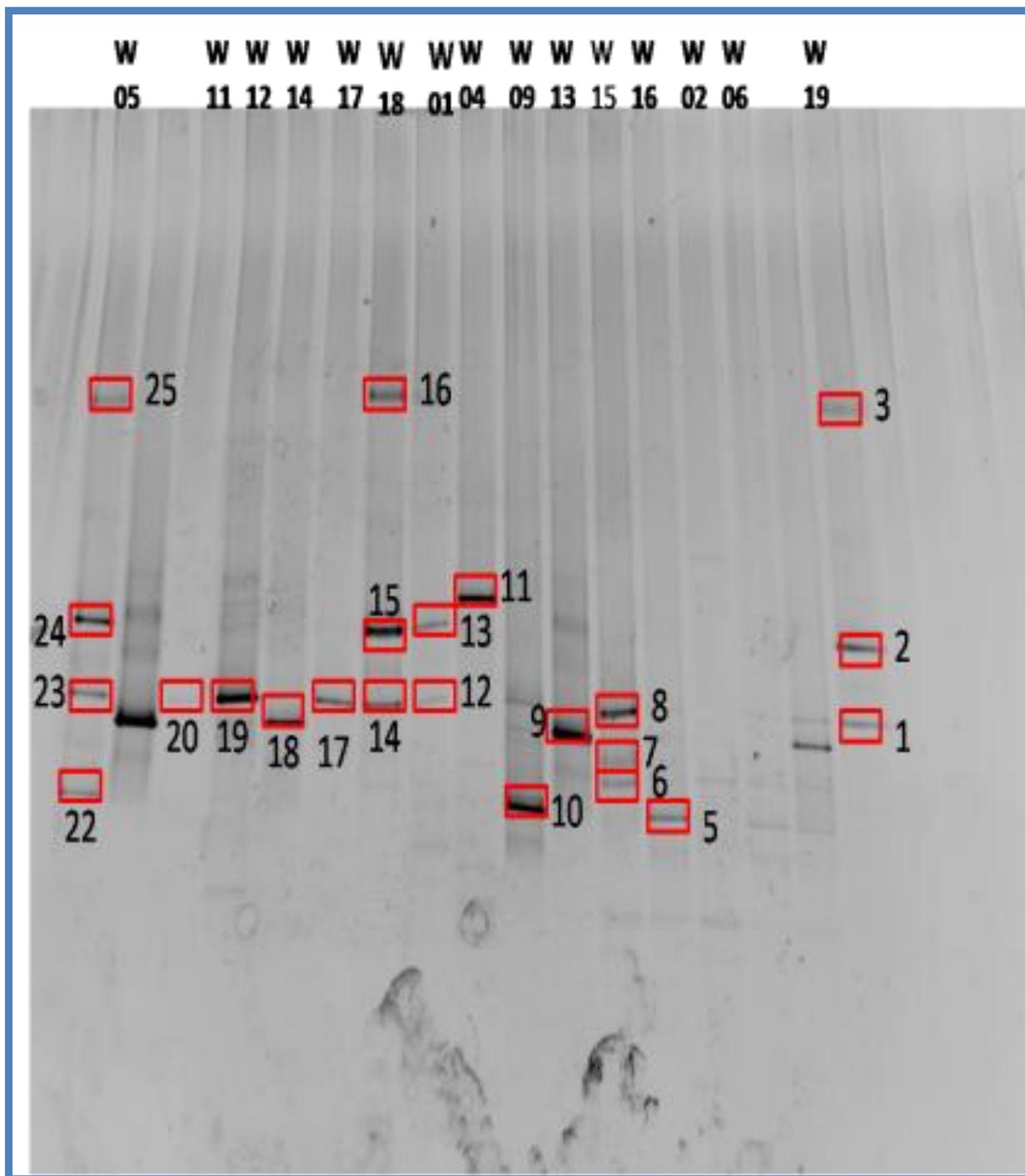


Figure 39: Profil DGGE des produits PCR (amorces Lac2-Lac3) des prélèvements vaginaux.

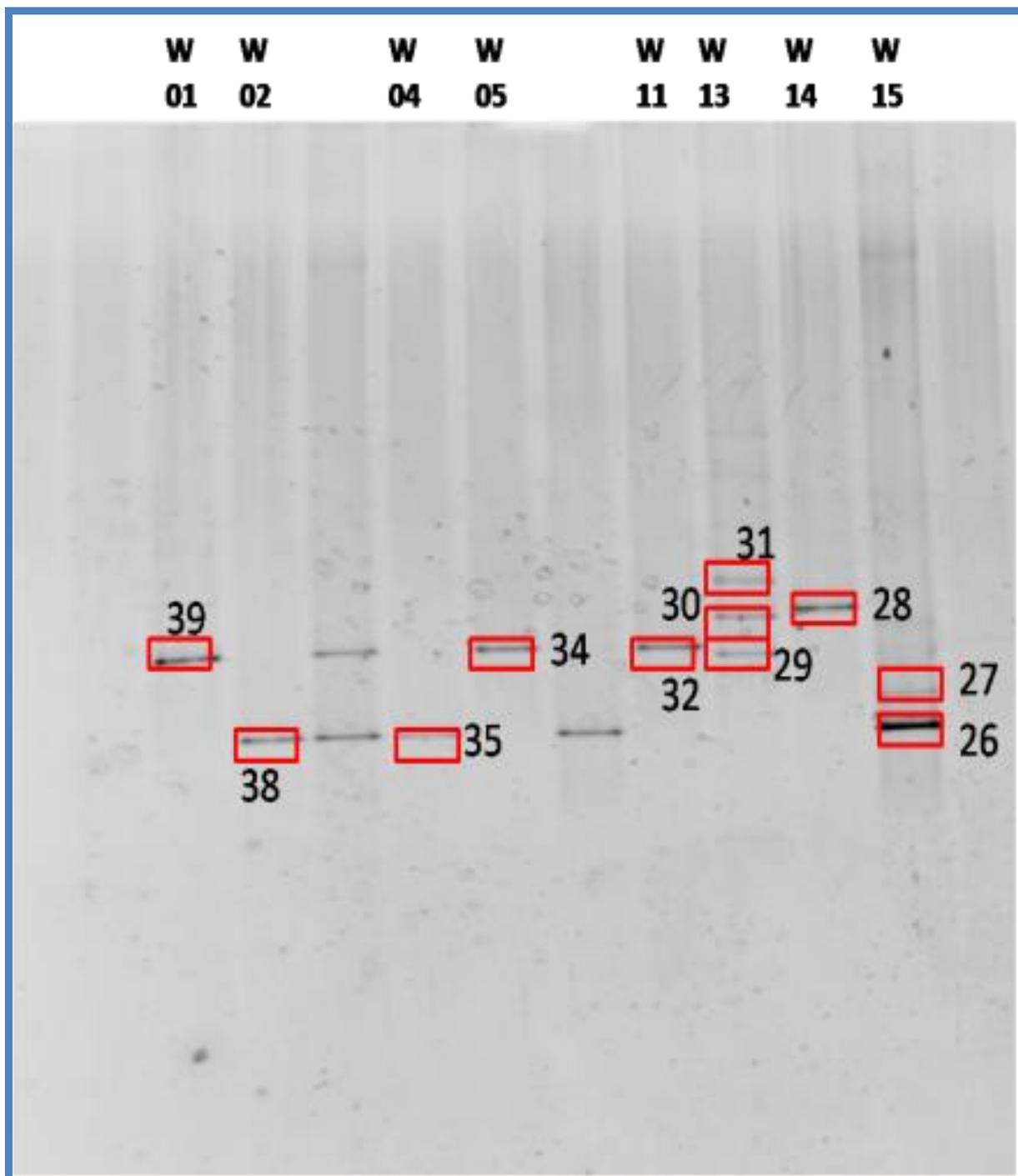


Figure 40: Profil DGGE des produits PCR (amorces Lac1-Lac2) des prélèvements vaginaux.

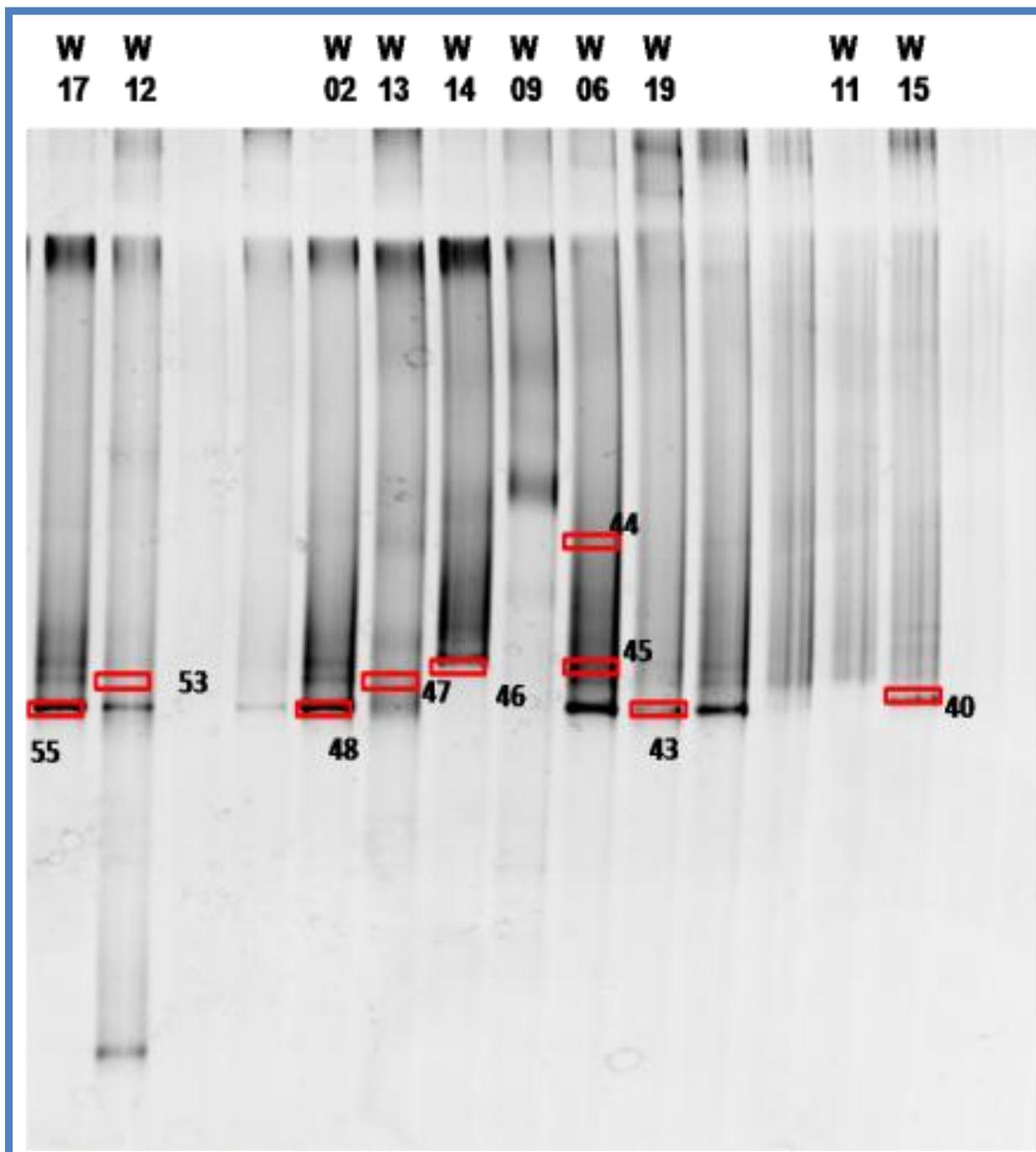


Figure 41: Profil DGGE des produits PCR (amorces 907R-357F) des prélèvements vaginaux.

Table 32. Résultats du séquençage de l'ADNr16S des bandes d'ADN excisés

Prélevement vaginal (Abréviation)	Grade de Nugent	Fragments DGGE †	Amorces utilisés	Numéro de bande	Identification	GenBank numéro d'accèsion	% d'homologie
W01	I	3	Lac3-Lac2	12	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	98%
			Lac3-Lac2	13	<i>Enterococcus hirae</i>	ASVZ01000003	97%
			Lac1-Lac2	39	<i>Lactobacillus crispatus</i>	AY335500	99%
W02	N	2	Lac1-Lac2	38	<i>Lactobacillus iners</i>	KU726667	99%
			357F-907R	48	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	99%
W04	I	2	Lac3-Lac2	11	<i>Aerococcus urinae</i>	NC_015278	98%
			Lac1-Lac2	35	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	98%
W05	BV	4	Lac3-Lac2	22	<i>Streptococcus anginosus</i>	AZMF01000010	97%
			Lac3-Lac2	23	<i>Enterococcus faecalis</i>	KX073796	99%
			Lac3-Lac2	25	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
			357F-907R	44	<i>Uncultured Lactobacillus sp.</i>	KM250388	99%
W06	N	2	357F-907R	45	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	99%
			Lac3-Lac2	10	<i>Streptococcus anginosus</i>	AZMF01000010	97%
W09	I	1	Lac3-Lac2	20	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
W11	I	2	Lac1-Lac2	32	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	AYUA01000121	98%
			Lac3-Lac2	19	<i>Enterococcus faecalis</i>	KR137541	99%

BV: vaginose bactérienne; I: flore intermédiaire; N: flore normale; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis.

† nombre approximative des fragments dominants observés.

Table 32 (suite 1). Résultats du séquençage d'ADNr16S des bandes d'ADN excisés

Prélevement vaginal (Abréviation)	Grade de Nugent	fragments DGGE †	Amorces utilisés	Numéro de bande	Identification	GenBank numéro d'accèsion	% d'homologie
W12	BV	2	357F-907R	53	<i>Lactobacillus crispatus</i>	KU991819	99%
			Lac3-Lac2	9	<i>Streptococcus</i> sp.	JMBI01000046	96%
W13	N	4	Lac1-Lac2	29	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	BALP01000125	97%
			Lac1-Lac2	30	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	BALP01000125	99%
			Lac1-Lac2	31	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	NC_014727	99%
			Lac3-Lac2	18	<i>Streptococcus agalactiae</i>	JMBI01000046	98%
W14	I	2	Lac1-Lac2	28	<i>Lactobacillus jensenii</i>	GG704690	97%
			Lac3-Lac2	7	<i>Enterococcus</i> sp.	KB029381	80%
W15	I	4	Lac3-Lac2	8	<i>Enterococcus faecalis</i>	KX073789	99%
			Lac1-Lac2	26	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	100%
			Lac1-Lac2	27	<i>Lactobacillus iners</i>	KU726667	100%
			Lac3-Lac2	5	<i>Streptococcus anginosus</i>	KU726683	99%
W16	I	1	Lac3-Lac2	17	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
W17	I	2	357F-907R	55	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	KU991818	99%
			Lac3-Lac2	14	<i>Enterococcus</i> sp.	KX079817	99%
W18	BV	3	Lac3-Lac2	15	<i>Enterococcus faecium</i>	KB946737	98%
			Lac3-Lac2	16	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
			Lac3-Lac2	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	KK640484	99%
W19	BV	2	Lac3-Lac2	2	<i>Enterococcus hirae</i>	ASVZ01000003	97%
			Lac3-Lac2	3	<i>Uncultured Lactobacillus</i> sp.	KM250388	99%

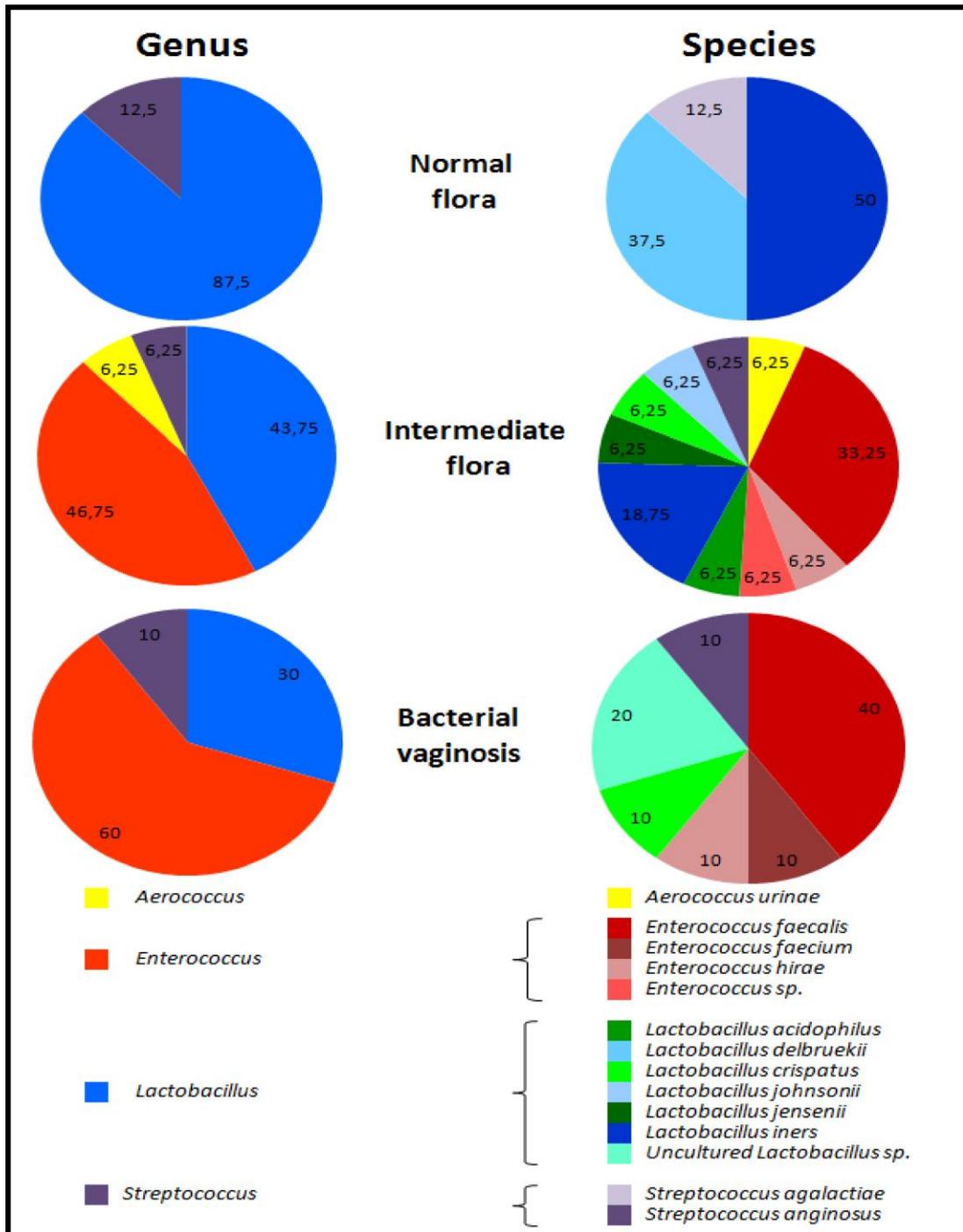


Figure 42: Répartition des bactéries à Gram positives chez 15 femmes enceintes.

