



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Domaine : S.N.V

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Option : Interactions microorganismes, hôtes et environnement

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
DOCTORAT 3^{ÈME} CYCLE LMD

Par

Melle BECHELAGHEM Nadia

Thème

**Etude des *Lactobacillus* vaginaux : Identification, effets protecteurs,
facteurs de déséquilibre et moyens de régénérescence**

Soutenue publiquement le : **09/11/2017**

Membres de jury

CHIBANI Abdelouhab	Professeur	Université de Mostaganem	Président
DJIBAOUI Rachid	Professeur	Université de Mostaganem	Directeur de thèse
ETTALHI Mehdi	Docteur (PSC)	EPH de Aïn-Tedeles	Co- directeur de thèse
KACEM Brahim	Professeur	ENS de Mostaganem	Examineur
AIT SAADA Djamel	Maitre de conférences A	Université de Mostaganem	Examineur

Laboratoire de Microbiologie et Biologie Végétale

Année universitaire : 2017-2018

Dédicaces

Je dédie cette thèse :

A mes très chers parents qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont soutenu et encouragé tout au-long de mes études.

A mon cher grand père.

A mon cher frère et ma chère sœur.

A toute ma famille.

A tous mes collègues et mes amies.

Ainsi qu'à tous ceux qui me sont chers

Nadia

Remerciements

J'exprime tout d'abord mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné le courage et la volonté de mener à terme ce modeste travail.

J'adresse mes très sincères remerciements à mon professeur DJIBAOUI Rachid qui m'a touché par sa modestie et gentillesse, de m'avoir conseillé et orienté tout au long de mon travail.

Je remercie également mon co-encadreur Dr. ETTALHI Mehdi qui m'a encouragé afin d'accomplir ce travail. Ainsi que tout le personnel du laboratoire de L'EPH Aïn –Tedeles.

Je remercie le professeur CHIBANI Abdelouhab d'avoir accepté de présider ce jury. Je tiens à remercier aussi le professeur KACEM Brahim et le docteur AIT SAADA Djamel d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie tous les enseignants de la faculté des sciences de la nature et de la vie.

Je tiens à remercier tous les ingénieurs du laboratoire de microbiologie et biologie végétale et spécialement, M^{me} Djahira et M^{me} Latifa pour leur patience et leur gentillesse.

Je remercie M^{me} CHELIK Karima de France pour son encouragement, son aide et sa fidélité.

Je tiens tout particulièrement à remercier mon maître de stage Dr. Zafer CANTEKIN pour son aide importante, son accueil chaleureux et sa modestie ainsi que le Prof. Dr. Ibrahim Kürtül l'ancien doyen de la faculté de médecine vétérinaire, pour m'avoir accepté en tant que stagiaire au sein de l'université Mustafa Kamel, Antakya-Turquie.

Je remercie également les autres membres de l'université Mustafa Kamel : Dr. Yaşar ERGUN, spécialiste en obstétrique et gynécologie et le Dr. Müzeyyen İZMİRLİ, spécialiste en biologie médicale et génétique pour leur aide. Sans oublier la technicienne, M^{lle} Sevtap MERMER.

*« Un grand hommage est adressé à la défunte, Mme BENKAROUM Yamina « Sage-femme » qui m'a aidé et encouragé pour initier ce travail
اللهم اسكنها فسيح جناتك وارزقها الفردوس الاعلى »*

Un très grand merci à mes parents, mon frère, ma sœur ainsi que tous ceux qui m'ont aidé de loin comme de près pour réaliser ce travail.

ملخص

تعتبر الفلورا الطبيعية عنصرا هاما في المحافظة على صحة الإنسان. فمنذ أن وصف العالم Doderlein بكتيريا حمض اللاكتيك المهبليّة و الدراسات حول طبيعتها المعقدة وتربطها مع عناصر أخرى من المضيف تتزايد بشكل كبير. وقد أدت الاستخدامات المتعددة للمضادات الحيوية ومنتجات الاستحمام المهبليّة وعوامل أخرى فيزيائية وهرمونية ومرضية إلى الإضرار بهذه الفلورا وبالتالي ظهور التهابات تناسلية مختلفة. ومع تزايد الصعوبات في علاج هذه الالتهابات توجه البحث إلى تفعيل دور بكتيريا حمض اللاكتيك المهبليّة لاستخدامها كبروبيوتيك إما للوقاية أو للعلاج تزامنا مع العلاجات المعتادة. قمنا في هذه الدراسة بعزل سبع وثلاثين بكتيريا تابعة للجنس *Lactobacillus* أخذت من واحد وأربعين امرأة سليمة. حددت هذه العزلات بطرق مظهرية ووراثية وتم اختيار ثلاثة وعشرين منها لأجراء اختبار التضاد مع أربعة ميكروبات ممرضة للجهاز التناسلي البولي وأيضا للكشف عن إنتاجها لحمض اللاكتيك وبيروكسيد الهيدروجين، والبكتريوسينات وتشكيلها للبيوفيلم. كما اختبرت في هذه الدراسة أيضا مجموعة من المضادات الحيوية ومنتجات الاستحمام المهبليّة لمعرفة تأثيرها على تسعة عزلات التي لها قدرة على تضاد كل الميكروبات الممرضة المدروسة. أظهرت نتائج ال PCR باستعمال بادئات خاصة بالجنس ثم بادئات خاصة بالمجموعة وأخرى بالنوع أن السبعة و الثلاثين عزلة تنتمي إلى الجنس *Lactobacillus* وإلى المجموعة IV وموزعة على النوعين *L. salivarius* و *L. reuteri*. يشير اختبار التضاد أن 39,13% من عزلات *Lactobacillus* تملك القدرة على تضاد الميكروبات الممرضة المدروسة. وأن الأس الهيدروجيني (pH) الناجم عن هذه العزلات تراوح بين 4,07 و 4,60 و أن العزلة L22 أنتجت أكبر كمية من حمض اللاكتيك بحموضة قدرت نسبتها ب 1,59%. تبين من خلال هذه الدراسة أن ثلاث عزلات فقط تنتج H_2O_2 بكميات قليلة. بينت نتائج تثبيط الميكروبات الممرضة برشاحات مأخوذة من العزلات L20, L19g, L15, L12, L10, L7 بعد إزالة التأثيرات المفترضة من حمض اللاكتيك و H_2O_2 احتمال احتواء هذه الرشاحات على مواد بروتينية هي إما بكتريوسينات أو أشباه بكتريوسينات. أشارت النتائج أيضا أن العزلات التسعة كانت حساسة للمضادات الحيوية TE, E, P, CD و مقاومة ل Met, VA, K وأن منتجات الاستحمام الثلاثة أظهرت أدنى تراكيز مثبطة للعزلات بين 0,09-1,5% بالإضافة إلى قدرات عزلات *Lactobacillus* المتفاوتة في تشكيل البيوفيلم.

بناء على النتائج المتحصل عليها، يمكن القول أن بكتيريا حمض اللاكتيك المهبليّة المدروسة أظهرت تأثيرات حيوية تجعل استخدامها في تجديد الفلورا المهبليّة ممكنا، شريطة المزيد من دراسات أخرى أكثر تعقيدا وبطرق عالية التقنين لاختيار منها ما يصلح لاستعماله في هذا التجديد قبل الدخول في الدراسات السريرية.

الكلمات الدالة: *Lactobacillus*، التضاد، حمض اللاكتيك، H_2O_2 ، البكتريوسينات، بيوفيلم، مضادات حيوية،

منتجات الاستحمام المهبليّة.

Résumé :

Le microbiote joue un rôle important dans le maintien de la santé humaine. Depuis la description de Doderlein, les études visant à déterminer la nature complexe de la flore vaginale et leurs interrelations avec d'autres membres de l'hôte ont proliféré énormément. L'utilisation de différents antibiotiques et des produits de douche vaginaux, en plus d'autres facteurs physiques, hormonaux et pathologiques favorise l'apparition de multiples infections génitales. L'incidence élevée des traitements non réussis et de récurrences rapides ont redirigé l'objet de la recherche sur la flore vaginale, car elle pourrait être utilisée comme probiotiques soit seule soit en combinaison avec des traitements conventionnels.

Trente-sept isolats de lactobacilles ont été prélevés auprès de quarante et une femmes saines et identifiés par des méthodes phénotypiques et génotypiques. Vingt-trois isolats ont subi un test d'antagonisme vis-à-vis de quatre germes responsables d'infections uro-génitales. La détection de la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, des bactériocines et la formation de biofilm ont été étudiées chez les isolats de ce groupe. Neuf isolats seulement montrant un large spectre d'activité antimicrobienne, ont été testés pour leur susceptibilité contre certains agents antibiotiques et antiseptiques.

Les résultats de la PCR par des amorces spécifiques au genre, aux groupes et aux espèces montrent que les 37 isolats sont affiliés au groupe IV du genre *Lactobacillus* et répartis en deux espèces *L. reuteri* et *L. salivarius*. Le test d'antagonisme indique que 39,13% de *Lactobacillus* vaginal étudiés possèdent un potentiel antimicrobien. Le niveau de pH induit par les isolats de lactobacilles variait de 4,07 à 4,60. L'isolat L22 produisait la plus grande quantité d'acide lactique avec une acidité titrable de 1,59%. Seulement trois isolats ont été mis en évidence pour produire le H₂O₂ en faibles quantités. L'activité des surnageants des isolats L7, L10, L12, L15, L19g et L20 après élimination des effets putatifs de l'acide lactique et H₂O₂ a soulevé la question pour une éventuelle production de substances protéiques (bactériocines ou bacteriocin-like). En outre, les isolats de lactobacilles ont montré des capacités variables dans la formation de biofilm. Neuf de ces lactobacilles testés étaient sensibles aux antibiotiques TE, E, P, CD et C et résistants à Met, VA et K, ils ont présenté aussi un effet inhibiteur avec une CMI allant de 1,5 à 0,09% par les trois produits de douche étudiés.

Les lactobacilles caractérisés dans notre étude montrent un potentiel probiotique qui pourrait être utilisé dans la régénérescence du microbiote vaginal. Des études plus complexes basées sur des méthodes hautement standardisées pour les sélectionner comme probiotiques vaginaux sont nécessaires, avant d'entrer au stade des études cliniques.

Mots clés : Lactobacilles vaginaux, activité antimicrobienne, acide lactique, H₂O₂, bactériocine, biofilm, antibiotiques, produits de douches vaginales.

Abstract

The microbiota plays a significant role in maintaining human health. Since the description of Doderlein, studies to elucidate the complex nature of vaginal flora and their interrelations with other members of the host proliferated tremendously. The use of various antibiotics and vaginal douche products in addition to other physical, hormonal and pathological factors promotes the development of multiple genital infections. High incidence of unsuccessful treatments and rapid recurrences re-directed the focus of research into vaginal flora as it might be used as a probiotic either alone or in combination with conventional therapies.

Thirty-seven lactobacilli isolates were collected from forty-one healthy women identified by phenotypic and genotypic methods. Twenty-three isolates were tested for antagonism against four germs responsible for urogenital infections. The detection of lactic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins production and biofilm formation were studied. Nine isolates showing a broad spectrum of antimicrobial were tested for their susceptibility to certain antibiotic and antiseptic agents.

The results of the PCR by primers specific to the genus, groups and species show that the 37 isolates belong to group IV of the genus *Lactobacillus* and are divided into two species *L.reuteri* and *L.salivarius*. The antagonism test indicated that 39.13% of the vaginal *Lactobacillus* studied had an antimicrobial potential. The pH level induced by *Lactobacillus* isolates ranged from 4.07 to 4.60. The L22 isolate produced the highest amount of lactic acid with a titratable acidity of 1.59%. Only three isolates were evidenced to produce the H₂O₂ in weak amounts. The supernatants activity of the isolates L7, L10, L12, L15, L19g and L20 after elimination of the putative effects of lactic acid and H₂O₂, raised the question for a possible production of proteinous substances (bacteriocin or bacteriocin-like). In addition, lactobacilli isolates showed varying capacities in biofilm formation. The nine lactobacilli tested were sensitive to antibiotics TE, E, P, CD and C and resistant to Met, VA and K, they also exhibited an inhibitory effect with a MIC ranging from 1.5 to 0.09% by the three douche products studied.

The lactobacilli characterized in our study show a significant probiotic potential which could be used in the regeneration of the vaginal microbiota. More complex studies based on highly standardized methods to select them as vaginal probiotics are needed before entering the stage of clinical studies.

Key words: Vaginal lactobacilli, antimicrobial activity, lactic acid, H₂O₂, bacteriocin, biofilm, antibiotics, vaginal douche products.

Table de Matière

Table de matière

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Partie bibliographique

Premier chapitre

L'écosystème de la flore vaginale

I. L'historique des lactobacilles vaginaux	4
II. L'écosystème vaginal.....	4
II.1. Physiologie vaginale.....	4
II.2. L'équilibre de la microflore.....	6
III. Evolution du microbiote vaginal au cours de la vie	6
IV. Relation flore vaginale et glycogène.....	8
V. Composition quantitative et qualitative des lactobacilles vaginaux.....	9

Deuxième chapitre

Rôle protecteur des lactobacilles vaginaux

I. Activité antimicrobienne des lactobacilles.....	10
II. Inhibition de la croissance du pathogène.....	10
II.1. Production d'acides organiques (majoritairement l'acide lactique).....	10
II.2. Production de peroxyde d'hydrogène.....	11
II.3. Production de bactériocines ou substances assimilées.....	13
II.4. Compétition des lactobacilles vis-à-vis des nutriments (par production d'arginine désaminase).....	15

III. Inhibition de l'adhésion du pathogène	15
III.1. Adhésion aux cellules épithéliales vaginales	15
III.2 Adhésion à la fibronectine humaine	16
III.3. Production des biosurfactants	16
III.4. Induction de la production de mucine	17
IV. Inhibition de l'expansion du pathogène : co-agrégation	18

Troisième chapitre

Facteurs de déséquilibre de la flore vaginale

I. Introduction	19
II. Déséquilibre de la flore vaginale lié à un facteur hormonal	19
II.1. Le cycle menstruel	19
II.2. La grossesse	20
II.3. Les contraceptifs hormonaux	21
III. Déséquilibre lié à la prise de médicaments	21
III.1. Les antibiotiques	21
III.2. Les corticoïdes et immunosuppresseurs	21
III.3. Les antiseptiques	22
IV. Déséquilibre relié à un comportement de la femme	22
IV.1. L'hygiène	22
IV.2. Les tenues vestimentaires	22
IV.3. Les moyens de contraception	23
IV.4. Stress chronique	23
IV.5. Rapports sexuels	24
V. Déséquilibre lié à un facteur pathologique	24
V.1. Le diabète	24
V.2. Le VIH	24

Quatrième chapitre

Moyens de régénérescence du microbiote vaginal

I. Introduction.....	25
II. Définition et rôle des différents traitements utilisés pour rééquilibrer la flore vaginale	25
II.1. Les probiotiques.....	26
II.1.1. Définition.....	26
II.1.2. Critères de sélection des souches.....	26
II.1.3. Effets probiotiques et voies d'administrations.....	27
II.2. Les prébiotiques.....	28
II.2.1. Définition.....	28
II.2.2. Les différents types de prébiotiques et leur voie d'administration.....	28
II.3. Les symbiotiques.....	30
III. Les produits de régénérescence de la flore vaginale disponibles.....	31

Cinquième chapitre

Matériel et méthodes

I. Echantillonnage.....	32
II. Isolement et purification.....	32
III. Identification des isolats.....	32
III.1. Etude Phénotypique.....	33
III.1.1. Etude morphologique.....	33
III.1.2. Etude biochimique.....	33
III.1.3. Etude physiologique.....	34
III.2. Etude génotypique.....	35
III.2.1. Extraction de L'ADN.....	35
III.2.2. Amplification par PCR.....	35
III.2.2.1. PCR spécifique pour le genre.....	35
III.2.2.2. Multiplex PCR spécifique pour le groupe.....	36
III.2.2.3. Multiplex PCR spécifique pour l'espèce.....	36

III.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose et imagerie.....	37
IV. Détermination de l'activité antimicrobienne des lactobacilles.....	38
V. Détection de la production de l'acide lactique.....	38
VI. Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène.....	38
VII. Détection de la production de bactériocines.....	39
VIII. Evaluation des propriétés d'adhérence des lactobacilles.....	39
VIII.1. Test d'adhérence sur tube en verre.....	39
VIII.2. Test d'adhérence sur microplaque.....	40
IX. Effet de trois détergents sur les lactobacilles sélectionnés.....	40
X. Effet de quelques antibiotiques sur les lactobacilles sélectionnés.....	41