Discussion

Notre étude a porté sur la caractérisation des lactobacilles provenant de différents biotopes et leur interaction avec les agents pathogènes chez les femmes algériennes ayant une vaginite aérobie ou bien une candidose vulvo-vaginale, dont l'hygiène périnéale locale est différente du monde occidental.

Il est largement admis que la présence d'une forte population d'espèces de *Lactobacillus* est un facteur important pour un écosystème vaginal sain (Hillier, 2005). Cependant, au-delà de leurs niveaux locaux élevés, ces lactobacilles doivent également être très antagonistes contre les micro-organismes potentiellement pathogènes pour offrir une protection.

Dans cette étude, le pouvoir inhibiteur du CFS non traité des lactobacilles vis-à-vis des bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus saccharolyticus*, *Enterococcus faecium*) est plus important que les bactéries Gram négatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter freundii*) ce qui est en corrélation avec les résultats d'Albano *et al.* (2007) et d'Essid *et al.* (2009). D'une manière générale, la membrane externe des bactéries à Gram négatif peut protéger la membrane cytoplasmique de l'action des composés antimicrobiens contrairement aux bactéries à Gram positif dotées d'une simple paroi avec une grande quantité de peptidoglycane (Gao *et al.*, 1999).

Dans la présente étude, l'activité antagoniste des lactobacilles sélectionnés n'est pas limitée aux bactéries pathogènes; ils étaient également en mesure d'inhiber la croissance de *C. glabrata* et *C. albicans*. Ces espèces de *Candida* sont parmi les causes les plus fréquentes de candidoses vulvovaginales qui sont souvent récurrentes ou chroniques.

Ces résultats rejoignent ceux de Rönnqvist *et al.* (2007) qui ont prouvé l'efficacité des lactobacilles probiotiques dans le traitement des candidoses.

Dix souches de lactobacilles d'origine vaginale ont été sélectionnées comme souches à potentiel inhibiteur le plus important.

L'activité antimicrobienne de *L. casei / paracasei* (LB55, LB84, et LB37-1) et *L. rhamnosus* (LB62, LB44-1) était due uniquement à la production d'acides organiques.

L'acide organique produit par les lactobacilles vaginaux contribue au maintien d'un pH faible et d'un potentiel redox élevé dans le vagin, ce qui contribue à l'inhibition de la croissance des bactéries (McLean et Rosenstein, 2000).

L'activité antagoniste de *L. casei / paracasei* LB74, *L. brevis* LB82, *L. fermentum* LB57, *L. parabuchneri* LB30 et *L. crispatus* LB79 est due à l'inhibition simultanée de l'acide et du peroxyde d'hydrogène qui est en accord avec les résultats obtenus par Petrova *et al.* (2009).

Un essai de mise en évidence de l'acide et du peroxyde d'hydrogène a été effectué, dont une production appréciable à divers degrés a été notée ce qui confirme l'effet inhibiteur observé de ces biomolécules.

Les lactobacilles à activité arginine désaminase positive inhibent les pathogènes par compétition d'utilisation d'arginine en tant que source d'énergie (ATP) (Rousseau et *al.*, 2005).

Plusieurs études suggèrent la nécessité d'utiliser des probiotiques associant des lactobacilles à forte activité arginine désaminase, à d'autres souches productrices de H₂O₂ et d'acides organiques (Famularo, 2001 ; Reid et *al.*, 2001).

Nos résultats de mise en évidence de l'activité arginine désaminase confirme la distribution du système arginine dihydrolase chez les lactobacilles, établie par Manca De Nadra et *al.* (1988). Les résultats de leur étude montre une présence très large chez le sous-groupe Betabacterium et une absence chez la majorité des lactobacilles des sous-groupes Streptobacterium et Thermobacterium.

En revanche, et selon d'autres études, l'arginine peut être dégradée par un certain nombre de lactobacilles homofermentaires provenant de différents biotopes, comme les souches *L. plantarum* (Jonsson et *al.*, 1983) et *L. leichmannii* (Manca de Nadra et *al.*, 1986b).

La voie arginine déiminase (ADI) fait intervenir trois enzymes agissant successivement : l'arginine déiminase, l'ornithine transcarbamylase et la carbamate kinase. Cependant, il existe de grandes variations dans la répartition de ces enzymes chez les bactéries lactiques, certaines souches ne possèdent qu'une partie du système enzymatique (Liu et *al.*, 1995 ; Liu et Pilone, 1998 ; De Angelis et *al.*, 2002).

Les communautés de biofilms contenant des lactobacilles dans les voies gastro-intestinales et urogénitales peuvent avoir un rôle protecteur. Dans cette étude, la capacité de formation de biofilm par les souches de *Lactobacillus* sélectionnées a été évaluée comme une nouvelle alternative pour contrôler les vaginites aérobies et les mycoses vaginales.

Nos résultats indiquent que les souches *L. parabuchneri* LB30 et *L. casei / paracasei* LB74 ont une capacité à former des biofilms plus importants. Ces deux souches ont produit plus de 1000 mg/l d'EPS solubles.

Il a été rapporté que le degré de production d'EPS influe sur le taux d'attachement des cellules microbiennes à différentes surfaces (Vu et *al.*, 2009).

Dans notre étude, la réduction de l'adhérence des pathogènes vaginaux est importante (50-80%). Une réduction de plus de 50% a été observée dans le cas de *K. pneumoniae* SI2, *C. albicans* L2 et *C. glabrata* LA. Dans le cas de *P. aeruginosa* SI6 cette réduction est supérieure à 80%.

Les souches *L. casei / paracasei* LB74 et *L. rhamnosus* LB44-1 se sont révélés avoir l'effet le plus inhibiteur.

L'étude de Reid *et al.* (1995) a indiqué que les lactobacilles inhibent l'adhérence des Staphylocoques (26-97%) et des *Candida* (0,67%). D'autres travaux ont donné des preuves que les lactobacilles probiotiques pourrait interférer avec un microbiote vaginal anormal, et éradiquer les biofilms des pathogènes (McMillan *et al.*, 2011).

Les lactobacilles sélectionnés ont également été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques et aux antifongiques couramment utilisés pour traiter les infections bactériennes et mycosiques les plus fréquentes (la vaginite aérobie, la vaginose bactérienne et candidose vulvo- vaginale).

Le niveau élevé de résistance à certains agents antimicrobiens peut être considérée comme un trait positif soutenant l'utilisation de ces souches comme probiotiques vaginaux.

Les résultats de l'antibiogramme ont indiqué que les lactobacilles sélectionnés étaient résistantes à la plupart des antibiotiques testés (acide nalidixique, métronidazole, kanamycine, clindamycine et vancomycine). Ces résultats sont conformes à ceux rapportées dans d'autres études (D'Aimmo *et al.*, 2007).

Il est démontré que certains lactobacilles ont une résistance naturelle élevée à la kanamycine, gentamicine, métronidazole et streptomycine (Rojo-Bezares *et al.*, 2006). Donc, on peut conclure que l'utilisation de ces lactobacilles à usage probiotique au niveau vaginale ne représente aucun risque de transmission de gènes de résistance à la flore microbienne présente dans la cavité vaginale.

Les tests de sensibilité au fluconazole (antifongique) ont indiqué que les lactobacilles sélectionnés étaient résistants.

La résistance naturelle des lactobacilles aux antifongiques peut permettre le développement d'un traitement conventionnel probiotique/médicaments antifongiques pour la mycose vaginale (Kilic *et al.*, 2005).

Le métronidazole et la clindamycine sont les agents de choix pour le traitement de la vaginose bactérienne. Par conséquent, les lactobacilles sélectionnés pourrait être administré de manière concomitante avec les antibiotiques, et non pas seulement après la fin du traitement comme déjà préconisé par Martín *et al.* (2008).

D'autre part 81,81% des souches sélectionnées sont sensibles à la streptomycine. Ce résultat ne rejoint pas celui trouvé par Korhonen *et al.* (2010) qui ont déclaré que la résistance à la streptomycine est une propriété intrinsèque des lactobacilles. Précédemment, Curragh et Collins (1992) ont indiqué qu'un certain nombre de lactobacilles ont une fréquence très élevée de mutation spontanée pour la résistance à la kanamycine et à la streptomycine.

Parmi les antibiotiques testés, la vancomycine, un inhibiteur de la synthèse de la paroi cellulaire est une préoccupation majeure, car il est l'un des derniers antibiotiques largement efficace contre les infections cliniques causées par des pathogènes résistants à plusieurs médicaments (Prado-Acosta *et al.*, 2009). La résistance ou la sensibilité à la vancomycine a

nécessité une attention particulière en termes de classification des bactéries lactiques, principalement pour les lactobacilles (Ocana et *al.*, 2006). Tous les lactobacilles sélectionnés ont été résistants à la vancomycine. La résistance à cet antibiotique est habituellement intrinsèque, en conséquence les gènes concernés ne sont pas transmis à la flore bactérienne pathogène (Rojo-Bezares et *al.*, 2006).

Tous les isolats étaient sensibles à la bacitracine, la tétracycline, l'érythromycine, la pristinamycine, la lincomycine, la rifampicine, la pénicilline G et ampicilline. Ces résultats sont en corrélation avec d'autres études (D'Aimmo et *al.*, 2007).

Toutes les souches de lactobacilles sélectionnés sont dépourvues d'activité hémolytique. Ce caractère est considéré comme l'une des exigences de sureté des souches probiotiques qui doivent être dénués de toutes formes de pathogénicité (FAO/OMS, 2002 ; Salyers et *al.*, 2004).

Les résultats de cette étude suggèrent que les dix souches de lactobacilles sélectionnées comme souches à potentiel inhibiteur le plus important (inhibition de la croissance et de la formation biofilms de microorganismes uropathogènes), ont présentés également les propriétés probiotiques les plus intéressantes à savoir la formation de biofilms, la production d'EPS, le pouvoir acidifiant, la production du peroxyde d'hydrogène, ainsi que l'activité arginine désaminase. Ce qui permet de les proposer comme traitement conventionnel aux médicaments pour la vaginite bactérienne ainsi que la candidose vulvo-vaginale.

Les souches de *Lactobacillus* retenus pour leurs propriétés probiotiques ainsi que les autres souches pathogènes qui colonisent la cavité vaginale des femmes dans cette région, doivent être identifiés jusqu'à l'espèce. Pour cela une caractérisation phénotypique et moléculaire des isolats de ces lactobacilles a été effectuée.

Comme il est mentionné dans la neuvième édition du Manuel de Bactériologie de Bergey (Holt et *al.*, 1994), la différenciation des espèces du genre *Lactobacillus* nécessite une expertise spéciale.

L'identification par les méthodes phénotypiques est difficile parce qu'elle exige, dans plusieurs cas, la détermination des propriétés bactériennes au-delà de ceux des essais de fermentation communs (Song et *al.*, 1999).

Dans notre étude, l'identification par le système API 50 CHL (BioMérieux), des souches de lactobacilles sélectionnées à potentiel probiotique, a été confirmée par analyse des séquences ADNr 16S en utilisant le logiciel BLAST.

Nos résultats indiquent que les espèces de lactobacilles vaginaux cultivables prédominantes chez les femmes algériennes étudiées étaient *L. casei / paracasei* et *L. rhamnosus*.

Les rapports sur les espèces de lactobacilles probiotiques qui colonisent le vagin des femmes en bonne santé de nombreux pays sont disponibles. Aslim et Kilic (2006) ont rapporté avoir

isolé *L. gasseri* comme la souche prédominante chez les femmes turques. Xu *et al.* (2008) ont trouvé que *L. acidophilus* et *L. crispatus* sont les espèces prédominantes chez les femmes enceintes chinoises. Pascual *et al.* (2006) ont rapporté que *L. jensenii* est l'espèce la plus prédominante chez la population féminine argentine.

Les différences de la flore lactobacillaire dans les différentes études peuvent être attribuées à un certain nombre de facteurs : les changements de la composition de l'écosystème vaginal au fil du temps et en réponse à des influences endogènes et exogènes (le cycle menstruel, la grossesse, l'utilisation de contraceptifs, fréquence des rapports sexuels, les partenaires sexuels spécifiques, les douches vaginales, l'utilisation de désodorisants vaginaux, et l'utilisation d'antibiotiques ou autres médicaments ayant des activités immunitaires ou endocriniennes) (Witkin *et al.*, 2007). Les explications les plus probables sont les variations de techniques utilisées lors des prélèvements et des traitements des échantillons, ce qui confirme bien les limites des méthodes d'analyses basés sur la culture microbienne.

Une autre partie de l'étude a porté sur la corrélation entre la diversité des bactéries lactiques vaginales et l'incidence de vaginose bactérienne chez des femmes enceintes *via* une technique de culture indépendante.

Afin de déterminer cette corrélation, les prélèvements vaginaux ont subi une caractérisation phénotypique et moléculaire.

Le maintien d'un pH faible dans le vagin par la production microbienne de l'acide lactique est connu pour être un moyen de défense important contre les maladies infectieuses chez les femmes pré-ménopausées (Clarridge, 2004). Dans notre étude, toutes les communautés (femmes avec flore normale, avec flore intermédiaire ou avec vaginose bactérienne) contenaient les genres bactériens (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Aerococcus*) connus par leur capacité à produire de l'acide lactique, mais la corrélation entre les bactéries présentes et le maintien d'un pH faible n'a pas été bien défini.

Les prélèvements vaginaux des femmes avec flore normale ont le pH le plus bas (4,0), alors que les prélèvements vaginaux des femmes avec vaginose bactérienne ont le pH le plus élevé (5,0).

L'acidification de l'écosystème vaginal est inversement corrélée avec l'incidence de la vaginose bactérienne. Les mêmes résultats ont été prouvés par Zhou *et al.* (2007).

Les résultats de notre étude indiquent que la composition en bactéries lactiques vaginales varie entre les trois catégories de femmes.

La flore vaginale de chaque femme a été colonisée par une seule espèce de *Lactobacillus* ou des espèces phylogénétiquement proches, ce qui est cohérent avec les résultats d'autres études (Vaz-Moreira *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2004 ; Vitali *et al.*, 2007).

En particulier, la détection de *L. delbrueckii* dans les prélèvements vaginaux de femmes en bonne santé a été confirmée précédemment, mais comme une espèce bactérienne vaginale

mineure (Vasquez et *al.*, 2002). Dans notre cas, cette espèce est prédominante chez la femme W13.