Sixième chapitre

Résultats et discussion

I. Isolement des lactobacilles vaginaux.....	42
II. Identification des isolats.....	42
II.1. Etude morphologique.....	42
II.2. Etude biochimique et physiologique.....	43
II.3. Etude génotypique.....	44
II.3.1. PCR spécifique pour le genre.....	44
II.3.2. Multiplex PCR spécifique pour le groupe.....	46
II.3.3. Multiplex PCR spécifique pour l'espèce.....	47
III. L'activité antimicrobienne des lactobacilles.....	50
IV. Détection de la production de l'acide lactique.....	52
V. Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène.....	53
VI. Détection de la production de bactériocine.....	54
VII. Test d'adhérence sur tube en verre.....	56
VIII. Test d'adhérence sur microplaque.....	58
IX. Effet de trois détergents sur les lactobacilles sélectionnés.....	60
X. Effet de quelques antibiotiques sur les lactobacilles sélectionnés.....	61
Conclusion.....	65
Références bibliographiques.....	67
Annexes	
Publication et communications	

Liste des tableaux

Tableau 1 : exemples de bactériocines produites par des lactobacilles vaginaux.....	14
Tableau 2 : proposition des critères de sélection des probiotiques à application vaginale.....	27
Tableau 3 : des glucides ou des prébiotiques bénéfiques rapportés pour une utilisation en thérapeutique vaginale.....	29
Tableau 4 : les principales spécialités à base de probiotique.....	31
Tableau 5 : les espèces identifiées par multiplex PCR.....	37
Tableau 6 : compositions des détergents testés.....	40
Tableau 7 : test d'identification phénotypique des lactobacilles.....	43
Tableau 8 : les deux espèces des <i>Lactobacillus</i> vaginaux trouvées (n = 37).....	48
Tableau 9 : les zones d'inhibition en mm (moyenne ± écartype) des <i>Lactobacilles</i> isolés contre les germes testés.....	50
Tableau 10 : le pH et le pourcentage de l'acide lactique produit par les lactobacilles.....	52
Tableau 11 : l'activité antimicrobienne des surnageants obtenus à partir des lactobacilles testés.....	55
Tableau 12 : scores du biofilm formé sur la surface de verre.....	57
Tableau 13 : les densités optiques des <i>Lactobacillus</i> en biofilms.....	58
Tableau 14 : les zones d'inhibitions (en mm) des 8 ATB testés sur les 9 isolats.....	62

Liste des figures

Figure 1 : l'appareil génital féminin.....	5
Figure 2 : variation de la muqueuse vaginale au cours de la vie.....	7
Figure 3 : effet des lactobacilles vaginaux sur les souches à potentiel pathogène.....	10
Figure 4 : modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles.....	12
Figure 5 : mode d'action des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes.....	13
Figure 6 : mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adhésion.....	17
Figure 7 : régulation hormonale du cycle menstruel.....	20
Figure 8 : les différents niveaux d'action pour rééquilibrer la flore vaginale.....	26
Figure 9 : l'aspect macroscopique des différentes colonies des lactobacilles sur milieu MRSA.....	42
Figure 10 : observation de différentes formes des cellules de <i>Lactobacillus</i> sous microscope. Grossissement : 100×.....	42
Figure 11 : produits de PCR spécifiques au genre représentatif de 37 isolats sur gel d'agarose à 2%.....	45
Figure 12 : produits de PCR spécifiques au genre représentatif de 5 isolats sur gel d'agarose à 2%.....	45
Figure 13 : électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR de 37 isolats par multiplex PCR -G.....	46
Figure 14 : électrophorèse sur gel d'agarose de produits de PCR de 37 isolats par multiplex PCR spécifique à l'espèce.....	47
Figure 15 : produit de multiplex PCR-G et Multiplex PCR spécifique à l'espèce pour quelques isolats choisis au hasard.....	48
Figure 16 : l'activité antimicrobienne des lactobacilles vaginaux contre les germes infectieux : (A) <i>S. fonticola</i> ; (B) <i>E. coli</i> I; (C) <i>Staphylococcus</i> ; (D) <i>C. albicans</i>	51
Figure 17 : effet inhibiteur des SNT contre <i>S. fonticola</i> (1) et ST+c contre <i>C. albicans</i> (2).....	56
Figure 18 : échelle visuelle d'adhérence sur tube en verre.....	57

Figure 19 : effet des trois produits de douche sur les neuf isolats des lactobacilles.....	60
Figure 20 : l'effet inhibiteur du produit B sur l'isolat L21.....	60
Figure 21 : méthode semi-quantitative des disques sur milieu MRS pour l'isolat L7 inoculé en surface.....	62
Figure 22 : méthode semi-quantitative des disques sur milieu MRS pour l'isolat L19g (1) et l'isolat L21 (2).....	63

Liste des abréviations

L: *Lactobacillus*

E. coli: *Escherichia coli*

S. fonticola: *Serratia fonticola*

C. albicans: *Candida albicans*

sp: espèce inconnue

ssp: sous-espèce

PBS : Phosphate Buffered Saline

EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

DMSO: Diméthylsulfoxyde

MRS: Man-Rogosa et Sharpe

MRSA: MRS agar

MRSB: MRS bouillon

MRSBT: MRSB tamponné

MH: Mueller Hinton

GN: Gélose nutritive

BN : Bouillon nutritif

YEPD : Yeast peptone dextrose

SD : Sabouraud dextrose

ST : Surnagent tamponné

SNT : Surnagent Non tamponné

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

A: Adénine

G: Guanine

C: Cytosine

T: Thymine

PCR : Polymerase Chain Reaction

PCR-G : PCR spécifique au groupe

DO : Densité Optique

EPS : Exopolysaccharides

pH : Potentiel d'Hydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

UFC : Unité Formant Colonie

ATB : Antibiotique

UV : Ultraviolet

M, mM : Molaire, millimolaire

N : Normalité

rpm : Rotation par minute

tr/m : Tour par minute

U : Unité UI : Unité Internationale

V : Volt

v/v : Volume par volume

p/v : Poids par volume

Introduction

L'écosystème vaginal est constitué d'un microbiote protecteur, représenté majoritairement par les lactobacilles. Ces bactéries constituant la flore de Doderlein, ils sont de véritables gardiens de la cavité vaginale.

Malgré la diversité remarquable des espèces du genre *Lactobacillus*, cinq seulement présentent une nette dominance dans l'écosystème vaginal. Ces espèces composées de *L. crispatus*, *L. iners*, *L. vaginalis*, *L. jensenii* et *L. gasseri* ont été rapportées dans plusieurs études (Yoshimura *et al.*, 2011 ; Romero *et al.*, 2014). Toutefois, leur répartition est différente d'un sujet à un autre, cette différence est fondée sur la zone résidentielle, l'état de santé de la femme et la méthode de leur recherche (Vásquez *et al.*, 2002 ; Romero *et al.*, 2014).

En général, les lactobacilles vaginaux offrent une protection contre différentes maladies, y compris, la vaginose bactérienne, la candidose vaginale et les infections urinaires récurrentes. Cette protection est assurée par la production d'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène, des bactériocines et des biosurfactants (Dasari *et al.*, 2014). Les lactobacilles protègent aussi l'écosystème vaginal par l'exclusion compétitive, la co-agrégation, l'immunomodulation et la signalisation qui peuvent conduire à une régulation négative de la production de toxines dans les agents pathogènes (Kaewsrichan *et al.*, 2006 ; Reid *et al.*, 2011 ; Borges *et al.*, 2014).

Le glycogène peut fournir une source d'énergie pour la flore microbienne résidant dans le vagin et lorsqu'il est dépolymérisé, est métabolisé facilement par les lactobacilles (Kumar *et al.*, 2011 ; Mirmonsef *et al.*, 2014). Le glycogène est utilisé par les lactobacilles pour produire de l'acide lactique qui est en partie responsable de la régulation de l'environnement vaginal acide (anti-pathogène) (Turovskiy *et al.*, 2011). Les lactobacilles exigent une α -amylase à être présente dans le vagin pour dépolymériser la molécule de glycogène de haut poids moléculaire avant de pouvoir l'utiliser, ce processus est sous contrôle hormonal (Nasioudis *et al.*, 2015 ; Spear *et al.*, 2015).

La plupart des lactobacilles sont incapables de produire la catalase et, par conséquent, ils ne peuvent pas dégrader le H_2O_2 produit par la majorité de leur espèce. L'accumulation de H_2O_2 développe des propriétés oxydantes avec la production d'oxydants puissants tels que l'oxygène singulet, les radicaux superoxydes et les radicaux hydroxyles. Les espèces réactives d'oxygène peuvent causer des dommages irréversibles à un certain nombre de composants cellulaires tels que les enzymes, les constituants membranaires et l'ADN (Schurman, 2001 ; Dalié *et al.*, 2010).

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes de nature protéique produites par certaines espèces des lactobacilles, ces substances peuvent contenir un lipide ou un glucide associé, qui inhibent la croissance d'espèces bactériennes apparentées ou non apparentées (Riley et Chavan, 2007 ; Pascual *et al.*, 2008).

Cependant, la stabilité de l'écosystème vaginal est par définition très fragile et de nombreux facteurs peuvent contribuer à rompre l'équilibre de la flore vaginale tels que : les changements hormonaux, les grossesses, les comportements sexuels et l'utilisation des antibiotiques (Donders, 2007). Il existe également d'autres influences potentielles, comme le choix de la contraception, l'utilisation de produits d'hygiène personnelle ou des médicaments qui peuvent réduire les niveaux et l'activité des lactobacilles, ce qui conduit le vagin à être plus sensible aux infections par les agents pathogènes (Newton *et al.*, 2001 ; Zhou *et al.*, 2004).

Pour maintenir l'équilibre de cet écosystème, l'utilisation des lactobacilles comme probiotiques, et en effet connu comme le principal facteur pour régénérer la flore vaginale (Donnarumma *et al.*, 2014). Des travaux déjà réalisés par Mastromarino *et al.* (2002) dont trois souches (*L. brevis* CD2, *L. salivarius* ssp. *salicinius* FV2 et *L. gasseri* MB335) ont été sélectionnées pour leurs propriétés optimales, pour concevoir un produit pour une application locale dans le tractus vaginal. Des comprimés vaginaux contenant un mélange de ces trois souches de lactobacilles ont été produits et testés quant à la capacité d'interférer avec l'adhérence de *G. vaginalis* et *C. albicans* à la surface de la cellule, pour la production de composés antimicrobiens et pour le maintien de la viabilité des lactobacilles. Ainsi, il existe des avantages cliniques clairs à utiliser des outils prophylactiques ou biothérapeutiques (probiotiques et prébiotiques) pour le traitement et la prévention des infections vaginales (Al-Ghazzewi et Tester, 2016).

Selon la littérature, en Algérie peu de travaux qui ont abordé ce problème de régénérescence de la flore vaginale au vu l'intérêt remarquable de ce groupe bactérien reconnu sans risques sur la santé humaine, nous avons trouvé intéressant de traiter ce problème que nous considérons comme sujet important pour la santé publique.

Dans ce manuscrit, nous présentons tout d'abord une recherche bibliographique sur l'écosystème de la flore vaginale et leurs rôles protecteurs, les facteurs de déséquilibre de cette flore ainsi que les moyens de sa régénérescence. Puis nous exposons le matériel et les méthodes employés pour mener à bien nos travaux d'isolements, de sélections, et l'exploitation de ces bactéries comme agent de lutte contre les pathogènes. Ainsi, nous présenterons les résultats de notre étude en traitant successivement :

- L'identification des lactobacilles isolés de l'écosystème vaginal par des tests phénotypiques et génotypiques.
- L'inhibition vis-à-vis de quelques germes responsables des infections génitales.
- La détection des substances des lactobacilles antagonistes.
- L'adhérence *in vitro* de ces lactobacilles et l'étude de certains facteurs provoquant leur déséquilibre.

Finalement, ce manuscrit s'achève par une conclusion qui souligne les résultats marquant de ce travail et présente les perspectives et les nouvelles orientations que devraient amener les travaux ultérieurs.

Partie

Bibliographique

Premier chapitre

L'écosystème de la flore vaginale

I. L'historique des lactobacilles vaginaux

La première étude microbiologique du vagin humain était principalement descriptive en 1892 par le professeur Albert Döderlein (1860-1941). Il a noté qu'un groupe de microorganismes isolé d'un prélèvement vaginal de femmes enceintes normales, puis cultivés étaient une source d'acide lactique qui pourrait inhiber la croissance des pathogènes *in vitro* et *in vivo*. Il le croyait homogène et constitué de bacilles Gram positif, pléomorphes et asporogènes, généralement non mobiles, connues sous le nom de bacille de Döderlein. En 1928, Stanley Thomas a identifié le bacille de Döderlein comme *Lactobacillus acidophilus*, en ajoutant prophétiquement que celui-ci était un groupe caractéristique d'espèces apparentées, ou une espèce qui a subi une transformation remarquable. En 1980, conformément à l'observation de Thomas, un groupe d'organismes précédemment connus sous le nom de *L. acidophilus* s'est avéré hautement hétérogène (Lauer *et al.*, 1980). Ces espèces sont difficiles à distinguer phénotypiquement ou biochimiquement (Johnson *et al.*, 1980), donc elles ont été différenciées sur la base de l'homologie d'ADN, pour former un certain nombre d'espèces distinctes dans le complexe de *L. acidophilus* (Schleifer et Ludwig, 1995 ; Falsen *et al.*, 1999). Tous les *Lactobacillus* trouvés dans le vagin aujourd'hui sont membres de ce complexe (Hickey *et al.*, 2012).

II. L'écosystème vaginal

II.1. Physiologie vaginale : bien qu'il s'agisse d'un organe interne, le vagin n'est pas stérile en raison de sa connexion avec l'extérieur (Haya *et al.*, 2014). Le vagin est un carrefour reliant une zone stérile, l'utérus, à une zone septique, la peau avec l'anus en conséquence une microflore d'origines intestinale et cutanée peut donc s'y installer (Berrebi et Ayoubi, 1999) (figure 1).

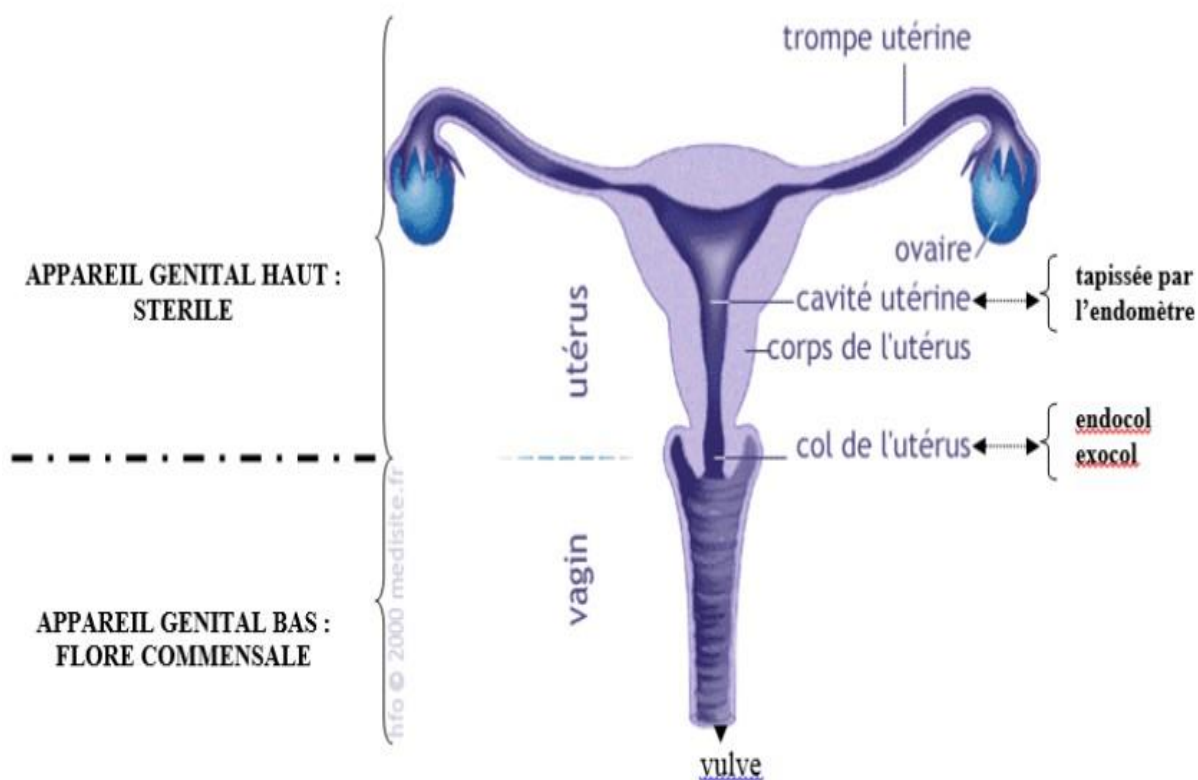


Figure 1 : l'appareil génital féminin

<http://www.microbiologie-medicale.fr/produits-pathologiques/prelevement-genitaux.html>

Le vagin 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 (MacGroarty, 1993). Les cellules épithéliales du vagin contiennent un grand nombre de récepteurs aux oestrogènes, qui répondent à la stimulation oestrogénique ovarienne (Llewellyn-Jones *et al.*, 2004). Le dépôt de glycogène dans l'épithélium est stimulé lors de taux élevés d'oestrogènes pendant la période post-pubertaire et pré-ménopausée (MacGroarty, 1993). Le milieu vaginal est composé d'une phase liquide (eau, substances d'origine plasmatique et constituants de la glaire cervicale) et d'éléments solides (cellules vaginales exfoliées, leucocytes etc....) (Denis *et al.*, 2007). Ainsi, par cette richesse de l'environnement vaginal, l'acquisition d'une flore microbienne naturelle est favorisée. Cette microflore vaginale forme des biofilms qui lui facilitent l'accès aux nutriments, lui permettent d'échapper aux cellules immunitaires et aux attaques antimicrobiennes, et lui assurent un meilleur contrôle de sa multiplication (Reid, 2001).