Nous avons observé que les prélèvements vaginaux des femmes enceintes en bonne santé sont colonisés par *L. iners* (W02 et W06). La présence de *L. iners* en tant que membre des communautés vaginales chez les femmes en bonne santé a également été rapporté par d'autres études (Ocaña et *al.*, 1999 ; Burton et Reid , 2002 ; Burton et *al.*, 2003 ; Anukam et *al.*, 2006 ; Zhou et *al.*, 2007). Cette espèce identifiée pour la première fois en 1999 (Falsen et *al.*, 1999), ne pousse pas sur les milieux de cultures ordinaires tel que le MRS agar (Muyzer , 1999 ; Zhou et *al.*, 2007), d'où l'utilité des méthodes de culture indépendante pour mieux caractériser la flore vaginale.

Les espèces *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus* et *Lactobacillus acidophilus* ont été détectées chez des femmes enceintes avec une flore intermédiaire, contrairement à d'autres études qui ont souvent identifié ces espèces dans le vagin de femmes avec flore normale (Pavlova et *al.*, 2002 ; Burton et *al.*, 2003 ; Clarridge, 2004 ; Xu et *al.*, 2008 ; Shi et *al.*, 2009 ; Yamamoto et *al.*, 2009 ; Lamont et *al.*, 2011).

Les femmes ayant une flore intermédiaire ont également été caractérisées par une prédominance d'*Enterococcus faecalis*. En outre, *Enterococcus hirae*, *Aerococcus urinae* et *Streptococcus anginosus* ont été trouvées dans cette catégorie de femmes. Ces résultats sont en corrélation avec d'autres études qui ont confirmé la colonisation vaginale de ces femmes (à flore intermédiaire) par des bactéries commensaux entériques (Donders et *al.*, 2002 ; Donders et *al.*, 2011).

Contrairement à l'opinion générale que les espèces de *Lactobacillus acidophilus* constituent la majeure partie de la flore vaginale saine (Burton et *al.*, 2003 ; Xu et *al.*, 2008), nos résultats montrent l'absence de cette espèce chez les femmes en bonne santé et sa présence chez 6,25% de femmes à flore intermédiaire. Ces résultats suggèrent que cette espèce ne peut pas être considérée comme indicatrice d'une microflore normale, mais peut nous orienter vers une condition intermédiaire.

Nos données suggèrent que la prédominance de *Lactobacillus* dans la flore bactérienne vaginale est inversement corrélée avec l'incidence de la vaginose bactérienne chez les 15 femmes enceintes de l'est Algérien. En outre, le genre *Enterococcus* est inversement corrélé avec l'incidence de la flore normale. Selon nos résultats, les espèces *L. iners* et *L. delbruekii* peuvent être considérées comme essentielles pour la défense du vagin et peuvent être considérées comme indicatrices d'une flore saine. En outre, *Enterococcus faecalis* peut être défini comme un indicateur de déséquilibre de l'écosystème vaginal.

Selon les recherches bibliographiques, notre étude est la première à décrire la diversité des bactéries lactiques associées à la vaginose bactérienne en contraste avec l'ensemble des études précédentes qui décrivent seulement les bactéries pathogènes (Klebanoff et *al.*, 2004 ; Fredricks et *al.*, 2005 ; Fredricks et *al.*, 2007), ou décrivent seulement les espèces de *Lactobacillus* associés à cette catégorie (femmes ayant une vaginose bactérienne) (Pendharkar et *al.*, 2013 ; Abdelmaksoud et *al.*, 2016). En outre et selon ces recherches bibliographiques,

cette étude est la première à décrire la flore vaginale des femmes algériennes en utilisant la méthode de culture indépendante

Par rapport aux méthodes de culture classiques, la technique PCR-DGGE assure une meilleure estimation de la composition des espèces de la communauté vaginale, ce qui est une condition préalable nécessaire pour les études cliniques de la voie vaginale. Le développement des recherches pour sélection de probiotiques efficaces doit prendre en compte les résultats de cette étude qui donne une idée sur la spécificité de la flore lactique vaginale de la femme algérienne où l'hygiène périnéale locale est différente du monde occidental.

Pour diminuer les limites rencontrés dans la présente étude, il est nécessaire d'effectuer un échantillonnage plus important en utilisant un modèle d'étude combiné avec des données précises des sujets afin d'avoir une connaissance réelle de la diversité de la flore vaginale de la population féminine Algérienne.

CONCLUSION

La flore vaginale est très hétérogène, prédominée à l'état normal par des lactobacilles. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour leur effet protecteur qui conduit à l'établissement d'un environnement vaginal équilibré.

Dans certains cas, cet état d'équilibre peut être rompu par des facteurs multiples. Et par conséquence, une diminution de la concentration de lactobacilles favorisant la surcroissance et la formation de biofilms des bactéries potentiellement pathogènes et des levures sont fréquemment signalés, conduisant à une infection vaginale.

L'objectif principal de cette étude était d'isoler et de sélectionner des lactobacilles de différents biotopes (prélèvements vaginaux, prélèvements bucco-dentaires, prélèvements rectaux chez les nourrissons allaités au sein et lait maternel) à caractères probiotiques pour leur application à l'écosystème vaginal en vue de traitement de la vaginite aérobie et la candidose vulvo-vaginale.

Pour la sélection des souches, nous avons développé une méthode *in vitro* permettant d'isoler des lactobacilles à propriétés probiotiques. Sept principaux critères de sélection ont été retenus pour l'évaluation de ces propriétés: aptitude à produire du peroxyde d'hydrogène, activité acidifiante, capacité de formation de biofilms, inhibition de la croissance et l'adhésion des pathogènes, activité arginine désaminase et production d'exopolysaccharides.

En effet, *in vivo*, la production de substances antimicrobiennes permet aux lactobacilles d'inhiber directement les pathogènes sensibles, la formation de biofilms par les lactobacilles empêche les pathogènes de s'installer et les lactobacilles ayant une activité arginine désaminase sont capables de priver les pathogènes de l'arginine.

100 souches de lactobacilles ont été isolées de différents biotopes, et pré-sélectionnées pour leur activité antimicrobienne vis-à-vis de 10 isolats de microorganismes associés à la vaginite aérobie et à la candidose vulvo-vaginale ; ainsi que 9 souches de référence (American Type Culture Collection), qui ont été utilisées comme indicatrices.

Parmi les 100 lactobacilles isolés, 30 ont été considérés comme souches à fort potentiel inhibiteur. Ces derniers ont été soumis également à d'autres tests afin de mieux caractériser leurs aptitudes probiotiques, ce qui nous a permis de choisir dix souches de lactobacilles les plus efficaces parmi les 30 souches inhibitrices.

Dans la présente étude, le pouvoir inhibiteur du CFS non traité des lactobacilles vis-à-vis des bactéries Gram positif est plus important que pour les bactéries Gram négatif. De plus, l'activité antagoniste des lactobacilles sélectionnés n'est pas limitée aux bactéries pathogènes; ces lactobacilles étaient également en mesure d'inhiber la croissance de *C. glabrata* et *C. albicans*. Ces espèces de *Candida* sont parmi les causes les plus fréquentes de candidoses vulvovaginales, qui sont souvent récurrentes ou chroniques.

Cette activité antagoniste est due à l'acide ou au peroxyde d'hydrogène, qui agissent simultanément ou séparément. Ces effets ont été confirmés par des tests de quantification de

l'acide lactique et du peroxyde d'hydrogène chez les différentes souches, dont une production appréciable avec divers degrés a été notée.

La capacité de formation de biofilm par les souches de *Lactobacillus* sélectionnées a été évaluée comme une nouvelle alternative pour contrôler les vaginites aérobies et les mycoses vaginales. Les deux souches *L. parabuchneri* LB30 et *L. casei / paracasei* LB74 ont présentés une capacité très élevée à former des biofilms, ainsi qu'à produire des exopolysaccharides en quantité importante (plus que 1000 mg/l d'EPS solubles). Sachant que, le taux d'attachement des cellules microbiennes à différentes surfaces est fortement influencé par le niveau de production d'EPS.

La réduction de l'adhérence des pathogènes vaginaux par les lactobacilles sélectionnées est importante (diminution de 50 à 80%). Les souches *L. casei / paracasei* LB74 et *L. rhamnosus* LB44-1 se sont révélés avoir l'effet le plus inhibiteur.

Les lactobacilles sélectionnés ont également été testés pour leur sensibilité aux antibiotiques et aux antifongiques couramment utilisés pour traiter les infections bactériennes et mycosiques les plus fréquentes à savoir la vaginite aérobie, la vaginose bactérienne et candidose vulvo-vaginale.

Le niveau élevé de résistance observé chez les souches de lactobacilles à ces agents antimicrobiens peut être considérée comme un avantage pour leur utilisation comme probiotiques vaginaux.

Etant donné que les résistances observées sont due à des gènes chromosomiques, dont la transmission à la flore microbienne présente au niveau de la cavité vaginale est très rare.

D'autre part, l'aspect sécuritaire des lactobacilles sélectionnés a été confirmé par l'absence du pouvoir hémolytique.

Par conséquent, nous pouvons admettre que ces lactobacilles à caractères probiotiques ne présentent aucun risque en cas de leur utilisation comme agents thérapeutique au niveau vaginal.

Ces résultats suggèrent que les dix souches de lactobacilles sélectionnées peuvent être proposées comme traitement combiné aux médicaments contre la vaginite bactérienne et la candidose vulvo-vaginale ou bien pour restaurer l'écosystème vaginal après une antibiothérapie.

L'étude de la corrélation entre la diversité de bactéries lactiques vaginales et l'incidence de vaginose bactérienne chez des femmes enceintes *via* la technique de culture indépendante (DGGE), suggère que la prédominance de *Lactobacillus* dans la flore vaginale est négativement corrélée avec l'incidence de la vaginose bactérienne chez 15 femmes enceintes de l'est Algérien.

Les espèces *L. iners* et *L. delbruekii* peuvent être considérées comme essentiels pour la défense du vagin et peuvent être considérées comme indicatrices d'une flore saine. En outre, *Enterococcus faecalis* peut être défini comme un indicateur de déséquilibre de l'écosystème vaginal.

Toutes recherches futures pour la sélection de probiotiques efficaces doivent prendre en compte les résultats de cette étude qui donne une idée sur la spécificité de la flore lactique vaginale de la femme Algérienne où l'hygiène périnéale locale est différente du monde occidental.

Afin d'avoir une représentation réelle de la diversité de la flore vaginale de la population féminine Algérienne, il serait nécessaire d'effectuer un échantillonnage plus important en utilisant un modèle d'étude combiné avec des données précises des sujets.

Cette étude contribue par l'apport de certaines connaissances sur les probiotiques à application vaginale, sujet qui reste encore mal connu chez nous et qui doit intéresser les scientifiques et les professionnels de santé.

Cette recherche s'inscrit dans une perspective d'une future utilisation des souches probiotiques sélectionnées dans la prévention et le contrôle des infections vaginales. Par conséquent d'autres études sont nécessaires pour justifier leur emploi en tant que telles. Ces études doivent être axées sur :

- La réalisation des essais de co-cultures de lactobacilles sélectionnées avec des microorganismes uropathogènes dans un milieu reconstitué dans des conditions le rapprochant au milieu vaginal ;
- L'étude de leurs mécanismes d'action ;
- La confirmation des supports génétiques de la résistance aux antibiotiques ;
- L'étude de leurs efficacité dans le contrôle des autres types d'infections vaginales tel que la vaginose bactérienne, la gonococcie, les infections à *Chlamydia trachomatis* et les vaginites à *Trichomonas vaginalis* ;
- La détermination de leurs viabilité et stabilité dans les préparations pharmaceutiques à usage locale (ovules, capsules vaginales, tampons...) ;
- La confirmation de leurs efficacité par des essais cliniques locales, sur des femmes bénévoles, et ceci sous le contrôle des professionnels de la santé.

Références Bibliographiques

A

- Abdelmaksoud AA, Koparde VN, Sheth NU, Serrano MG, Glascock AL, Fettweis JM. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology* 2016; 162(3): 466-475.
- Abd Ulkareem AO. Inhibition of uropathogenic citrobacter adhesion by biosurfactants extrated from vaginal *Lactobacillus acidophilus*. *Anbar Medecine Journal* 2012; 10: 59-67.
- ACOG (Committee on Practice Bulletins--Gynecology). ACOG Practice Bulletin - Clinical management guidelines for obstetrician-gynecologists: Vaginitis. *Obstetrics and Gynecology* 2006; 107(5): 1195-1206.
- AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé). Traitement antibiotique probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées. Ed: Saint-Denis 2008.
- Albano H, Oliveira M, Aroso R, Cubero N, Hogg T, Teixeira P. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from “Alherias” traditional Portuguese fermented sausages: In situ assays. *Meat Science* 2007; 76: 796–800.
- Al-Mathkhury HJF, Abed Assal SD. Inhibitory Effect of Lactobacilli Filtrate on Klebsiella Pneumoniae Biofilm . *The Iraqi Postgraduate Medical Journal* 2012; 11(1): 168-179.
- Alp G, Aslim B. Relationship between the resistance to bile salts and low pH with exopolysaccharide (EPS) production of *Bifidobacterium spp.* Isolated from infants feces and breast milk. *Anaerobe* 2010; 16: 101–105.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 1990; 215: 403-410.
- Alvarez-Olmos MI, Oberhelman RA. Probiotic agents and infectious diseases: A moderm perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32(11): 1567-1576.
- Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 1995; 59: 143-169.
- Amouri I, Abbes S, Sellami H, Makni F, Sellami A, Ayadi A. La candidose vulvovaginale: revue. *Journal de Mycologie Médicale* 2010; 20(2): 108-15.
- Anane S, Kaouech E, Zouari B, Belhadj S, Kallel K, Chaker E. Les candidoses vulvovaginales: facteurs de risqué et particularités cliniques et mycologiques. *Journal de Mycologie Médicale* 2010; 20(1): 36-41.
- Antonio M, Hawes S, Hillier S. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *The Journal of Infectious Diseases* 1999; 180: 1950-1956.
- Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, Reid G. *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sexually Transmitted Diseases* 2006; 33: 59–62.

Références bibliographiques

- Archambaud M, Clave D. Diagnostic bactériologique direct d'une infection : les prélèvements, principales bactéries en cause, interprétation (DCEM1) 2008; pp: 6-9.
- Aslim B, Kilic E. Some probiotic properties of vaginal Lactobacilli isolated from healthy women. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2006; 59: 249-253.
- Anofel (Association Française des Enseignants de Parasitologie Médicales). Parasitoses et Mycoses des Régions Tempérées et tropicales. Ed: Elsevier Masson 2010.
- Anofel (Association Française des Enseignants de Parasitologie Médicales). Trichomonose. Ed: Elsevier Masson 2014.
- Atassi F, Servin AL. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiology Letter* 2010; 304(1): 29-38.
- B**
- Babula O, Lazdane G, Kroica J, Ledger WJ, Witkin SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37: 733-737.
- Bansal N, Choudhary A, Gupta V. Comparative Analysis of Systemic Versus Local Antifungal in the Treatment of Vaginal Candidiasis: A Prospective Study. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2014; 4(2): 1-3.
- Barbes C, Boris S. Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care and STDs* 1999; 13(12): 747-751.
- Barrons R, Tassone D. Use of *Lactobacillus* Probiotics for Bacterial Genitourinary Infections in Women. *Journal of Clinical Therapeutics* 2008; 30: 453-468.
- Bastani P, Homayouni A, Tabrizian VG, Ziyadi S. Dairy Probiotic foods and Bacterial Vaginosis: A Review on Mechanism of Action. *Immunology and Microbiology "Probiotics"* 2012; 445-456.
- Benchellal K, Guelzim Z, Lemkhente H, Jamili M, Dehainy D, Rahali Moussaoui W, El Mellouki K, Sbai Idrissi B, Lmimouni. La candidose vulvo-vaginale à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V (Maroc). *Journal de Mycologie Médicale* 2011; 21: 106-112.
- Béraud J. Le technicien d'analyse biologique guide théorique et pratique. Éd : Lavoisier Technique et Documentation 2001; pp: 873-967.
- Berrebi A, Ayoubi J. Le déséquilibre de la flore vaginale. *Genesis : Gynecologie obstétrique. Endocrinologie* 1999; 44: 1-4.
- Bhatt VD, Vaidya YH, Kunjadia PD, Kunjadia AP. Isolation and characterization of probiotic bacteria from human milk. *International Journal of Pharmaceutical Science and Health Care* 2012; (2)3: 62-70.
- Blagojev N, Skrinjar M, Veskoviæmoracanin S, Soso V. Control of mould growth and mycotoxin production by lactic acid bacteria metabolites. *Romanian Biotechnological Letters* 2012; 17: 7219-7226.