II.2. L'équilibre de la microflore

La composition de la microflore varie en fonction du cycle menstruel et de l'étape de la vie, principalement à cause des changements hormonaux et physiologiques. Les lactobacilles dominent lorsque les taux d'œstrogènes sont élevés (disponibilité en glycogène importante à l'origine du métabolisme fermentaire des lactobacilles) (MacGroarty, 1993). En général, chez une femme pendant la période post-pubertaire et pré-ménopausée, 95 % des bactéries sont des lactobacilles constituant la microflore de Doderlein. Les 5 % restants sont constitués d'espèces anaérobies (peptocoques, bacteroides et mycoplasmes) et aérobies (streptocoques, corynéformes et entérobactéries). La teneur en lactobacilles est alors en général de 10^8 à 10^9 cellules par ml de fluide. Par contre, de la naissance à la puberté puis après la ménopause, les bactéries anaérobies dominent (Askienazy-Elbhar, 2000).

Il est possible que lorsque les lactobacilles ne sont pas capables de prédominer dans l'environnement vaginal pour une raison quelconque, d'autres bactéries produisant de l'acide lactique commencent à occuper leur place. Des études réalisées par Rodriguez *et al.* (1999), Zhou *et al.* (2004) et Zhou *et al.* (2007) montrent que, chez certaines femmes, l'écosystème normal était maintenu en l'absence de *Lactobacillus* ; chez une femme la bactérie *Atopobium vaginae* a été identifiée comme le microorganisme dominant dans la flore et chez deux autres femmes, les bactéries *Atopobium*, *Megasphaera* et *Leptotrichia* étaient toutes, productrices d'acide lactique de la même manière que *Lactobacillus*. En outre, une autre étude réalisée par Lamont *et al.* (2011) confirme que, chez certaines femmes, sans signe d'infection vaginale (7-33%), ont un manque notable de lactobacilles et qui sont alors remplacés par ces trois bactéries.

III. Evolution du microbiote vaginal au cours de la vie

La formation des flores de l'organisme se produit majoritairement peu après la naissance par le passage vaginal de l'enfant lors d'un accouchement par voie basse mais également par contact cutané de l'enfant avec ses proches et son environnement, constituant un ensemble de flores relativement homogènes qui se différencieront au cours des semaines et mois suivants (Farage et Maibach, 2011 ; Hickey *et al.*, 2012). Dans les quatre premières semaines de vie, l'enfant bénéficie transitoirement des taux d'œstrogènes de la mère se traduisant au niveau vaginal par un pH abaissé qui tendra à se neutraliser et persistera dans cet état tout au long de l'enfance jusqu'à la puberté.

A la naissance, le domaine urogénital est quasiment stérile puis se rapproche de la composition intestinale au cours des jours et semaines suivantes. Entre 8 et 13 ans en moyenne, la maturation des organes sexuels entraîne une augmentation des taux d'œstrogènes dans les tissus vaginaux induisant l'épaississement de l'épithélium et la production intracellulaire de glycogène. Ce changement des conditions environnementales entraîne une sélection au niveau des microorganismes urogénitaux. Cette situation favorise ceux qui sont capables de métaboliser le glycogène en acide lactique, participant ainsi à l'acidification du milieu avec établissement d'un pH entre 4 et 4,5 constituant ainsi une barrière défensive inhibitrice de la croissance des pathogènes. De façon générale, la flore adulte est considérée comme acquise dès l'adolescence (autour de 14 ans). Elle persiste au cours de la vie jusqu'à la ménopause où la diminution de la production d'œstrogène modifie de nouveau les populations de microorganismes avec l'affinement de l'épithélium vaginal et une diminution des taux de glycogène et des sécrétions muqueuses (figure 2). Une étude récente dans laquelle des bébés nés par césarienne ont été exposés au microbiote vaginal de la mère, a conduit à une reconstitution partielle du microbiote du nourrisson après 30 jours, similaire à celle du microbiote des bébés nés par voie normale (Dominguez-Bello *et al.*, 2016).

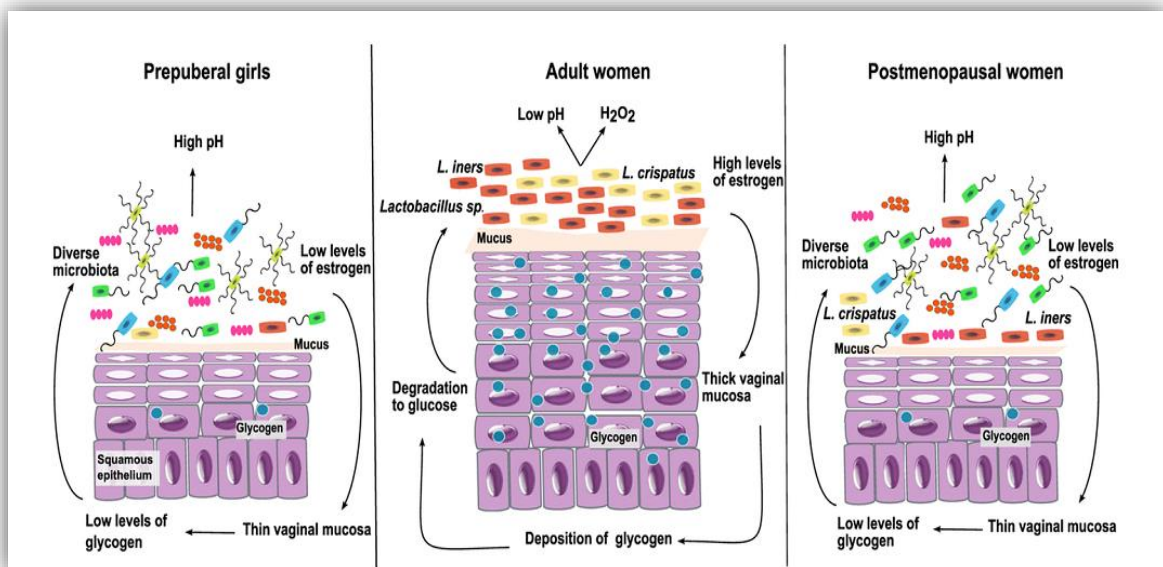


Figure 2 : variation de la muqueuse vaginale au cours de la vie (Petrova *et al.*, 2013).

IV. Relation flore vaginale et glycogène

Les lactobacilles sont présents sur l'épithélium vaginal maintenu hydraté par un mélange de transsudats et de sécrétions provenant de glandes sécrétrices situées dans le tractus génital supérieur et de la muqueuse cervicale. Les sécrétions vaginales sont un mélange en proportions variables d'ions, de peptides, de glycoprotéines, d'acides lactique, d'acide acétique, de glycérol, d'urée et de glycogène. Elles contiennent également des cellules exfoliées dont celles provenant de la couche superficielle de l'épithélium vaginal en période de stimulation oestrogénique (Spear *et al.*, 2014). Au cours de la dégradation de ces dernières, le glycogène contenu dans leur cytoplasme est libéré et rendu accessible pour sa métabolisation. Cependant, un grand nombre de lactobacilles ne sont pas capables de métaboliser directement ce substrat (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Spear *et al.*, 2015).

L'espèce *L. iners* semble être la mieux adaptée à la digestion du glycogène avec un développement proportionnel aux augmentations de concentration. *L. crispatus* lui aussi est compétent même s'il paraît nécessiter des taux de substrat plus élevés. En revanche, *L. gasseri* et *L. jensenii* ne peuvent pas utiliser le glycogène comme source nutritive. Comment expliquer alors leur présence significative dans le milieu urogénital ? La réponse à cette question est constituée par la présence dans les sécrétions vaginales d'une α -amylase qui se charge de dégrader le glycogène en métabolites osidiques plus petits et non ramifiés comprenant le glucose facilement assimilable par les lactobacilles. A partir de cela, ces derniers réalisent une glycolyse anaérobie (la cavité vaginale étant virtuelle et très pauvre en oxygène, elle est assimilée à un environnement anaérobie) produisant de l'acide lactique qui participe à l'abaissement du pH vaginal. L'acidité du milieu est un paramètre qui influence l'activité de l' α -amylase (Chapman *et al.*, 2014). En effet son activité est maximale quand le milieu se trouve autour d'un pH 6 et se trouve diminuée de moitié au pH vaginal situé de 4 à 4,5. Cela semble s'opposer au maintien de la dominance des lactobacilles dans le milieu : si l'activité enzymatique diminue, la quantité de substrat diminue donc théoriquement l'abondance des communautés aussi. Or dans les faits, il y a corrélation entre des taux de glycogène importants et le développement des populations du microbiote. La raison expliquant cela reste encore aujourd'hui obscure. Certaines hypothèses avancées envisagent la possibilité de participation d'autres enzymes d'origine bactérienne comme complément dans la dégradation du glycogène (Aude, 2016).

V. Composition quantitative et qualitative des lactobacilles vaginaux

Grâce aux nouvelles techniques d'identification basées sur l'étude des séquences d'ADN, la taxonomie des lactobacilles a été revue. Ce genre comprend actuellement plus de 170 différentes espèces (Goldstein *et al.*, 2015) et seulement une partie d'entre elles sont des représentants protecteurs du microbiote vaginal (Mastromarino *et al.*, 2013).

Dans le vagin, ils sont en concurrence constante et dominent en permanence 50 autres bactéries aérobies (Lamont *et al.*, 2011). Ces organismes comprennent *L. gasseri*, *L. fermentum*, *L. jensenii*, *L. crispatus*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. acidophilus* et *L. vaginalis* (Jin *et al.*, 2007 ; Martinez-Pena *et al.*, 2013). D'autres études de littérature indiquent que quatre principales espèces vaginales dominent : *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* et *L. gasseri*, avec d'autres lactobacilles dans une moindre mesure, comme *L. acidophilus*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* et *L. vaginalis* (Ravel *et al.*, 2011 ; Nader-Macias et Tomas, 2015). Ce sont les espèces les plus abondantes dans la flore vaginale. Elles sont retrouvées chez toutes les populations malgré l'existence d'une diversité quantitative selon les individus. En effet plusieurs études montrent des variations dans les proportions microbiologiques entre les femmes de types ethniques différents (Zhou *et al.*, 2010 ; Ravel *et al.*, 2011 ; Fettweis *et al.*, 2014). Il est important de garder à l'esprit que la composition du microbiote vaginal présente de grandes variations avec des facteurs liés à l'ethnicité, les facteurs culturels et sociaux et le statut hormonal de l'hôte (Ravel *et al.*, 2011). Il peut même montrer des changements dramatiques dans la même personne pour une période relativement courte (Thoma *et al.*, 2011).

Deuxième chapitre

*Rôle protecteur des lactobacilles
vaginaux*

I. Activité antimicrobienne des lactobacilles

Les lactobacilles participent par de nombreux mécanismes dans la protection de l'écosystème vaginal, contre les micro-organismes pathogènes susceptibles de coloniser la sphère vaginale, mais aussi les voies génitales hautes (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Spurbeck et Arvidson, 2011). L'ensemble des mécanismes décrits ci-dessous sont résumés dans la figure 3.

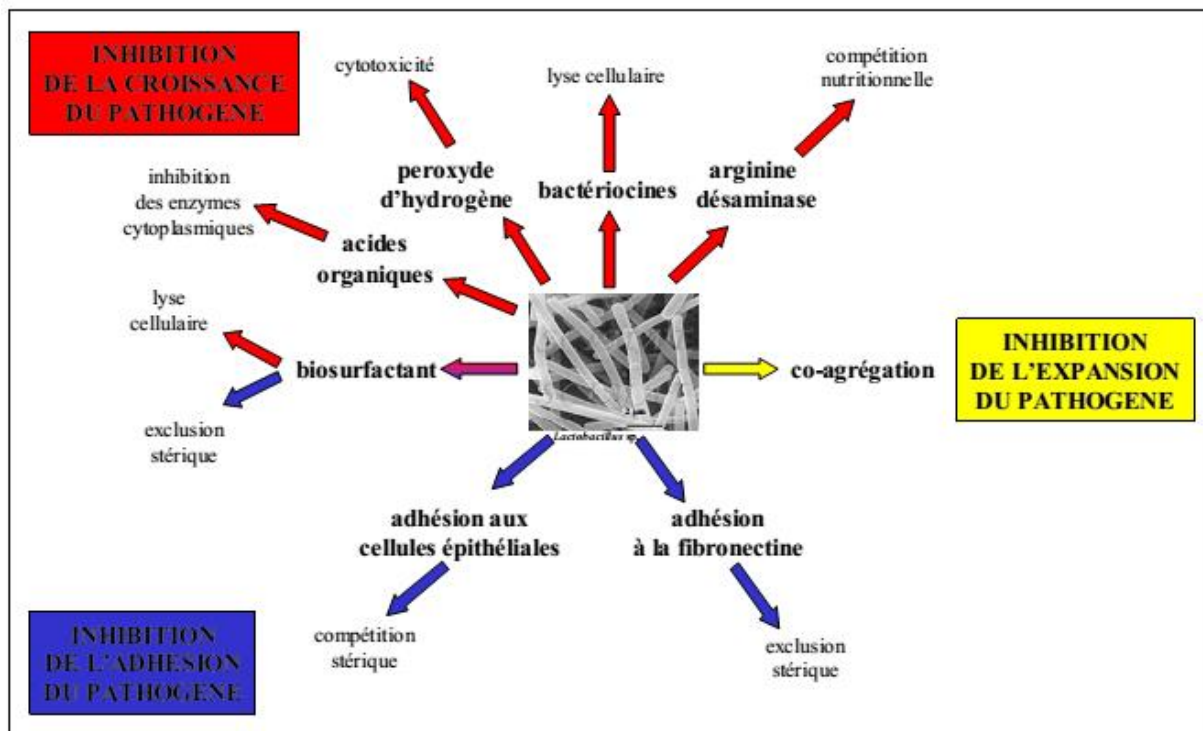


Figure 3 : effet des lactobacilles vaginaux sur les souches à potentiel pathogène (Lepargneur et Rousseau, 2002).

II. Inhibition de la croissance du pathogène

II.1. Production d'acides organiques (majoritairement l'acide lactique)

Comme cité précédemment, il y a une possibilité de faire un lien entre l'abondance en souches de lactobacilles, le pH vaginal et la quantité de substrat du milieu vaginal. Le glucose issu de la dégradation du glycogène est assimilé par les lactobacilles et dégradé par la glycolyse.

Les lactobacilles et autres organismes consommant ce substrat dans le milieu vaginal produisent des lactates au niveau de leur cytoplasme, avant d'être excrétés dans le milieu extérieur où ils prennent selon le pH leur forme active d'acide lactique (O'Hanlon *et al.*, 2011 ; Chapman *et al.*, 2014). Même si les lactobacilles sont les principaux contributeurs de l'acidification vaginale, ils ne sont pas les seuls à pouvoir réaliser la production d'acide lactique : l'épithélium vaginal en est lui aussi un producteur, capable aussi de réaliser les opérations de synthèse, mais ne peut former qu'une seule forme isomérique (L), alors que les lactobacilles peuvent produire les deux isomères (D et/ou L) (Gorodeski *et al.*, 2005 ; O'Hanlon *et al.*, 2013). Dans son action, l'acide lactique augmente la perméabilité membranaire des bactéries à coloration de Gram négatives, entraînant une acidification du cytoplasme conduisant à une inhibition du métabolisme bactérien. Un autre acide est aussi détectable dans le microbiote vaginal : il s'agit de l'acide acétique. Il est métabolisé à partir de l'acide lactique présent dans le milieu par certaines souches bactériennes mais aussi par des lactobacilles.

Enfin, un dernier mécanisme minoritaire mais néanmoins existant, participe à l'acidification de la muqueuse vaginale. Au niveau du pôle apical de l'exocol, des pompes à protons (H^+ -ATPases) envoient des protons du milieu intracellulaire vers la lumière vaginale. Elles peuvent être uni- ou double sens avec échange d'ions potassium (K^+) provenant des sécrétions vaginales. Ces différents mécanismes participent au maintien de l'homéostasie vaginale en imposant une contrainte environnementale acide aux souches microbiennes présentes. Seules celles étant acidophiles telles que les lactobacilles peuvent s'y développer, la plupart des souches à potentiel pathogène (à l'exception de *C. albicans*) présentant une sensibilité à ce type de milieu (Ventolini, 2015).