Références bibliographiques

- Bohbot JM, Lepargneur JP. La vaginose en 2011: encore beaucoup d'interrogations. *Gynécologie Obstétrique et fertilité* 2012; 40(1): 31-36.
- Boris S, Suarez J, Barbes C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. *Journal of Applied Microbiology* 1997; 83(4): 413-420.
- Boris S, Suarez J, Vazques F, Barbes C. Adherence of Human vaginal Lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity* 1998; 66(5): 1985-1989.
- Boskey E, Cone R, Whaley K, Moench T. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Human Reproduction* 2001; 16 (9): 1809-1813.
- Boulahbal F. Microbiologie S1 Clinique. Ed: Office des Publications Universitaires-Algérie 2006 ; 127-303.
- Bourgeois CM, Larpent JP. Microbiologie alimentaire: Aliments fermentés et fermentations alimentaires. Ed: Lavoisier- Paris 1996; 432-704.
- Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J, Garland SM, Morris MB, Moss LM, Horvath LB, Kuzevska I, Fairley CK. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *The Journal of Infectious Diseases* 2006; 193: 1478-1486.
- Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Applied and Environmental Microbiology* 2003; 69: 97–101.
- Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186: 1770-1780.

C

- Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 1999; 50(1-2): 131-149.
- Carina Audisio M, Torres M, Sabate D, Iburguren C, Apell M. Properties of different lactic acid bacteria isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut. *Microbiological Research* 2011; 166(1): 1-13.
- Catalan F, Milovanovic A, Minz M, Petavy-Maynier MF. Cahier de formation biologie médicale N°19 : Vaginites et vaginoses. Éd: Bioforma 2000; pp: 20.
- Chaijareenont k, Sirimai k, Boriboonhirunsarn B, Kiriwat O. Accuracy of Nugent's score and each Amsel's criteria in the diagnosis of bacterial vaginosis. *Medical Association of Thailand* 2004; 87: 1270-1274.
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic *Lactobacillus* Species. *Journal of Food Protection* 1998; 12: 1597-1697.
- Chen H, Lim CK, Lee YK, Chan YN. Comparative analysis of the genes encoding 23S–5S rRNA intergenic spacer regions of *Lactobacillus casei*-related strains.

- International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2000; 50: 471-478.
- Choi HS, Kim KM, Kim CH, Kim SM, Seok J. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with cervical neoplasia. *Cancer Treatment and Research* 2006; 38(2): 108-111.
- Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews* 2004; 17: 840-862.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing: approved standard. Wayne- USA 2008; pp: 6-12.
- Colarelli M. Les probiotiques, du conseil officiel à la prise en charge micro-nutritionnelle. Thèse de doctorat- France 2010; pp: 125-128.
- Condon S. Responses of lactic acid bacteria to oxygen, *FEMS Microbiology Reviews* 1987; 46: 269-280.
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Correlation between the procedure for antifungal susceptibility testing for *Candida* spp. of the European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST) and four commercial techniques. *Clinical Microbiology and Infection* 2005; 11: 486-492.
- Curragh HJ, Collins MA. High-levels of spontaneous drug-resistance in *Lactobacillus*; (1992). In: Radulović Z, Petrović T, Bulajić S. Antibiotic susceptibility of probiotic bacteria, antibiotic resistant bacteria - A Continuous Challenge in the New Millennium. Ed: Marina Pana 2012; pp: 26-29.
- Cutler JE, Deepe GS, Klein BS. La candidose vulvo-vaginale à l'hôpital militaire d'instruction Mohammed V (Maroc). Advances in combating fungal diseases: vaccins on the threshold. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 5: 13-28.
- D**
- Daffonchio D, Borin S, Frova G, Manachini PL, Sorlini C. PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16s and 23S rRNA genes and of intergenic Trna gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1998; 48: 107-116.
- D'Aimmo MR, Modesto M, Biavati B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* spp. isolated from dairy and pharmaceutical products. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 115: 35-42.
- De Angelis M, Mariotti L, Rossi J, Servili M, Fox PF, Rollán G, Gobbetti M. Arginine catabolism by sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of the arginine deiminase pathway enzymes from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(12): 6193-6201.
- Delarras C. Microbiologie : 90 heures de travaux pratiques. Ed: Gaetan Morin 1998; pp: 128-172.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe ME. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 1960; 23: 130-135.

Références bibliographiques

- Denis F, Ploy M, Martin C, Bingen E, Quentin R. Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed : Elsevier Masson- France 2007; pp: 215-216.
- Denis F, Ploy M, Martin C, Cattoir V. Bactériologie médicale techniques usuelles. Ed : Elsevier Masson- France 2016; pp: 223.
- De Roissart H, Luquet FM. Les bactéries lactiques. Ed: Uriage, Lorica- France 1994; pp: 169-207.
- Desmazeaud M. L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques. *Le Lait* 1983; 63: 286-310.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73 (2 Suppl): 421-429.
- Dicks LMT, Van Vuuren HJJ. A modification of the hot-tube method for the detection of carbon dioxide produced by heterofermentative *Lactobacillus* strains ; (1987). In: Laurent Sutra, Michel Federighi, Jean-Louis Jouve. Manuel de bactériologie alimentaire. Ed: Polytechnica- Paris 1998; pp: 257-258.
- Dimitonova S P, Danova ST, Serkedjievac JP, Bakalov BV. Antimicrobial activity and protective properties of vaginal lactobacilli from healthy Bulgarian women. *Anaerobe* 2007; 13: 178–184.
- Dols Joke AM, Boon Mathilde E. An in vitro study of the effects of self care gels on desirable and undesirable vaginal microbiota. *European Obstetrics and Gynecology* 2012; 7: 111-114.
- Donders GGG, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *An International Journal of Obstetrics and Gynecology* 2011; 118: 1163–1170.
- Donders GGG. Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2007; 21: 355.
- Donders GGG. Microscopy of the bacterial flora on fresh vaginal smears. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 1999; 7: 126-127.
- Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *An International Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002; 109: 34–43.
- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38(10): 3623-3630.
- Dupont I. Identification moléculaire de souches de lactobacilles productrices d'exopolysaccharides et comparaison de la production d'exopolysaccharides par trois de ces souches. Thèse, Université Laval, Canada 1998; pp: 112-118.

E

- Ehrstrom S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anze'n B, Pahlson C. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes and Infection* 2010; 12: 691-699.

Références bibliographiques

- Ennadir J, Hassikou R, Al Askari G, Arahou M, Bouazza F, Amallah L, amine SA, Khedid K. Caractérisation phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées des farines de blé d'origine marocaine (Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat flour from Morocco). *Journal of Materials and Environmental Science* 2014; 5(4): 1125-1132.
- Eschenbach D, Davick P, Williams B, Klebanoff S, Young-Smith K, Citchlow C, Holmes K,. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1989; 27: 151-256.
- Essid I, Medini M, Hassouna M. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science* 2009; 81: 203–208.

F

- Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2006; 58: 266- 272.
- Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins M. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources : description of *Lactobacillus iners* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; 49: 217-221.
- Famularo G, Pieluigi M, Coccia R, Mastroiacovo P, DeSimone C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics : perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypothesis* 2001; 56(4): 421-430.
- FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO expert consultation 2001.
- FAO/OMS. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization (Organisation Mondiale pour la Santé OMS). Working Group Report 2002.
- Fourmaux S, Bebear C. Infections urogénitales liées aux Chlamydia et aux mycoplasmes. *Progrès en Urologie* 1997; 7: 132-136.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353: 1899-1911.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 3270–3276.
- Fujita Si, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR Using Internal Transcribed Spacer 1 and 2 Regions for Rapid Detection and Identification of Yeast Strains. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39(10): 3617–3622.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 1989; 66: 365-378.

G

- Gagnon M. Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale. Thèse de doctorat- Québec 2007; pp: 10-13.
- Gao Y, Van Belkum MJ, Stiles ME. The outer membrane of Gram negative

- bacteria inhibits antibacterial activity of brochocin-C. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65: 4329–4333.
- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the procaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Ed: Springer 2004; pp: 153-224.
- Gerrit S, Bart AS, Wim JME. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviewes* 2005; 29: 591-610.
- Gevers D. Tetracycline resistance in lactic acid bacteria isolated from fermented dry sausages. Ph D thesis- Belgium 2002; pp: 53-58.
- Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastro intestinal tract. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology* 2003; 17(5): 755-773.
- Gil NF, Martinez RCR, Gomes Bruna C, Nomizo A, De Martinis ECP. Vaginal Lactobacilli as potential probiotic against *Candida* ssp. *Brazilian Journal of Microbiology* 2010; 41: 6-14.
- Giraffa G, Neviani E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 67: 19-34.
- Goetz AM, Stout JE, Jacobs SL, Fisher MA, Ponzer RE, Drenning S. Nosocomial legionnaire's disease discoverd in community hospitals following cultures of the water system: seek and ye shall find. *American Journal of Infection Control* 1998; 26 (1): 8-11.
- Grare M, Dibama HM, Lafosse S, Ribon A, Mourer M, Regnouf-de-Vains JB. Cationic compounds with activity against multidrug-resistant bacteria: interest of a new compound compared with two older antiseptics, hexamidine and chlorhexidine. *Clinical Microbiology and Infection* 2010; 16: 432-438.
- Gray JW, George RH. Experience of vancomycin-resistant enterococci in a children's hospital. *Journal of Hospital Infection* 2000; 45: 11-18.
- Grundmann H, Kropec A, Hartung D, Berner R, Daschner F. *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive unit : reservoirs and ecology of nosocomial pathogen. *Journal of Infectious Diseases* 1993; 168 (4): 943-947.
- Guillermo L, Kociubinski Pablo F, Perez Maria C. Añón, Graciela L. De Antoni A method of screening for highly inhibitory lactic acid bacteria. *Journal of food protection* 1996; 59 (7): 739-745.
- Gueimonde M, Salminen S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Digestive and Liver Disease* 2006; 38: 242-247.

H

- Hackstadt T, Scidmore MA, Rock DD. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydialinclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1995; 92: 4877-4881.
- Hamdad F, Orfila J, Boulanger J, Eb F. Infections urogénitales féminines à Chlamydia trachomatis. *Meilleures approches diagnostiques, Gynécologie Obstétrique et Fertilité* 2004; 32: 1064–1074.

Références bibliographiques

- Hart T, Shears P. Atlas de poche de microbiologie. Ed: Flammarion 1999; pp: 71-200.
- Hay PE, Lamont RF, Taylor-Robinson, Morgan DJ, Ison C, Pearson C. Abnormal bacterial colonization of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *British Medical Journal* 1994; 308: 295-298.
- Henrion B, Chevalier G, Martin F. Typing truffle by PCR amplification of the ribosomal DNA spacers. *Mycological Research* 1994; 98(1): 37-43.
- Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Translational Research* 2012; 160(4): 267-282.
- Hillier S. Diagnostic microbiology of bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1993; 169: 455-459.
- Hillier S L. The complexity of microbial diversity in bacterial vaginosis. *The New England Journal of Medicine* 2005; 353: 1886-1887.
- Hilton E, Isenberg H, Alperstein P, France K, Borenstein M. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candidal vaginitis. *Annals of Internal Medicine* 1992; 116: 353-357.
- Hoesl CE, Altwein JE. The probiotic approach: an alternative treatment option in Urology. *European Urology* 2005; 47: 288- 296.
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST. Bergey Manual of Determinative Bacteriology. Ed: Williams & Wilkins, Baltimore 1994; pp: 400-560.
- Holzappel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth, J, Schillinger, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001; 73: 365-373.

I

- Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical Practice. *Clinical Nutrition* 2010; 29: 701-725.
- Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 1993; 105(6): 1643-1650.

J

- Janier M. Les maladies sexuellement transmissibles. Édition Elsevier Masson SAS 2009 ; pp : 12-14.
- Joffin JN, Leyral G. Microbiologie technique - Dictionnaire des techniques. Ed: Canopé - CRDP de Bordeaux 2006; pp: 207-215.
- Johnson JL, Phelps CF, Cummins CS, London J, Gasser F. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1980; 30: 53-68.

K

- Kaewsrichan J, Peeyananjasrassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic Lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2006; 48: 75- 83.

- Keller MK, Hasslöf P, Stecksén-Blicks C, Twetman S. Co-aggregation and growth inhibition of probiotic Lactobacilli and clinical isolates of mutans Streptococci: An in vitro study. *Acta Odontologica Scandinavica* 2011; 69: 263–268.
- Kerchoue V. Combattre cystites et vaginite : une nouvelle solution probiotiques !. Ed: Medicatrix France 2011; pp: 13-32.
- Kermanshahi RK, Peymanfar S. Isolation and identification of Lactobacilli from cheese, yoghurt and silage by 16S Rdna Gene and study of bacteriocin and biosurfactant production. *Jundichapur journal of Microbiology* 2012; 5(4): 528-538.
- Kilic E, Aslim B, Taner Z. Susceptibility to some antifungal drugs of vaginal Lactobacilli isolated from healthy women. *Drug Metabolism and Drug Interactions* 2005; 21: 67–74.
- Klaenhammer TR, Kullen MJ. Selection and design of probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 1999; 50(1-2): 45-57.
- Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstetrics and Gynecology* 2004; 104: 267-272.
- Korhonen JM, Van Hoek AHAM, Saarela M, Huys G, Tosi L, Mayrhofer S, Wright A. Antimicrobial susceptibility of *Lactobacillus rhamnosus* . *Beneficial Microbes* 2010; 1(1): 75-80.
- L**
- Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JPl. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology* 2011; 118(5): 533–549.
- Larpent JP, Larpent GM. Mémento technique de microbiologie. Ed: Tec & Doc 1997; pp: 55-56.
- Lauer E, Helming C, Kandler O. Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Mocquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl. Bakteriologie. Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. 1. Abt. Originale. A* 1980; 1: 150-168.
- Lepargneur JP. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Ed: ESKA 2009; pp: 1- 10.
- Lepargneur JP, Rousseau V. Rôle protecteur de la flore de Doderleïn. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2002; 31: 485-494.
- Li J, McCormick J, Bocking A, Reid G. Importance of vaginal microbes in reproductive health. *Journal of Reproductive Sciences* 2012; 19: 235-242.
- Lindgren SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews* 1990; 7(1-2): 149-163.
- Linhares IM, Giraldo PC, Baracat EC. New findings about vaginal bacterial flora. *Revista da Associação Médica Brasileira* 2010; 56 (3): 370-374.
- Liu SQ, Davis CR, Brooks JD. Growth and metabolism of selected lactic acid bacteria in synthetic wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 1995; 46: 166–174.
- Liu SQ, Pilone GJ. A review: arginine metabolism in wine lactic acid bacteria and its practical significance. *Journal of Applied Microbiology* 1998; 84: 315-327.

M

- Mac Groarty J. Probiotic use of Lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1993; 6: 252-264.
- Maggi L, Mastromarino P, Macchia S, Brigidi P, Pirovano F, Matteuzi D, Conte U. Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2000; 50: 389-395.
- Manca De Narda MC, Aida A, Pesce de Ruizholgado, Oliver G. Arginine dihydrolase pathway in *Lactobacillus buchneri*: a review. *Biochimie* 1988; 70: 367-374.
- Marelli G, Papaleo E, Ferrari A. Lactobacilli for prevention of urogenital Infections. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2004; 8: 87-95.
- Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A. Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Applied and Environmental Microbiology* 1987; 53(1): 198–200.
- Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother–child pair. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 112: 35–43.
- Martín R, Soberón N, Escobedo S, Suárez JE. Bacteriophage induction versus vaginal homeostasis: role of H₂O₂ in the selection of *Lactobacillus* defective prophages. *Journal of International Microbiology* 2009; 12: 131-136.
- Martín R, Soberón N, Vaneechoutte M, Flórez AB, Vázquez F, Juan E. Suárez JE. Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *International microbiology* 2008; 11: 261-266.
- Masi AT, Eisenstein BI. Disseminated Gonococcal Infection (DGI) and Gonococcal arthritis (GCA), II Clinical manifestations, Diagnosis, Complications, treatment and prevention. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1981; 10: 173.
- Mastromarino P, Brigidi P, Macchia S, Maggi L, Pirovano F, Trinchieri V, Conte U, Matteuzi D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 93(5): 884-893.
- Mattila-Sandholm T, Matto J, Saarela M. Lactic acid bacteria with health claims– interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal* 1999; 9: 25-35.
- McDonald HM, Brocklehurst P, Gordon A. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; 1: 1-33.
- McDonald HM, O’Loughlin JA, Vigneswaran R, Jolley PT, Harvey JA, Bof A, *et al.* Impact of metronidazole therapy on preterm birth in women with bacterial vaginosis flora (*Gardnerella vaginalis*): a randomised, placebo controlled trial. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1997; 104: 1391–1397.

Références bibliographiques

- McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology* 2000; 49: 543–552.
- McMillan A, Dell M, Zellar MP, Cribby S, Martz S, Hong E, Fu J, Abbas A, Dang T, Miller W, Reid G. Disruption of urogenital biofilms by *Lactobacilli*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 86 (1): 58–64.
- Merk K, Borelli C, Korting HC. *Lactobacilli* – bacteria host interactions with special regard to the urogenital tract. *International Journal of Medical Microbiology* 2005; 295: 9-18.
- Metchnikoff E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. The prolongation of life: Optimistic studies; (1907). In: Pataud C. Interet des probiotiques dans le traitement de la vaginose bacterienne. Thèse de doctorat- France 2013; pp: 44-45.
- Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53(1): 108-114.
- Mohler R, Brown C. Doderlein's bacillus in the treatment of vaginitis. *American Journal of Obstretical Gynecology* 1933; 25: 718-723.
- Mollapour M, Piper PW. Weak Organic Acid Resistance of Spoilage Yeasts, In: Avery SV, Stratford M, Van West P. British Mycological Society Symposia Series. Ed: Elsevier 2008; pp: 210-245.
- Montel MC, Champomier MC. Arginine Catabolism in *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied And Environnemental Microbiology* 1987; 53(11): 2683-2685.
- Mouton C, Robert JC, Sixou JL, Tarahan L. Bactériologie buccodentaire. Ed: Masson 1994; pp: 23-104.
- Mumtaz S, Ahmad M, Aftab I, Akhtar N, Hamid A. Aerobic vaginal pathogens and their sensitivity pattern. *Journal of Ayub Medical College, Abbottabad* 2008; 20: 113–117.
- Muto A, Osawa S. The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1987; 84: 166-169.
- Muyzer G, De Waal E, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction – amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 99(3): 695-700.
- Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Current Opinion in Microbiology* 1999; 2: 317-322.
- Muyzer G, Teske A, Wirsen CO, Jannasch HW. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology* 1995; 164: 165-172.
- Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 501-527.

N

- Naglik JR, Moyes DL, Wachtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes and Infection* 2011; 13(12-13): 963-976.
- Nagy E, Froman G, Mardh P. Fibronectin binding of *Lactobacillus* species isolated from women with and without bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology* 1992; 37: 38-42.
- Nauciel C, Vildé JL. Bactériologie médicale. Ed: Masson 2005; pp: 6.
- Neumann MG. La dybiose vaginale : son diagnostic et l'utilisation de probiotiques pour la protection menstruelle. Thèse de doctorat- Hambourg 2010; pp: 8-43.
- Neumann MG. Regulations faktoren des vaginalen mikroökologischen Systems. *Zentralblatt Fur Gynakologie* 1988; 7: 406-441.
- Newbern EC, Foxman B, Leaman D, Sobel JD. Desquamative inflammatory vaginitis: an exploratory case-control study. *The Annals of Epidemiology* 2002; 12: 346-352.
- Nugent R, Krohn M, Hillier S. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29: 297-301.

O

- Ocaña VS, Bru E, Holgado AAPR, Nader-Macias ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology* 1999; 45: 203-212.
- Ocana V, Nader-Macias M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods in Molecular Biology* 2004; 268: 347-354.
- Ocana V, Nader-Macias M. Vaginal lactobacilli: self- and co-aggregating ability. *British Journal of Biomedical Science* 2002; 59(4): 183-190.
- Ocana V, Ruiz-Holgado A, Nader-Macias M. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999; 23: 87-92.
- Ocana V, Silva C, Nader-Macias ME. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 2006; 1-6.
- Oduyebo OO, Anorlu RI, Ogunsoola FT. The effects of antimicrobial therapy on bacterial vaginosis in non-pregnant women. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2009; 3: 1-83.
- Otero MC, Nader-Macias ME. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by H₂O₂-producing *Lactobacillus gasseri* isolated from the vaginal tract of cattle. *Animal Reproduction Science* 2006; 96: 35-46.
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *International Journal of General and Molecular Microbiology* 2002; 82(1-4): 279-289.
- Owen D, Katz D. A vaginal fluid simulant. *Contraception* 1999; 59: 91-95.

P

- Pascual L, Barberis L. Prevention strategy of urogenital infections by using Lactobacilli with probiotic properties. *Urinary Tract Infection* 2011; 246-256.
- Pascual LM, Daniele MB, Pajaro C, Barberis T L. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. *Contraception* 2006; 73: 78– 81.
- Pastaud C. Interet des probiotiques dans le traitement de la vaginose bacterienne. Thèse de doctorat- France 2013; pp: 44-45.
- Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, Tao L. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *Journal of Applied Microbiology* 2002; 92(3):451-459.
- Pawlowska AM, Zannini E, Coffey A, Arendt EK. “Green Preservatives”. Combating Fungi in the food and feed industry by applying antifungal lactic acid bacteria; (2012). In: H. Jeyakumar, Advances in food and nutrition research. Ed: Elsevier 2012; pp: 170-185.
- Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, Bruyn GD, Gray GE, Hammarström L, Marcotte H. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infectious Diseases* 2013; 13:43.
- Petrova M, Georgieva R, Dimitonova S, Ivanovska N, Hadjieva N, Danova Sv. Inhibitory Activity of Vaginal Lactobacilli Against Human Pathogens. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 2009; 23(1): 627-631.
- Pfeiler EA, Klaenhammer TR. The genomics of lactic acid bacteria, *Trends in Microbiology* 2007; 12: 546-553.
- Piard JC, Desmazeand M. Inhibiting factors produced by lactic and bacteria part L.oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 1991; 71: 525-541.
- Prado-Acosta M, Ruzal SM, Allievi MC, Palomino MM, Sanchez RC, Synergistic effects of the *Lactobacillus acidophilus* S-layer and nisin on bacterial growth. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 116(3): 405-409.
- Pybus V, Onderdonk A. Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes and Infection* 1999; 1: 285-292.

Q

- Qin X, Weissman SJ, Chesnut MF, Zhang B, Shen L. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2004; 15: 3-13.

R

- Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *British Journal of Nutrition* 2002; 88 (Suppl 1): 89-94.

Références bibliographiques

- Rahal K. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS 2005; pp: 4-40.
- Reid G, Bocking A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginoses and preterm labor. *American Journal of Obstetrical Gynecology* 2003; 189: 1202-1208.
- Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen G, Henning B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 2001; 30: 49-52.
- Reid G, Bruce AW. Urogenital infections in women: can probiotics help?. *Postgraduate Medecine Journal* 2003; 79: 428-432.
- Reid G, Tieszer C, Lam D. Influence of Lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. *Journal of Industrial Microbiology* 1995; 15(3): 248-253.
- Roissart H, Luquet FM. Bactéries lactiques: aspects fondamentaux et technologiques. Ed: Uriage, Loriga- France 1994; pp: 498- 510.
- Rojo-Bezares B, Sáenz Y, Poeta P, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Assessment of antibiotic susceptibility within lactic acid bacteria strains isolated from wine. *International Journal of Food Microbiology* 2006; 111: 234-240.
- Rönnqvist D, Forsgren-Brusk U, Husmark U, Grahn-Håkansson E. *Lactobacillus fermentum* Ess-1 with unique growth inhibition of vulvo-vaginal candidiasis pathogens. *Journal of Medical Microbiology* 2007; 56: 1500-1504.
- Rousseau V. Evaluation d'oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat- France 2004; pp: 25-50.
- Rousseau V, Lepargneur JP, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal Lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe* 2005; 11: 145-153.
- Rouse DJ, Hauth JC, Andrews WW, Mills BB, Maher JE. Chlorhexidine vaginal irrigation for the prevention of periparturient infection: a placebo-controlled randomized clinical trial. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1997; 176: 617-622.
- Ruas-Madiedo P, Reyes-Gavilan CG. Invited review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Journal of dairy science* 2005; 88: 843-856.
- Russell JB, Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Advances in Microbial Physiology* 1998; 39: 205-234.

S

- Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T. Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology* 2000; 84(3): 197-215.
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 1987; 4(4): 406-425.
- Salminen S, Wright A, Ouwerhand A. Lactic acid bacteria, microbiological and functional Aspect. Ed: Marcel Dekker 2004; pp: 230- 249.
- Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics genes. *Trends in Microbiology* 2004; 12: 412-416.

- Sanders M, Huisint Veld J. Bringing a probiotic-containing functional food to the market: microbiological, product, regulatory and labeling issues. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76: 293-315.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(12): 5463-5467.
- Saran S, Bisht MS, Singh K, Teotia UVS. Comparing adhesion attributes of two isolates of *Lactobacillus Acidophilus* for assessment of prebiotics, honey and inulin. *International Journal of Scientific and Research Publications* 2012; 2: 1-7.
- Schillinger U, Stiles ME, Holzappel WH. Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV 61. *The International Journal of Food Microbiology* 1993; 20: 131-147.
- Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 2009; 35(3): 525–532.
- Silvester ME, Dicks LMT. Identification of lactic acid bacteria isolated from human vaginal secretions. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 83: 117-123.
- Sobel JD. Desquamative inflammatory vaginitis: a new subgroup of purulent vaginitis responsive to topical 2% clindamycin therapy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1994; 171: 1215–1220.
- Sobel JD, Ferris D, Schwebke J, Nyirjesy P, Wiesenfeld HC, Peipert J, Soper D, Ohmit SE, Hillier SL. Suppressive antibacterial therapy with 0,75 % metronidazole vaginal gel to prevent recurrent bacterial vaginosis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2006; 194(5): 1283-1289.
- Sobel JD. Vaginitis. *The new England Journal of Medecine* 1997; 337(26): 1896-1903.
- Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu C, Kato H, Watanabe K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal Lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(9): 3062-3064.
- Song YL, Kato N, Matsumiya Y, Liu CX, Kato H, Watanabe K. Identification of Lactobacillus species of human origin by a commercial kit, API50CHL. *Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi* 1999; 10(2): 77-82.
- Soussy CJ. Société Française de Microbiologie. Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie: recommandations 2011; pp: 32-59.
- Sozzi T, Maret R, Astruc R. Etude sur la microflore lactique du fromage " Vacherin Mont-d'Or ". *Le Lait* 1973; 53: 280-294.
- Spano G, Beneduce L, Tarantino D, Giammanco GM, Massa S. Preliminary characterization of wine Lactobacilli able to degrade arginine. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 2002; 18: 821–825.
- Spurbeck RR, Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiology* 2011; 6(5): 567-582.
- Stephens RS. Molecular mimicry and *Chlamydia trachomatis* infection of eucaryotic cells. *Trends in Microbiology* 1994; 2: 99-101.

Références bibliographiques

Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of food Microbiology* 1997; 36: 1-29.

T

Talon R, Labadine Y, Larpent YL. Characterisation of inhibitory power of *Lactobacillus* of meat origin. *ZBL Bacteriology* 1980; 170: 133-142.

Tarnberg M, Jakobsson T, Jonasson J, Forsum U. Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2002; 110(11): 802-810.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 2011; 28: 2731-2739.

Tailliez P. Mini-revue: les bactéries lactiques, ces êtres vivants apparus il y a près de 3 milliards d'années. *Lait* 2001; 8: 1-11.

Tailliez P. Les *Lactobacillus*: propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques* 2004; 6: 35-41.

Temmerman R. Culture-dependent and Culture-independent Microbial Analysis of Probiotics. PhD Thesis- Belgium 2003; pp: 35- 74.

Temmerman R, Huys G, Swings J. Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends in Food Science and Technology* 2004; 15: 348-359.

Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology* 2002; 81: 1-10.

Tempera G, Abbadessa G, Bonfiglio G, Cammarata E, Cianci A, Corsello S, Raimondi A, Ettore G, Nicolosi D, Furneri PM: Topical kanamycin: an effective therapeutic option in aerobic vaginitis. *Journal of Chemiotherapy* 2006;18: 409.

Tempera G, Bonfiglio G, Cammarata E, Corsello S, Cianci A: Microbiological/clinical characteristics and validation of topical therapy with kanamycin in aerobic vaginitis: a pilot study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2004; 24: 85-88.

Tissier H. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin; (1906). In : Pastaud C. Intérêt des probiotiques dans le traitement de la vaginose bactérienne. Thèse de doctorat- France 2013; pp: 44-45.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penade S J, Lasa I. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus faecalis* Biofilm Formation. *Applied And Environmental Microbiology* 2001; 67(10): 4538-4545.

U

- Udayalaxmi, Bhat G, Kotigadde S, Kotian S. Effect of pH on the Adherence, Surface hydrophobicity and the biofilm Formation of *Gardnerella Vaginalis*. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2012; 6: 967-969.
- Unlu C, Donders G. Use of lactobacilli and estriol combination in the treatment of disturbed vaginal ecosystem. *Turkish-German Gynecological Education and Research Foundation* 2011; 12: 239-246.

V

- Vallor A, Antonio M, Hawes S, Hillier S. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by vaginal Lactobacilli : role of hydrogen peroxide production. *Journal of infectious Disease* 2001; 184: 1431-1436.
- Valore E, Park C, Icreti S, Ganz T. Antimicrobial components of vaginal fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 2002; 187(3): 561-568.
- Vasquez A, Jakobsson T, Ahrne S, Forsum U, Molin G Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy swedish women. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40(8): 2746-2749.
- Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2011; 100(2): 245-257.
- Velraeds M, VanDeBelt-Gritter B, Busscher H, Reid G, VanDerMei H. Inhibition of uropathogenic biofilm growth on silicone rubber in human urine by lactobacilli –a teleologic approach. *World Journal of Urology* 2000; 18(6): 422-426.
- Velraeds M, VanDeBelt-Gritter B, VanDerMei H, Reid G, Busscher H. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeasts to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. *Journal of Medical Microbiology* 1998; 47(12): 1081-1085.
- Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turroni S, Bellen G, Donders GG, Brigidi P. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analysed by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 2007; 73: 5731–5741.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* 2009; 14: 2535-2554.

W

- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67: 2578-2585.
- Watanabe T, Minakami H, Matsubara S, Honma Y, Uchida A, Sato I. Effect of daily vaginal disinfection on duration of gestation after premature rupture of the membranes

and on infant outcome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research* 1998; 24: 285-290.

- White TJ, Bruns TD, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for polygenetics- Chapter 38; (1990). In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. *New York, USA: Academic Press* 1990; 315-322.
- Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria; (1987). In: Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biolog. Ed: John Wiley and Sons- New York 1987; pp: 241–245.
- Wilson BA, Thomas SM, Ho M. The human vaginal Microbiome- Chapter 6: Metagenomics of the Human Body. Ed: Springer Science 2011; pp: 91-115.
- Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology* 2007; 21(3): 347-354.

X

- Xu HY, Tian WH, Wan CX, Jia LJ, Wang LY, Yuan J, Liu CM, Zeng M, Wei H. Antagonistic potential against pathogenic microorganisms and hydrogen peroxide production of indigenous lactobacilli isolated from vagina of Chinese pregnant women. *Biomedical and environmental sciences* 2008; 21: 365-371.

Y

- Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology* 2009; 22(1): 11–18.
- Yong Z, Yong L, Yan B, ping ZH. Influence of pH, Heat and Enzymatic Treatments on the Activity of Antibacterial Substance in MRS and Milk Media Produced by *Lactobacillus fermentum* F6. *Agricultural Sciences in China* 2010; 9(6): 911-920.

Z

- Zarbo G, Coco L, Leanza V, Genovese F, Leanza G, D'Agati A, Giannone TT, Giunta MR, Palumbo M A, Carbonaro A, Pafumi C . Aerobic Vaginitis during Pregnancy. *Research in Obstetrics and Gynecology* 2013; 2(2): 7-11.
- Zhang F, Hang X, Fan X, Li G, Yang H. Selection and optimization procedure of synbiotic for cholesterol removal. *Anaerobe* 2007; 13(5-6): 185-92.
- Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology* 2004; 150: 2565–2573.
- Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *International Society for Microbial Ecology* 2007; 1: 121–33.

Références bibliographiques

- Zhou X, Westman R, Hickey R, Hansmann MA, Kennedy C, Osborn TW, and Forney LJ. Vaginal Microbiota of Women with Frequent Vulvovaginal Candidiasis. *Infection And Immunity* 2009; 77(9): 4130–4135.
- Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 2006; 23(11): 1567-1574.

Les références Web:

Web 1 : Localisation du vagin au sein de l'appareil génital féminin (22/11/16).

<http://microbiologiemedicale.fr/physiopathologie-et-diagnostic-des-infections/plan-genital/plan-genital-feminin/appareil-genital-feminin.html>

Web 2: Liste des antibiotiques testés selon les bactéries isolées (le comité de l'antibiogramme, de la société Française de microbiologie [CA-SFM]) (22/11/16).