II.2. Production de peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène est produit par certains lactobacilles en aérobiose. Ces derniers ne possèdent pas d'hème et n'utilisent pas le système cytochrome pour l'oxydation terminale pendant le processus respiratoire mais une oxydase flavoprotéinique qui réduit l'oxygène en peroxyde d'hydrogène. La toxicité de ce dernier est due au pouvoir oxydant de la molécule elle-même ou de ses métabolites OH^\cdot (radical hydroxyle) et O_2^- (anion superoxyde) produits par des agents réducteurs (ions halogénures du type Cl^-) et des enzymes peroxydases qui sont présentes dans le fluide vaginal. Ces molécules peuvent agir sur les protéines (inactivation des enzymes cytoplasmiques), sur les lipides membranaires (augmentation de la perméabilité membranaire) et sur les acides nucléiques (induction de mutations) (figure 4).

Par contre, l'autodestruction des lactobacilles est évitée pour ceux possédant une NADH peroxydase qui transforme le peroxyde d'hydrogène. Ce système leur permet de se protéger contre les molécules oxydatives qu'ils créent (Lepargneur et Rousseau, 2002).

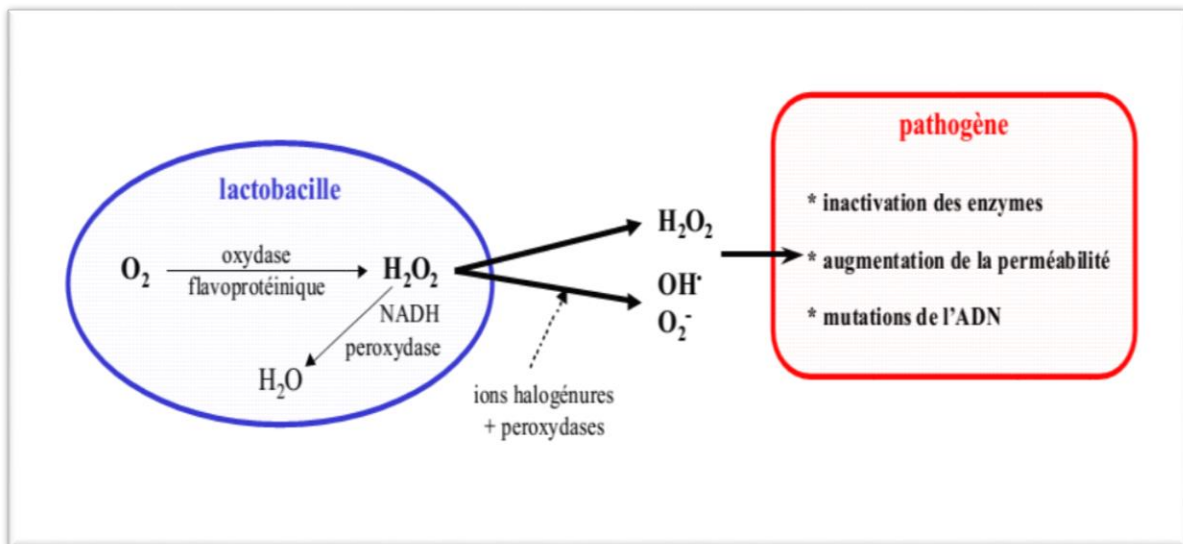


Figure 4 : modes d'action sur les pathogènes du peroxyde d'hydrogène et de ses dérivés produits par les lactobacilles (Lepargneur et Rousseau, 2002).

La production de peroxyde d'hydrogène par les lactobacilles vaginaux représente, avec la production d'acide lactique, un des mécanismes de défense les plus importants pour lutter contre la colonisation de la cavité vaginale par des micro-organismes pathogènes (Martin et Suarez, 2010). Le pH influence l'activité antibactérienne du peroxyde. L'effet bactéricide de H_2O_2 est, de fait, considérablement augmenté en milieu acide, par le couplage peroxydase-ion halogénure tandis que l'activité de la catalase est, elle, augmentée dans un environnement neutre et diminuée en milieu acide. Certains pathogènes produisent une catalase qui rompt la molécule de H_2O_2 en O_2 et H_2O et empêche ainsi la formation des métabolites oxydants actifs et de ce fait, la production d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène sont donc deux mécanismes de défense synergiques et nécessaires pour inhiber les pathogènes. La production d' H_2O_2 seule n'est pas suffisamment protectrice (Spurbeck et Arvidson, 2011).

Si des études *in vitro* ont démontré l'efficacité des peroxydes contre les pathogènes urogénitaux habituels, la réalité *in vivo* semble contredire ces observations (O'Hanlon *et al.*, 2011). En effet, la concentration effective de peroxyde capable d'inhiber toutes les souches microbiennes pathogènes présentes, correspond à 50 fois ce que peuvent produire les souches de lactobacilles urogénitaux dans des conditions optimales et aérobies, et 5000 fois

la concentration réelle estimée au niveau physiologique. Enfin, les sécrétions vaginales ont une action inhibitrice sur ses fonctions actives aux doses physiologiques.

L'action du peroxyde d'hydrogène *in vivo* est potentialisée par le couplage avec des ions halogénures présents au niveau des sécrétions génitales. Il est alors actif sur la plupart des bactéries pathogènes courantes sans présenter de toxicité excessive (Aude, 2016).

Différentes études ont montré que *L. crispatus* et *L. jensenii* étaient les plus efficaces pour produire du peroxyde d'hydrogène et possédaient ainsi une capacité protectrice vis-à-vis les infections (Lamont *et al.*, 2011 ; Aude, 2016). Ainsi, il a été montré que la fréquence des vaginoses bactériennes est moindre, chez les femmes colonisées par des lactobacilles producteurs de H₂O₂, par rapport à celles qui sont colonisées par des lactobacilles non producteurs de H₂O₂ ou par d'autres espèces bactériennes (Martin et Suarez, 2010).

II.3. Production de bactériocines ou substances assimilées

Les bactériocines sont des protéines antimicrobiennes à spectre d'action restreint, synthétisées aussi par les lactobacilles. Elles agissent en se fixant sur un récepteur spécifique de la cellule cible et en déstabilisant la membrane cytoplasmique par la formation de pores, entraînant ainsi la lyse de la bactérie (figure 5). Au niveau vaginal, elles sont produites chez certaines souches comme *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. salivarius* ou encore *L. casei ssp rhamnosus* et peuvent avoir une action synergique avec l'acide lactique ou le peroxyde d'hydrogène (Lecomte, 1999 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

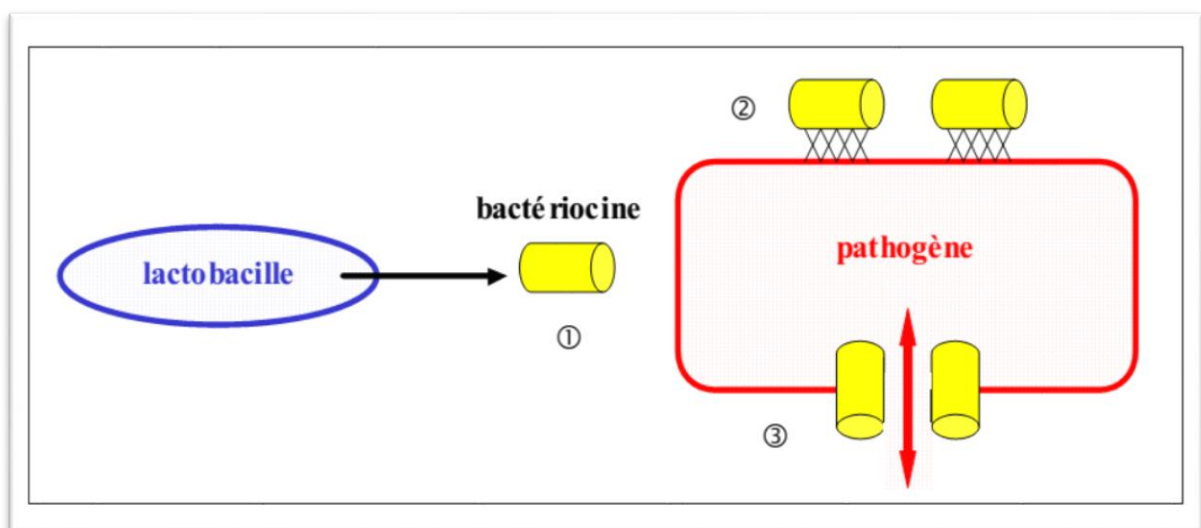


Figure 5 : mode d'action des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes (Ocana et Nader-Macias, 2004).