<Hhttp://www.sfm.asso.fr>

Web 3 : Principe de la Polymerase Chain Reaction (PCR) standard (08/11/2016).

<https://www.neb.com/~media/NebUs/Page%20Images/Application.html>

Web 4: Les étapes du séquençage par la méthode de Sanger (08/11/2016).

http://www.info2.uqam.ca/~makarenkov_v/BIF7002/Rapport_NextGen_BF_JC.html

Web 5 : technique DGGE (08/11/2016).

https://en.wikipedia.org/wiki/Community_Fingerprinting.html

RÉSUMÉS

Résumé

La flore vaginale est très hétérogène, prédominée à l'état normal par des lactobacilles. Plusieurs mécanismes ont été décrits pour leur effet protecteur ce qui conduit à l'établissement d'un environnement écologique équilibré.

Lors d'infections vaginales, cette flore lactique est remplacée par des microorganismes potentiellement pathogènes. Afin de restaurer cet équilibre, une approche probiotique par introduction d'une flore lactobacillaire exogène bénéfique a été étudiée.

Dans notre projet de thèse, nous nous sommes fixé comme objectifs l'isolement des lactobacilles de différents biotopes et l'étude de leur efficacité à prévenir les vaginites bactériennes et les mycoses vulvo-vaginales. Une sélection de lactobacilles à propriétés probiotiques a été effectuée via des modèles *in vitro*.

Parmi 100 isolats de lactobacilles, 30 souches ont été sélectionnées pour les caractéristiques suivantes : production de peroxyde d'hydrogène, activité acidifiante, capacité de formation de biofilms, inhibition de la croissance et de l'adhésion de souches pathogènes, activité arginine désaminase et production d'exopolysaccharides.

Parmi ces souches, dix souches de lactobacilles vaginaux ont été considérés comme les plus intéressantes vue l'importance de leur propriétés probiotiques ce qui suggère la possibilité de les utiliser en tant que traitement conventionnel avec les antibiotiques pour la vaginite bactérienne ainsi que la candidose vulvo-vaginale.

Une caractérisation phénotypique et moléculaire de ces dix souches a été effectuée.

La corrélation entre la diversité de bactéries lactiques vaginales et l'incidence de vaginose bactérienne chez 15 femmes enceintes de l'est Algérien a été également étudiée via une technique de culture indépendante.

Nos résultats suggèrent que la prédominance de *Lactobacillus* dans la flore bactérienne vaginale est inversement corrélée avec l'incidence de la vaginose bactérienne. De plus, *L. iners* et *L. delbruekii* peuvent être considérés comme essentiels pour la défense du vagin ou bien comme indicateur d'une flore saine. En outre, *Enterococcus faecalis* peut être défini comme un indicateur de déséquilibre de l'écosystème vaginal.

Mots clés : Flore vaginale, *Lactobacillus*, Infections vaginales, Caractérisation phénotypique et moléculaire, Probiotiques vaginaux.

Summary

The vaginal flora is very heterogeneous, predominated by lactobacilli strains in the normal state. Several mechanisms have been described in their protective effect that lead to the establishment of a balanced ecological environment.

During vaginal infections, this lactic bacterial flora is replaced by potentially pathogenic microorganisms. To restore this balance, a probiotic approach by introducing an exogenous *Lactobacillus* strains was investigated.

The aim of our thesis project was the isolation of lactobacilli strains from different habitats and study of their effectiveness in preventing aerobic vaginitis and vulvovaginal mycoses. A selection of lactobacilli strains with probiotic properties was carried out using *in vitro* models.

Among 100 isolates, 30 strains were selected on the bases of their hydrogen peroxide production, acidifying activity, biofilm formation, inhibition of growth and adherence of pathogenic strains, arginine deaminase activity and exopolysaccharide production.

Among these selected strains, ten vaginal lactobacilli strains were considered as the most interesting according to their probiotic properties which suggests the possibility of using them as conventional treatment with antibiotic for aerobic vaginitis and vulvovaginal candidiasis.

A phenotypical and molecular characterization of these ten lactobacilli strains was also provided.

The correlation between diversity of vaginal lactic acid bacteria and the incidence of bacterial vaginosis in 15 pregnant women of east of Algeria was also studied via a culture independent method.

Our results suggest that the predominance of *Lactobacillus* strains in the vaginal flora is negatively correlated with the incidence of bacterial vaginosis. Moreover, *L. iners* and *L. delbruekii* can be defined as critical for defense of the vagina or indicator of a healthy flora. In addition, *Enterococcus faecalis* can be defined as an indicator of imbalance of the vaginal ecosystem.

Keywords: vaginal flora, *Lactobacillus*, Vaginal Infections, phenotypic and molecular characterization, vaginal probiotics.

الملخص

يوجد تنوع كبير في البكتيريا المهبلية، مع سيادة العصيات اللبنية *Lactobacillus* في الحالات الصحية الطبيعية. وقد وصفت العديد من الآليات المستعملة من طرف هذه البكتيريا في إطار تأثير وقائي مما يؤدي إلى إنشاء بيئة طبيعية متوازنة. أثناء الالتهابات المهبلية، تستبدل هذه البكتيريا اللبنية *Lactobacillus* المفيدة بـ *كائنات حية دقيقة* ممرضة. لاستعادة هذا التوازن، يتم إتباع طريقة الدعم بروبيوتيك من خلال إدخال عصيات لبنية خارجية المنشأ ذات تأثيرات ايجابية و مفيدة. من خلال مشروع هذه الأطروحة، تبيننا هدف عزل البكتيريا اللبنية *Lactobacillus* من بيئات طبيعية مختلفة ودراسة فعاليتها في الوقاية من التهاب المهبل الجرثومي aerobic vaginitis و الداء الفطري vulvovaginal candidiasis. نفذت هذه الدراسة باستخدام نماذج في المختبر.

تم عزل 100 خلية بكتيرية من العصيات اللبنية *Lactobacillus*، أين تم اختيار 30 خلية ذات أحسن مواصفات على أساس كمية إنتاجها من بيروكسيد الهيدروجين، نشاطها الحمض، قدرتها على تشكيل طبقة واقية "بيوفيلم"، تثبيط نمو الخلايا البكتيرية المسببة للأمراض وكذلك منع تموضعها فوق الخلايا المهبلية، نشاطها النازع للحمض الأميني أرجينين بالإضافة إلى قدرتها على إنتاج السكريات المركبة والمعقدة.

من بين هذه الخلايا المختارة، عشرة خلايا بكتيرية من العصيات اللبنية *Lactobacillus* و المعزولة من عينات مهبلية اعتبرت الأكثر فعالية من خلال خصائص البروبيوتيك المتوفرة لديها مما يشير إلى إمكانية استخدامها كعلاج موازي و مكمل للمضادات الحيوية التقليدية المستعملة في حالات التهاب المهبل الجرثومي aerobic vaginitis و الداء الفطري vulvovaginal candidiasis.

بالإضافة إلى ذلك تم إجراء وصف دقيق مظهري و جزيئي للخلايا البكتيرية العشرة المختارة. من جهة أخرى تمت دراسة العلاقة بين تنوع البكتيريا اللبنية و حالات التهاب المهبل الجرثومي bacterial vaginosis لدى 15 امرأة حامل من الشرق الجزائري وذلك باستخدام تقنية الوصف الجزيئي للبكتيريا مباشرة من المنشأ دون اللجوء لطرق الزرع التقليدية.

نتائجنا تشير إلى أن سيادة العصيات اللبنية *Lactobacillus* في المهبل يرتبط ارتباطا عكسيا مع حدوث التهاب المهبل الجرثومي bacterial vaginosis. علاوة على ذلك، يمكن اعتبار *Lactobacillus iners* و *delbruekii* أساسية للدفاع و وقاية المهبل و مؤشرا على البيئة الصحية السليمة على عكس *Enterococcus faecalis* التي يمكن تعريفها كمؤشر خلل في النظام البيئي المهبل.

الكلمات المفتاحية: الكائنات المجهرية المهبلية، العصيات اللبنية *Lactobacillus*، التهاب المهبل، وصف مظهري و جزيئي، البروبيوتيك المهبلية.

Productions scientifiques

Diversity of Vaginal Lactic Acid Bacterial Microbiota in 15 Algerian Pregnant Women with and without Bacterial Vaginosis by using Culture Independent Method

SOUAD ALIOUA¹, AKILA ABDI², IMÈNE FHOULA³, FRANÇOISE BRINGEL⁴, ABDELATIF BOUDABOUS⁵, IMENE HADDA OUZARI⁶

ABSTRACT

Introduction: Bacterial Vaginosis (BV) is the most common lower genital tract disorder among women of reproductive age (pregnant and non-pregnant) and a better knowledge of *Lactobacillus* species richness in healthy and infected vaginal microbiota is needed to efficiently design better probiotic products to promote the maintenance of normal flora which will help prevent bacterial vaginosis.

Aim: To evaluate and compare the diversity of lactic acid bacterial species in pregnant women with and without BV.

Materials and Methods: A pilot study was carried out during November-2014 to March-2015 in University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria. Vaginal swabs were collected from 15 pregnant women aged between 19 and 35 years (mean 27.6 years; n=15) living in the East of Algeria visiting Gynecology service, hospital Abdallah Nouaouria- El bouni, Annaba. Vaginal samples were gram-stained, and scored by the Nugent method. The cohort included cases of women with healthy “normal” vaginal flora, infected flora with bacterial vaginosis and women with “intermediate” flora. The vaginal LAB community from pregnant

women was identified by culture independent method based on Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), with the 16S rRNA gene sequencing.

Results: A majority of LAB affiliated to the genus *Lactobacillus* was found in “normal” and “intermediate” flora (87.5% and 43.75% respectively), while a majority of LAB affiliated to the genus *Enterococcus* was identified in women with bacterial vaginosis and intermediate flora (60% and 46.75% respectively).

Our results showed that the presence of *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus delbruekii* promotes stability of the vaginal microbiota.

Conclusion: This result confirms the findings of previous studies suggesting that the occurrence of predominant *Lactobacillus* negatively correlates with bacterial vaginosis incidence and their current use as probiotics. *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus delbruekii* can be defined as critical for defense of the vagina. In addition, *Enterococcus faecalis* can be considered as an indicator of imbalance of the vaginal ecosystem.

Keywords: DGGE, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, Lactic acid bacteria, Vaginal infections.

INTRODUCTION

The female vagina is a complex habitat for micro-organisms. Lactobacilli are the most dominant bacteria inhabiting this environment, as they play a major role in the maintenance of a healthy urogenital tract [1].

The microbial ecosystem in healthy “normal” vagina can be disrupted by drugs or by local devices with the concomitant decrease of the Lactobacilli community and overgrowth of anaerobic and facultative aerobic bacteria and yeasts [2].

Bacterial Vaginosis (BV) is one of the most common vaginal syndromes affecting women (pregnant or non-pregnant) in their reproductive age. It has been associated with a significant number of obstetric and gynaecologic complications.

Pregnant women with BV are more likely to have a preterm labour and delivery, preterm premature rupture of membranes, post-caesarean delivery wound infections, spontaneous abortion, chorioamnionitis, postpartum endometritis and subclinical pelvic inflammatory disease [3,4]. The mainstay treatment of BV consisted of metronidazole, clindamycin or tinidazole [5].

Many studies have considered probiotics as an adjunct to antimicrobial treatment [6-8]. Others proposed the use of probiotics in preventing the recurrence of BV after an initial treatment [8,9]. In addition, the prophylactic use of probiotics in healthy women with a history of recurrent BV has been confirmed [10].

Culture independent methods based on 16S rRNA-encoding gene sequence community profiling have been used previously to overcome culture-dependent limitations [11] and offer the potential to be rapid and reliable for characterizing the vaginal flora in clinical studies [12].

Our purpose was to assess a potential correlation between the taxonomy of the Lactic Acid Bacterial (LAB) species colonizing the vagina and a balanced healthy vaginal flora by comparing the vaginal LAB taxa found in healthy women and women with bacterial vaginosis by using Polymerase Chain Reaction (PCR) targeting universal and LAB specific 16S rRNA primer sets in conjunction with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

To our knowledge, this is the first report describing the vaginal lactic acid bacteria in Algerian pregnant women using this approach.

MATERIALS AND METHODS

Swab Sampling, Nugent Score and pH Measurement

Vaginal samples from fifteen women were collected. Three swabs were collected from each subject after insertion of an unlubricated speculum into the posterior fornix of the vaginal tract. Women were pregnant at various months of pregnancy and under no antimicrobial or prescribed therapy, aged between 19 and 35 years (mean 27.6 years; n=15). Swabs were vigorously

agitated in 1 mL sterile distilled water. One drop was deposited on microscope slide smears, Gram-stained, and scored by the Nugent method [13]. Nugent results were graded as 0–3 (Normal vaginal state; N), 4–6 (Intermediate-grade bacterial colonization; I), and 7–10 (Bacterial vaginosis; BV). The pH was determined using a pH indicator paper (Merck).

DNA Extraction and PCR Amplification

Microbial cell suspensions from vaginal swabs were pelleted by centrifugation (10,000 g, 5 min) previous to DNA extraction using ABIO pure Genomic DNA blood/cell culture (Alliance Bio Laboratories) according to manufacturer's instructions. DNA was quantified using the NanoDrop microvolume sample retention system (Thermo Scientific NanoDrop Products). PCR reactions were carried out in a thermocycler (Thermal Cycler; Biometra) using the universal primers of bacteria 357F (5'-119 TACGGGAGGCAGCAG-3') and 907R (5'-CCGTC AATTCMTTGGAGTTT-3') as described by Muyzer [14] and the specific lactic acid bacteria primers Lac1 (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'), Lac2 (5'-ATTYCACCGCTACACATG-3') and Lac3 (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCGG-3'). A 44-bp GC-rich clamp sequence was added to the 5' ends of primers 357FGC and Lac 2GC [15,16].

The PCR reaction was obtained by mixing 0.6 µL of each primer (25 mM), 10 µL buffer 5X with 20 mM MgCl₂, 0.5 µL dNTPs (25 mM), 1 U/ µL of Taq polymerase (Thermo Scientific), 1 µL of the genomic DNA, and ultrapure water (Millipore) to a final volume of 50 µL. Amplified DNA was analysed after electrophoresis in 1.5% agarose gel followed by staining with ethidium bromide (5 µg/ml) using Gel Compare (Version 4.1, Applied Maths, Kortrijk Belgium).

Taxa Identification using DGGE and 16S RNA Sequencing

PCR products generated with primers set N°1, 2 and 3 [Table/Fig-1] were separated by DGGE according to the specifications of Muyzer [15] with the following modifications: The concentrations of polyacrylamide, denaturant (7M urea, 40% formamide) and Tris-acetate buffer were 8%, 35–45% and, 50X respectively. A 20 µL of amplified PCR products mixed with 2X loading buffer were deposited into each well. Gel was run for 16 hour at 100V in TAE 1X buffer at 60°C in INGENYphorU system.

After electrophoresis, the gel was stained for 20 minutes in 5 µg/mL of ethidium bromide, washed with deionized water. Under UV light, DNA bands were cut from the gel, and placed in sterile 50 µL distilled sterile water overnight at 4°C.

A 5 µL of the solution containing fragments from the previously excised bands was used as template for PCR re-amplification as described above for DGGE except that primer sets lacking the GC clamps were used. The resulting PCR products were subsequently sequenced using the BigDye Terminator cycle sequencing kit V3.1 (Applied Biosystems) and an Applied Biosystems 3130 Capillary DNA Sequencer. Analysis of the partial 16S rRNA sequences was conducted using the GenBank DNA database NCBI and the BLAST algorithm [17].

Results of PCR and DGGE fragments in samples from women with Nugent ratings of N, I, or BV were presented as mean_SD.

Cycle stage	Primer set N°1 907R-357F GC	Primer set N°2 Lac1-Lac2 GC	Primer set N°3 Lac3-Lac2 GC
Initial denaturation	94°C; 3 min	94°C; 2 min	94°C; 2 min
Cycles of denaturation	10 cycles; 61°C; 1min 25 cycles; 56°C; 1min	35 cycles; 51°C; 1min	35 cycles; 61°C; 1min
Elongation	72°C; 1min	72°C; 1 min	72°C; 1min
Final extension	72°C; 7 min	72°C; 7 min	72°C; 7 min

[Table/Fig-1]: PCR conditions prior to DGGE community profiling.

RESULTS

Nugent Score and pH Measurement of Vaginal Swabs

Among 15 pregnant women tested Nugent ratings for intermediate flora (8 cases), bacterial vaginosis (4 cases) and healthy flora (3 cases). Among the vaginal swabs of women with intermediate Nugent ratings, the pH was comprised between 4 and 5, while the pH of swabs of women with normal flora and bacterial vaginosis were of pH 4 and pH 5, respectively [Table/Fig-2].

Taxonomical Identification of Vaginal Swabs

DGGE analysis of PCR products using *Lactobacillus*-specific primers and universal primers showed that samples typically yielded 2.4 ± 0.95 dominant fragments per sample. It was possible to identify 12 bacterial species.

In women with Nugent scores rated normal flora, 2.66 ± 0.94 dominant DNA fragments were observed, and those fragments, when sequenced, were homologous to *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus agalatae*.

In women with Nugent scores rated intermediate flora, 2.12 ± 0.92 dominant DNA fragments were observed, and those fragments, when sequenced, were homologous to *Aerococcus urinae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus hirae*, *Enterococcus* spp., *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, and *Streptococcus anginosus* with predominance of *Enterococcus faecalis* (33.25%).

In women with Nugent scores rated bacterial vaginosis, 2.75 ± 0.82 dominant DNA fragments were observed, and those fragments, when sequenced, were homologous to *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Lactobacillus acidophilus*, uncultured *Lactobacillus* spp. and *Streptococcus anginosus*, with predominance of *Enterococcus faecalis* (40%).

The homology between the sequence obtained from the DGGE bands and the closest species from the database are given in [Table/Fig-3].

Several species of *Lactobacillus* were detected: *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus delbrueckii* in the case of normal flora, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus iners* in the case of intermediate flora and *Lactobacillus acidophilus*, uncultured *Lactobacillus* spp. in the case of bacterial vaginosis [Table/Fig-4].

Subject	Age (years)	Nugent score	Nugent rating	Vaginal pH
W01	24	6	Intermediate flora	4
W02	26	3	Normal flora	4
W04	21	5	Intermediate flora	5
W05	35	7	Bacterial vaginosis	5
W06	25	3	Normal flora	4
W09	26	4	Intermediate flora	4
W11	33	6	Intermediate flora	5
W12	25	8	Bacterial vaginosis	5
W13	27	3	Normal flora	4
W14	22	4	Intermediate flora	5
W15	19	5	Intermediate flora	4
W16	32	6	Intermediate flora	5
W17	27	5	Intermediate flora	4
W18	24	7	Bacterial vaginosis	5
W19	34	7	Bacterial vaginosis	5

[Table/Fig-2]: Phenotypic characteristics of the vaginal flora of 15 pregnant women.

The phenotypic characterization was carried out by determining the pH and the Nugent score for each swab.

Subjects	Nugent rating	DGGE fragments†	Primer set	Band number	Most closely related bacterial sequence	GenBank accession no.	Identity, %
W01	I	3	Lac3-Lac2	12	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	98%
			Lac3-Lac2	13	<i>Enterococcus hirae</i>	ASVZ01000003	97%
			Lac1-Lac2	39	<i>Lactobacillus crispatus</i>	AY335500	99%
W02	N	2	Lac1-Lac2	38	<i>Lactobacillus iners</i>	KU726667	99%
			357F-907R	48	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	99%
W04	I	2	Lac3-Lac2	11	<i>Aerococcus urinae</i>	NC_015278	98%
			Lac1-Lac2	35	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	98%
W05	BV	4	Lac3-Lac2	22	<i>Streptococcus anginosus</i>	AZMF01000010	97%
			Lac3-Lac2	23	<i>Enterococcus faecalis</i>	KX073796	99%
			Lac3-Lac2	25	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
			357F-907R	44	<i>Uncultured Lactobacillus spp.</i>	KM250388	99%
W06	N	2	357F-907R	45	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	99%
			Lac3-Lac2	10	<i>Streptococcus anginosus</i>	AZMF01000010	97%
W09	I	1	Lac3-Lac2	20	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
W11	I	2	Lac1-Lac2	32	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	AYUA01000121	98%
			Lac3-Lac2	19	<i>Enterococcus faecalis</i>	KR137541	99%
W12	BV	2	357F-907R	53	<i>Lactobacillus crispatus</i>	KU991819	99%
			Lac3-Lac2	9	<i>Streptococcus spp.</i>	JMBI01000046	96%
W13	N	4	Lac1-Lac2	29	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	BALP01000125	97%
			Lac1-Lac2	30	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii</i>	BALP01000125	99%
			Lac1-Lac2	31	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i>	NC_014727	99%
			Lac3-Lac2	18	<i>Streptococcus agalactiae</i>	JMBI01000046	98%
W14	I	2	Lac1-Lac2	28	<i>Lactobacillus jensenii</i>	GG704690	97%
			Lac3-Lac2	7	<i>Enterococcus spp.</i>	KB029381	80%
W15	I	4	Lac3-Lac2	8	<i>Enterococcus faecalis</i>	KX073789	99%
			Lac1-Lac2	26	<i>Lactobacillus iners</i>	ADHG01000003	100%
			Lac1-Lac2	27	<i>Lactobacillus iners</i>	KU726667	100%
			Lac3-Lac2	5	<i>Streptococcus anginosus</i>	KU726683	99%
W16	I	1	Lac3-Lac2	17	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
W17	I	2	357F-907R	55	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	KU991818	99%
			Lac3-Lac2	14	<i>Enterococcus spp.</i>	KX079817	99%
W18	BV	3	Lac3-Lac2	15	<i>Enterococcus faecium</i>	KB946737	98%
			Lac3-Lac2	16	<i>Enterococcus faecalis</i>	JUNL01000323	99%
			Lac3-Lac2	1	<i>Enterococcus faecalis</i>	KK640484	99%
W19	BV	2	Lac3-Lac2	2	<i>Enterococcus hirae</i>	ASVZ01000003	97%
			Lac3-Lac2	3	<i>Uncultured Lactobacillus spp.</i>	KM250388	99%

[Table/Fig-3]: (Suite): 16S rRNA sequence BLAST analysis corresponding to DGGE gel excised fragments.

BV, bacterial vaginosis; I, Intermediate grade bacterial colonization; N, normal flora; DGGE, denaturing gradient gel electrophoresis.

† Approximate number of dominant fragments observed.

It was observed that the loss in detection of a *Lactobacillus* species by DGGE and sequencing analysis correlated with a higher Nugent score [Table/Fig-4]. In addition, all the women samples were colonized by a single species (or group of closely related strains) of *Lactobacillus*.

Our data suggest the absence of *Enterococcus* species in women belonging to normal flora, in contrast with others women belonging to intermediate flora or to bacterial vaginosis which are predominated by *Enterococcus faecalis*. So, this species can be considered as an indicator of imbalance of the vaginal ecosystem.

DISCUSSION

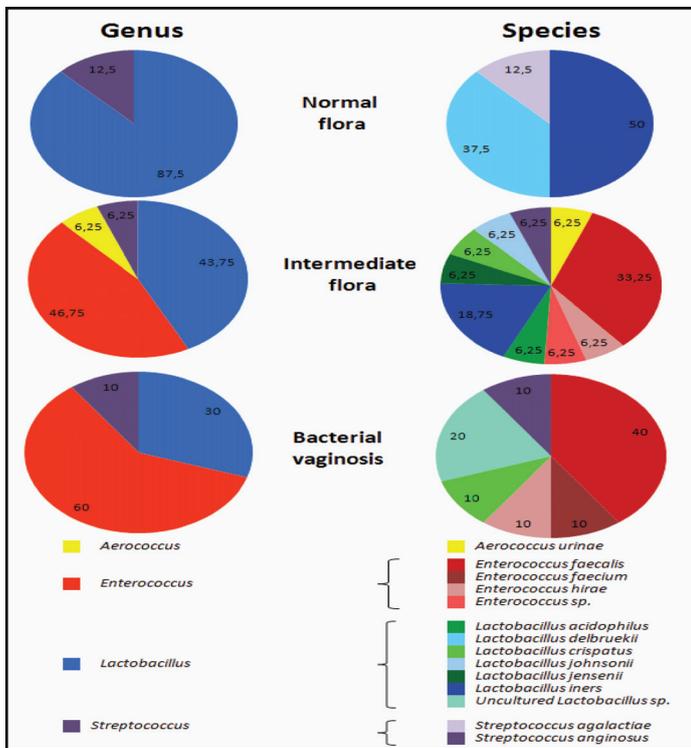
The maintenance of a low pH in the vagina through the microbial production of lactic acid is known to be an important defense against infectious disease in reproductive age women [18]. In our study, all communities (women with normal flora, intermediate flora or bacterial vaginosis) contained members that have been assigned to genera known to produce lactic acid (including *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Aerococcus* and *Enterococcus*),

but the correlation between this bacteria and the maintenance of a low pH has not been well defined.

Communities belonging to normal flora have the lowest median pH (4.0), whereas communities belonging to bacterial vaginosis have the highest median pH (5.0). Clearly, the acidification of vaginal ecosystem is negatively correlated with the incidence of bacterial vaginosis among women. These results are in agreement with those of Zhou et al., [19].

The findings of our study indicate that the structure of vaginal lactic acid bacteria varied between the three categories. The vaginal flora of each women were colonized by a single species of *Lactobacillus*, which is consistent with the findings of other studies [11,20,21].

In particular, *L. delbrueckii* detection in vaginal swabs of healthy women has been previously recorded but as a minor vaginal bacterial species [22] and not as a major flora as observed here (W13). We observed that vaginal swabs of healthy pregnant women were mostly colonized by *L. iners* (W02 and W06). The occurrence of *L. iners* as a member of vaginal communities in healthy women has also been demonstrated by others [19,23-26]. First described



[Table/Fig-4]: Occurrence of Gram positive bacteria in the vagina of Algerian pregnant women. The vaginal bacterial flora was classified according to the Nugent scores. Two levels of taxonomical classification are shown: at the level of the genus and of the species.

in 1999 [27], *L. iners* does not grow on Man Rogosa and Sharpe media (MRS agar). [14,19] which highlights the usefulness of culture-independent approaches for vaginal flora inventory.

Lactobacillus jensenii, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus acidophilus* were recovered from Algerian pregnant women with intermediate flora, in contrast with other studies that have frequently identified these species in vagina of women with normal flora [3,18,25,28-31].

Women belonging to intermediate flora were also characterized by a predominance of *Enterococcus faecalis*. In addition, *Enterococcus hirae*, *Aerococcus urinae* and *Streptococcus anginosus* have been identified in this category of women. These results are in correlation with other studies which confirmed the vaginal colonization of these women (intermediate flora) by aerobic enteric commensals [32,33].

In contrast with a general opinion that species of *Lactobacillus acidophilus* constitute most of the healthy vaginal *Lactobacillus* flora [25,28], our results recovered the absence of this species in a healthy women and its presence in 6.25 % of women with intermediate flora. These results suggests that this species is not indicative of a normal microflora, but may point to some intermediate condition.

According to research in PubMed, our study is the first to describe the diversity of lactic acid bacteria associated to bacterial vaginosis in contrast with the entire previous studies which describe only the pathogenic bacteria [34-36], or describe only *Lactobacillus* species associated to this category (women with Bacterial vaginosis) [37,38]. In addition, as per our knowledge our study is the first to describe the vaginal flora of Algerian women using culture independent method.

Our results need to be confirmed in a larger cohort preferably using a study design combined with data on subjects' behaviors to avoid the limitations of the present study and properly reflect the diversity of vaginal flora in female population of Algeria.

CONCLUSION

Our data suggest that a predominance of *Lactobacillus* in the vaginal bacterial flora is negatively correlated with the incidence of

bacterial vaginosis in 15 pregnant women of Algeria. In addition, *Enterococcus* genus is negatively correlated with the incidence of normal Nugent rating among the tested women. According to our results, *L. iners* and *L. delbruekii* can be considered as critical for defense of the vagina. In addition, *Enterococcus faecalis* can be defined as an indicator of the imbalance of vaginal ecosystem.

Compared to culture-dependent methods, PCR- DGGE technique able a better estimation of species composition of the vaginal community, which is a prerequisite for clinical studies of the vaginal tract. Future development of effective probiotics must take into account the results of this study which gives an idea on the specificity of the vaginal lactic acid bacterial flora of Algerian woman where local perineal hygiene is different from the western world.

REFERENCES

- [1] Ehrstrom S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzen B, et al. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microb and Infect.* 2010;12:691-99.
- [2] Schwebke JR. Abnormal vaginal flora as a biological risk factor for acquisition of HIV infection and sexually transmitted diseases. *J Infect Dis.* 2005;192:1315-17.
- [3] Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, et al. The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG.* 2011;118(5):533-49.
- [4] Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Amortegui AA, Heine RP, Landers DV, et al. Lower genital tract infection and endometritis: Insight in to subclinical pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol.* 2002;100:456-63.
- [5] Menard JP. Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: current and emerging therapies. *International Journal of Women's Health.* 2011;3:295-305.
- [6] Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, et al. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g). *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol.* 2009;55:133-38.
- [7] Marcone V, Calzolari E, Bertini M. Effectiveness of vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* following conventional metronidazole therapy: how to lower the rate of bacterial vaginosis recurrences. *New Microbiol.* 2008;31:429-33.
- [8] Larsson PG, Stray-Pedersen B, Rytting KR, Larsen S. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *BMC Womens Health.* 2008;8:3.
- [9] Marcone V, Rocca G, Lichtner M, Calzolari E. Long-term vaginal administration of *Lactobacillus rhamnosus* as a complementary approach to management of bacterial vaginosis. *Int J Gynaecol Obstet.* 2010;110:223-26.
- [10] Ya W, Reifer C, Miller LE. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo controlled study. *Am J Obstet Gynecol.* 2010;203:120. e1-e6.
- [11] Vaz-Moreira I, Egas C, Nunes OC, Manaia CM. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011;100(2):245-57.
- [12] Ling Z, Kong J, Liu F, Zhu H, Chen X, Wang Y, et al. Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics.* 2010;11:448.
- [13] Chaijareenont K, Sirimai K, Boriboonhirunsarn B, Kiriwat O. Accuracy of Nugent's score and each Amsel's criteria in the diagnosis of bacterial vaginosis. *J Med Assoc Thai.* 2004;87:1270-74.
- [14] Muyzer G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2:317-22.
- [15] Muyzer G, Teske A, Wirsing CO, Jannasch HW. Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol.* 1995;164:165-72.
- [16] Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP. Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67:2578-85.
- [17] Endo A, Okada S. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during shochu fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Biosci Bioeng.* 2005;99:216-21.
- [18] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17:840-62.
- [19] Zhou X, Brown CJ, Abdo Z, Davis CC, Hansmann MA, Joyce P, et al. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *International Society for Microbial Ecology.* 2007;1:121-33.
- [20] Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology.* 2004;150:2565-73.

- [21] Vitali B, Pugliese C, Biagi E, Candela M, Turrone S, Bellen G, et al. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analysed by PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73:5731–41.
- [22] Vasquez A, Jakobsson T, Ahrne S, Forsum U, Molin G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol.* 2002;40:2746–49.
- [23] Ocaña VS, Bru E, Holgado AAPR, Nader-Macias ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology.* 1999;45:203–12.
- [24] Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis.* 2002;186:1770–80.
- [25] Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69: 97–101.
- [26] Anukam KC, Osazuwa EO, Ahonkhai I, Reid G. *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. *Sex Transm Dis.* 2006;33:59–62.
- [27] Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins MD. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:217–21.
- [28] Yi Xu H, Tian WH, Wan CX, Jia LJ, Wang LY, Yuan J, et al. Antagonistic potential against pathogenic microorganisms and hydrogen peroxide production of indigenous lactobacilli isolated from vagina of Chinese pregnant women. *Biomed Environ Sci.* 2008;21:365–71.
- [29] Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol.* 2002;92(3).
- [30] Yamamoto T, Zhou X, Williams CJ, Hochwalt A, Forney LJ. Bacterial populations in the vaginas of healthy adolescent women. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2009;22(1):11–18.
- [31] Shi Y, Chen L, Tong J, Xu C. Preliminary characterization of vaginal microbiota in healthy Chinese women using cultivation-independent methods. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(3):525–32.
- [32] Donders GGG, Vereecken A, Bosmans E, Dekeersmaecker A, Salembier G, Spitz B. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *An International Journal of Obstetrics and Gynaecology.* 2002;109:34–43.
- [33] Donders GGG, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *Inter J Obstet Gynecol.* 2011;118:1163–70.
- [34] Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2004;104:267–72.
- [35] Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *Nw Engl J Med.* 2005;353:1899–911.
- [36] Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM. Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3270–76.
- [37] Abdelmaksoud AA, Koparde VN, Sheth NU, Serrano MG, Glascock AL, Fettweis JM, et al. Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology.* 2016;162(3):466–75.
- [38] Pendharkar S, Magopane T, Larsson PG, Bruyn GD, Gray GE, Hammarström L, et al. Identification and characterisation of vaginal lactobacilli from South African women. *BMC Infectious Diseases.* 2013;13:43.

PARTICULARS OF CONTRIBUTORS:

1. PhD Candidate, Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.
2. Assistant Professor, Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry, Faculty of Science, University Badji Mokhtar, Annaba, Algeria.
3. PhD, Laboratory of Micro-organisms and Active Biomolecules LR03ES03, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia.
4. Professor, Department of Microbiology, Genomics and the Environment, Université de Strasbourg UMR 7156 UNISTRA CNRS, France.
5. Professor, Laboratory of Micro-organisms and Active Biomolecules LR03ES03, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia.
6. Professor, Laboratory of Micro-organisms and Active Biomolecules LR03ES03, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tunis El Manar, 2092 Tunis, Tunisia.

NAME, ADDRESS, E-MAIL ID OF THE CORRESPONDING AUTHOR:

Dr. Souad Alioua,
PhD Candidate, Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, Department of Biochemistry,
Faculty of Science, University Badji Mokhtar, Sidi Ammar street, Annaba, 23000, Algeria.
E-mail: souadalioua@yahoo.fr

FINANCIAL OR OTHER COMPETING INTERESTS: None.

Date of Submission: **May 27, 2016**

Date of Peer Review: **Jun 18, 2016**

Date of Acceptance: **Jul 19, 2016**

Date of Publishing: **Sep 01, 2016**

Annexes

Annexe 1

Extraction de l'AND génomique des procaryotes (méthode CTAB/ NaCl)

- Préparer une culture microbienne jeune (18 heures d'incubation)
- Centrifuger 2ml de la culture microbienne pendant 5 min à 12000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Suspendre le culot dans 550 µl TE
- Ajouter 17 µl de lysozyme
- Incuber pendant 30 min à 37°C
- Ajouter 30 µl de SDS (10%), plus 3 µl de protéinase K (20mg/ml)
- Incuber pendant 30 min à 37°C
- Ajouter 100 µl de NaCl (5M)
- Ajouter 80 µl de CTAB/NaCl
- Incuber pendant 10 min à 65°C
- Ajouter 800 µl de PCAI (Phénol 25 ml/ Chloroforme 24ml/ Alcool Iso-amylque 1ml)
- Agiter pendant 30 secondes
- Centrifuger pendant 30 secondes à 12000 rpm
- Récupérer la phase supérieure dans un nouveau tube eppendorf
- Ajouter 600 µl de CAI (Chloroforme 24ml/ Alcool Iso-amylque 1ml)
- Agiter pendant 30 secondes
- Centrifuger pendant 10 min à 12000 rpm
- Récupérer le surnageant dans un nouveau tube
- Ajouter 600 µl d'isopropanol
- Agiter, puis mettre les tubes eppendorfs à -20°C pendant 2 heures
- Centrifuger pendant 15 min à 14000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Ajouter 500 µl d'éthanol au culot
- Centrifuger pendant 5 min à 14000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Sécher le culot pendant 40 min à 40°C afin d'évaporer l'éthanol
- Suspendre le culot dans 50 µl de TE contenant de la RNase A (10µg/ml)
- Vérifier la pureté de l'ADN à l'aide du spectrophotomètre
- conserver à -20°C.

Annexe 2

Extraction de l'ADN génomique des eucaryotes (levures)

- Préparer une culture microbienne jeune (18heures d'incubation)
- Prendre 3 ou 4 colonies d'une culture pure
- Ajouter 500 µl de tampon d'extraction (50mM Tris-HCl à pH 9, 20mM EDTA à pH 8, 1mM NaCl, 0,2% β- mercaptoéthanol, 2% CTAB)
- Incuber pendant 1 heure à 65°C
- Ajouter la protéinase K (20 mg/ml)
- Incuber pendant 30 min à 37°C
- Ajouter 500 µl du mélange PCAI (Phénol/ Chloroforme/ Alcool Iso-amylque) (25/24/1 v/v/v)
- Centrifuger pendant 15 min à 12000 rpm
- Récupérer le surnageant
- Ajouter 500 µl du mélange CAI (Chloroforme/ Alcool Iso-amylque) (24/1 v/v)
- Centrifuger pendant 15 min à 12000 rpm
- Récupérer le surnageant
- Ajouter au volume du surnageant (V), l'acétate de sodium 3M (0,2xV) et l'isopropanol (0,6xV)
- Laisser les tubes pendant 2heures à température ambiante
- Centrifuger pendant 30 min à 12000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Ajouter au culot 200 µl d'éthanol (70%)
- Centrifuger pendant 10 min à 12000 rpm
- Eliminer le surnageant
- Sécher le culot pendant 30 min à 37°C
- Suspendre le culot dans 50 µl du tampon TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH8) contenant de la RNase A (10µg/ml)
- Incuber pendant 15 min à 37°C
- Vérifier la pureté de l'ADN à l'aide du spectrophotomètre
- conserver à -20°C.

Annexe 3

Séquences partielles de l'ADNr 16S des lactobacilles à propriétés probiotiques

***Lactobacillus brevis* strain Lb82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051985.1

```
gcagagtcga acgagcttcc gttgatgacg tgcttgcact gattcaacaa tgaacgcgag
tggcgaactg ggtgagtaac acgtggggaa tctgcccaga agcaggggat aacacttggg
aacagcgctg ctaataccgt ataacaacaa aatccgcatg gattttgttt gaaaggtggc
tcggctatca cttctggatg atcccgcggc gtattagtta gttggtgagg taaaggcca
ccaagacgat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg ccacattggg actgagacac
ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg aaagtctgat
ggagcaatgc cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgta aaactctggt gttaaagaag
aacacctttg agagtaactg ttcaagggtt gacggtattt aaccagaaag ccacggctaa
ctacgtgccg gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggat ttattgggcg
taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag ctttcggctt aaccgggaga
agtgcacgag gaaactggga gactgtgaag tgcagaagag gacaagtgga actccatgtg
tagcgggtgg ga
```

***Lactobacillus fermentum* strain Lb57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051977.1

```
ggcccaattg attgatggtg cttgcacctg attgattttg gtcgccaacg agtggcggac
gggtgagtaa cacgtaggta acctgcccag aagcggggga caacatttgg aaacagatgc
taataccgca taacaacggt gttcgcgatg acaacgctta aaagatggct tctcgctatc
acttctggat ggacctgcgg tgcattagct tgttgggtgg gtaacggcct accaaggcga
tgatgcatag ccgagttgag agactgatcg gccacaatgg gactgagaca cggcccatatc
tcctacggga ggcagcagta gggaaatctt cacaatgggc gcaagcctga tggagcaaca
ccgcgtgagt gaagaagggt ttcggctcgt aaagctctgt tgttaaagaa gaacacgtat
gagagtaact gttcatacgt tgacgggtatt taaccagaaa gtcacggcta actacgtgcc
agcagccgcg gtaatacgtg ggtggcaagc gttatccgga tttattgggc gtaaagagag
tgcaggcggg tttctaagtc tgatgtgaaa gccttcggct taaccggaga agtgcacgag
aaactggata acttgagtgc agaagagggt agtggaaact catgtgtagc ggtggaatgc
gtagatatat ggaagaacac cagtggcgaa cgcggtctacc tgggtctgcaa ctgacgct
```

***Lactobacillus casei* strain Lb55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051978.1

```
gtatgatgat cgggtgcttgc accgagattc aacatggaac gagtggcggg cgggtgagta
acacgtgggt aacctgccct taagtggggg ataacatttg gaaacagatg ctaataccgc
atagatccaa gaaccgcatg gttcttggct gaaagatggc gtaagctatc gcttttggat
ggacccgcgg cgtattagct agttggtgag gtaatggctc accaaggcga tgatacgtag
ccgaactgag aggttgatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tcctacggga
ggcagcagta gggaaatctt cacaatggac gcaagtctga tggagcaacg ccgcgtgagt
gaagaaggct ttcgggtcgt aaaactctgt tgttggagaa gaatggctcg cagagtaact
gttgtcggcg tgacgggtat caaccagaaa gccacggcta actacgtgcc agcagccgcg
gtaatacgtg ggtggcaagc gttatccgga tttattgggc gtaaagcgag cgcaggcggg
tttttaagtc tgatgtgaaa gccttcggct taaccgagga agcgcacgag aactgggaaa
cttgagtgca gaaaggacag tggaaactcat gtgtagcggg gaaatggcgt agattatgga
agacacc
```

***Lactobacillus paracasei* strain Lb74 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051979.1

ggtcggaacg agttctcggt gatgatcggg gcttgaccgg agattcaaca tggaacgagt
ggcggacggg tgagtaacac gtgggtaacc tgcccttaag tgggggataa catttgaaa
cagatgctaa taccgcatag atccaagaac cgcattgggtc ttggctgaaa gatggcgtaa
gctatcgctt ttggatggac ccgcggcgta ttagctagtt ggtgaggtaa tggctacca
aggcgatgat acgtagccga actgagaggt tgatcggcca cattgggact gagacacggc
ccaaactcct acgggaggca gcagtaggga atcttcacaa atggacgcaa gtctgatgga
gcaacgccgc gtgagtgaag aaggctttcg ggtcgtaaaa ctctgttggt ggagaagaat
ggtcggcaga gtaactgttg tcggcgtgac ggtatccaac cagaaagcca cggctaacta
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtaggtg gcaagcgtta tccggattta ttgggcgtaa
agcgcgagca ggccggtttt taagtctgat gtgaaagccc tcggcttaac cggaggaagc
gcatcggaaa ctgggaaact tgagggtgcag aagagggaca gtggaactcc attggtgtaa
gggcgggggtg gaaaatgcgg ttaagattat atgggaaaga

***Lactobacillus casei* strain Lb84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051980.1

tgcaagtcga acgagttctc gttgatgac ggtgcttgca ccgagattca acatggaacg
agtggcggac ggggtgagtaa cacgtgggta acctgccctt aagtggggga taacatttgg
aacagatgc taataccgca tagatccaag aaccgcatgg ttcttggtcg aaagatggcg
taagctatcg cttttggatg gaccgcggc gtattagcta gttggtgagg taatggctca
ccaaggcgat gatacgtagc cgaactgaga gttgatcgg ccacattggg actgagacac
ggcccaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg caagtctgat
ggagcaacgc cgcgtgagtg aagaaggctt tcgggtcgta aaactctggt gttggagaag
aatggtcggc agagtaactg ttgtcggcgt gacggtatcc aaccagaaag ccacggctaa
ctacgtgcc a gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg ttatccggat ttattggcg
taaagcgagc gcaggcgggt ttttaaggct tgatgtgaaa gccctcgggc ttaaccgagg
gaaggcgcat cgggaactgg gaaacttgag tgccagaaga ggacaaggtg ggaactccat
ggtgtaagcg ggttgaaatg cgta

***Lactobacillus rhamnosus* strain Lb44-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051984.1

tgattattga aagggtgctg catcttgatt taatthttgaa cgagtggcgg acgggtgagt
aacacgtggg taacctgcc ttaagtgggg gataacattt ggaaacagat gctaataaccg
cataaatcca agaaccgcat ggttcttggc tgaaagatgg cgtaagctat cgcttttggg
tggaccgcg gcgtattagc tagttggtga ggtaacggct caccaaggca atgatacgta
gccgaactga gaggttgatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg
aggcagcagt agggaatctt ccacaatgga cgcaagtctg atggagcaac gccgcgtgag
tgaagaaggc tttcgggtcg taaaactctg ttgttgagga agaatggtcg gcagagtaac
tgttgtcggc gtgacggtat ccaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc
ggtaatacgt aggtggcaag cgttatccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcagcgg
tttttaagtc tgatgtgaaa gccctcggct taaccgagga agtgcacgga aactgggaaa
cttgagtgca gaagaggaca ggtggaactc catgtggtag cggtgaaatg cggtaagatt
atggaagaac accagtggcc gaaggcggct gtctggtctg gta

***Lactobacillus crispatus* strain Lb79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051983.1

atgcgagtcg agcgcgagcggg actaacagat ttacttccgtt aatgacgcta ggaaagcgcg
cggcggatgg gtgagtaaca cgtggggaac ctgccccata gtctgggata ccacttggaa
acaggtgcta ataccggata agaaagcaga tcgcatgatc agctttttaa aggcggcgta
agctgtcgcct atgggatggc cccgcggtgc attagctagt tggtaaggta aaggcttacc
aaggcgatga tgcatagccg agttgagaga ctgatcggcc acattgggac tgagacacgg
cccaaactcc tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgca agtctgatgg
agcaacgccg cgtgagtga gaaggttttc ggatcgtaaa gctctgttgt tgggtaagaa
ggatagaggc agtaactggc ctttatttga cggtaatcaa ccagaaagtc acggctaact
acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg ggcaagcgtt gtccggattt attgggcgta
aagcgagcgc acggcggaag aataagtctg atgtgaaagc cctcggctta accgaggaac
tgcatacggga actgtttttc ttgagtgcag aagagggaga gtgggaactc catggtgtag
cgggtgggag tgcgtaatgt atgggaagaa c

***Lactobacillus parabuchneri* strain Lb30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051981.1

tgccaaggctc gacgcgtctt ggttattgat gttaaagtgc tgcatttaac tgatttaaca
ttgagacgag tggcgaactg gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccttga agtaggggat
aacacttggg aacaggtgct aataccgtat aacaaccaa accacctggt tttggtttaa
aagatggctt cggctatcac tttaggatgg accgcggcg tattagcttg ttggtaagg
aacggcctac caaggcaatg atacgtagcc gacctgagag ggtaatcggc cacattggga
ctgagacacg gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacga
aagtctgatg gagcaacgcc gcgtgagtga tgaagggtt cggctcgtaa aactctgttg
ttggagaaga acaggtgtga gagtaactgt tcacatcttg acggtatcca accagaaagc
cacggctaac tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg tggcaagcgt tgtccggatt
tattgggcgt aaagcgagcg caggcgggtt cttaggtctg atgtgaaaag ccttcggctt
aacgggagaa gtgcatcggg accaggagac ttgagtgcag aagaggacag tggaaactcca
tgtgtaagcg gtgaaatgcb tagatatatg ggaagaacac cagtgggcga agc

***Lactobacillus casei* strain Lb37-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KM051982.1

gtggcggacg ggtgagtaac acgtgggtaa cctgccctta agtgggggat aacatttggg
aacagatgct aataccgcat agatccaaga accgcatggt tcttggctga aagatggcgt
aagctatcgc ttttggatgg accgcggcg tattagctag ttggtgaggt aatggctcac
caaggcgatg atacgtagcc gaactgagag gttgatcggc cacattggga ctgagacacg
gcccaaactc ctacgggagg cagcagtagg gaatcttcca caatggacgc aagtctgatg
gagcaacgcc gcgtgagtga agaaggctt cgggtcgtaa aactctgttg ttggagaaga
atggtcggca gagtaactgt tgtcggcgtg acggtatcca accagaaagc cacggctaac
tacgtgccag cagccgcggg aatacgtagg tggcaagcgt tatccggatt tattgggcgt
aaagcgagcg caggcgggtt tttaagtctg atgtgaaagc cctcggctta accgaggaag
cgcatacggga aactgggaaa cttgaagtgc agaaggagga cagtgggaact ccatgtggta
agcggtgaaa tgcggtagat tatattggga agaacaccaa gtggcgaagg

***Lactobacillus rhamnosus* strain Lb62-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

Gene Bank: KP347975.1

```
aacgagttct gattattgaa aggtgcttgc atcttgattt aattttgaac gagtggcggg  
cgggtgagta acacgtgggt aacctgcctt taagtggggg ataacatttg gaaacagatg  
ctaataccgc ataaatccaa gaaccgcatg gttcttggct gaaagatggc gtaagctatc  
gcttttggat ggacccgcgg cgtattagct agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa  
tgatacgtag ccgaactgag aggttgatcg gccacattgg gactgagaca cggcccaaac  
tcctacggga ggcagcagta gggaatcttc cacaatggac gcaagtctga tggagcaacg  
ccgcgtgagt gaagaaggct ttcgggtcgt aaaactctgt tgttggagaa gaatggtcgg  
cagagtaact gttgtcggcg tgacggtatc caaccagaaa gccacggcta actacgtgcc  
agcagccgcy gtaatacgtg ggtggcaagc gttatccgga tttattgggc gtaaagcgag  
cgcagggcgg tttttaagtc tgatgtgaaa gccctcggct taaccgagga agtgcacggy  
aaactgggaa acttgagtgc agaagaggac agtggaaact catgtgtagc ggtgraatgc  
gtagatatat ggaagaacac cagtggcgaa ggcggctgtc tggctctgtaa ctgacgct
```