Les principales bactériocines sont la lactoline, l'acidoline, la lactocidine, la lactobacilline et l'acidophilline de *L. acidophilus*, la lactobrevine (Lepargneur et Rousseau, 2002).

Les substances assimilées aux bactériocines (bacteriocin-like) sont des substances antimicrobiennes à spectre d'action plus large. Ces substances jouent un rôle bactériostatique, voire bactéricide (Bohbot, 2008).

Il existe, en fonction des souches de lactobacilles, plusieurs types de bactériocines avec des activités et des cibles différentes. Par exemple, *L. fermentum* produit une bactériocine avec une activité fongicide spécifique dirigée contre *C. albicans* alors que *L. gasseri*, *L. crispatus* et *L. jensenii* produisent eux une bactériocine-like avec un spectre d'action beaucoup plus large qui serait capable d'inhiber à la fois *G. vaginalis*, *C. albicans* et la souche uropathogène *E. coli*. Cependant, d'autres études menées sur ces trois mêmes souches de lactobacilles n'ont pas réussi à mettre en évidence cette propriété microbicide. Cela indique que les bactériocines ne sont pas produites de façon universelle par toutes les souches de lactobacilles (Spurbeck et Arvidson, 2011). Le tableau 1 rapporte quelques exemples de bactériocines isolées à partir des souches de lactobacilles d'origine vaginale.

Tableau 1 : exemples de bactériocines produites par des lactobacilles vaginaux (Dover *et al.*, 2008)

Espèces	Bactériocine	Spectre d'activité	Référence
<i>L. salivarius</i> CRL1328	Non précisé	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Ocana <i>et al.</i> , 1999
<i>L. pentosus</i> TV35b	Pentocin TV35b	<i>Clostridium sporogenes</i> <i>Clostridium tyrobutyricum</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Lactobacillus sakei</i> <i>Listeria innocua</i> <i>Propionibacterium acidipropionici</i> <i>Candida albicans</i>	Okkers <i>et al.</i> , 1999
<i>L. rhamnosus</i> 160	Lactocin 160	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Prevotella bivia</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> <i>Peptostreptococcus assacharoliticus</i> <i>Micrococcus luteus</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Aroutcheva <i>et al.</i> , 2001b ; Li <i>et al.</i> , 2005

La gassericine E (GasE) est une nouvelle bactériocine produite par *L. gasseri* EV1461 qui est une souche isolée du vagin d'une femme saine, cette dernière inhibe le développement des pathogènes associée à la vaginose bactérienne (Maldonado-Barragán *et al.*, 2016).

II.4. Compétition des lactobacilles vis-à-vis des nutriments (par production d'arginine désaminase)

Il s'agit d'empêcher la formation de métabolites nocifs en métabolisant le substrat nutritif concerné avec une autre enzyme donnant des produits non agressifs. L'exemple le plus connu est la métabolisation de l'arginine (qui est un acide aminé présent au niveau vaginal, très prisé par certaines bactéries anaérobies pathogènes, dont *G. vaginalis*) par l'arginine décarboxylase au cours des bactérioses vaginales qui conduit à la production d'une polyamine, la putrescine qui entraîne l'alcalinisation du milieu vaginal, une mauvaise odeur caractéristique de la présence de germes anaérobies au sein de la flore, la destruction de l'intégrité de la muqueuse vaginale, inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire et en fin l'altération du transport des antibiotiques. Certains lactobacilles synthétisent une autre enzyme, l'arginine désaminase active sur le même substrat mais dont les métabolites sont la citrulline et l'ammoniac qui sont des sources nutritives pour les lactobacilles. Cette compétition pour les substances nutritives entraîne une limitation du développement des souches potentiellement pathogènes et des désagréments occasionnés par leurs produits de dégradation (Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Aude, 2016).

III. Inhibition de l'adhésion du pathogène

III.1. Adhésion aux cellules épithéliales vaginales

En plus des mécanismes inhibant la croissance des pathogènes, les lactobacilles peuvent empêcher les bactéries pathogènes d'adhérer aux récepteurs des cellules hôtes et protègent ainsi le tractus vaginal. On retrouve, au niveau de la muqueuse, des récepteurs spécifiques auxquels adhèrent les lactobacilles. Ces derniers possèdent pour ces récepteurs une plus grande affinité que les bactéries pathogènes permettant de s'y fixer durablement et même d'exclure les pathogènes qui y sont déjà fixés (Spurbeck et Arvidson, 2011).

Il existe deux types de mécanismes qui expliquent l'adhérence des lactobacilles aux cellules épithéliales vaginales (figure 6). Le premier consiste en une adhérence spécifique via des adhésines, ils s'agissent des petites structures de nature variable (protéique, polysaccharidique, lipoteichoïque...), qui sont présentes au niveau des surfaces externes de la paroi. Elles viennent se fixer au niveau de sites récepteurs des cellules épithéliales ou du mucus vaginal. Les sites récepteurs sont, soit des glycoprotéines, soit des glycolipides. Par exemple l'acide lipoteichoïque présent à la surface des lactobacilles se fixe directement et spécifiquement sur les sites récepteurs présents au niveau de l'épithélium vaginal.

Le second consiste en une adhérence non spécifique permise par les différentes interactions physico-chimiques qui peuvent exister entre les lactobacilles et les cellules épithéliales vaginales (force de Van Der Waals, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes...). Les sites récepteurs des acides lipoteichoïques et les différentes interactions peuvent exister aussi bien au niveau des cellules épithéliales vaginales qu'au niveau du mucus recouvrant la surface cellulaire, ce qui garantit une protection de l'écosystème vaginal d'autant plus importante (Lepargneur et Rousseau, 2002). Cela aboutit à la création d'un biofilm protégeant la muqueuse vaginale et empêchant par encombrement stérique l'adhérence des bactéries pathogènes (Spurbeck et Arvidson, 2011).

III.2 Adhésion à la fibronectine humaine

La fibronectine c'est une molécule de haut poids moléculaire présente naturellement au niveau de la matrice extracellulaire recouvrant la surface des cellules épithéliales vaginales, et également présente au niveau du fluide vaginal, constitue un mécanisme supplémentaire d'adhérence. En effet, certaines souches de lactobacilles ont l'avantage de se fixer de manière sélective à la fibronectine empêchant ainsi la fixation des pathogènes (Bohbot, 2007) (figure 6). Cette adhérence est d'autant plus forte que le pH vaginal est acide (Lepargneur et Rousseau, 2002).

III.3. Production des biosurfactants

Ce sont des molécules glycolipidiques ou lipopeptidiques amphiphiles synthétisées par les constituants microbiens de la flore dont les lactobacilles. Par leur nature, elles permettent la stimulation de la croissance de ces bactéries. Les biosurfactants permettent au lactobacille d'utiliser les substances organiques comme sources de nutriments par émulsification des composés carbonés hydrophobes. Ces substances favorisent aussi l'adhésion intercellulaire et la régulation du biofilm en agissant sur les tensions de surface et en renforçant les interactions entre la flore et la muqueuse vaginale (figure 6). Les biosurfactants sont présents aussi bien chez certains lactobacilles comme *L. fermentum* et *L. acidophilus* que chez des souches pathogènes tels que *E. coli* et *C. albicans*. Certains de ces molécules semblent avoir un effet antimicrobien par effet sur les tensions superficielles membranaires pouvant entraîner une rupture cellulaire à forte concentration (Spurbeck et Arvidson, 2011 ; Bohbot et Lepargneur, 2012 ; Aude, 2016).

III.4. Induction de la production de mucine

La mucine est le composé principal du mucus. Celle-ci protège la muqueuse vaginale et permet ainsi d'optimiser le rôle de la barrière de cette muqueuse vis-à-vis de la colonisation microbienne. La mucine est une glycoprotéine qui forme un réseau, une sorte de gel recouvrant les cellules épithéliales. Cette matrice est difficilement pénétrable par les microorganismes. On sait que la flore digestive présente au niveau du tractus intestinal est capable d'induire la production de mucine. Cela n'a pas encore été démontré pour les lactobacilles vaginaux mais il a été démontré que l'adhérence de *C. albicans* est diminuée par la présence du mucus (Spurbeck et Arvidson, 2011).

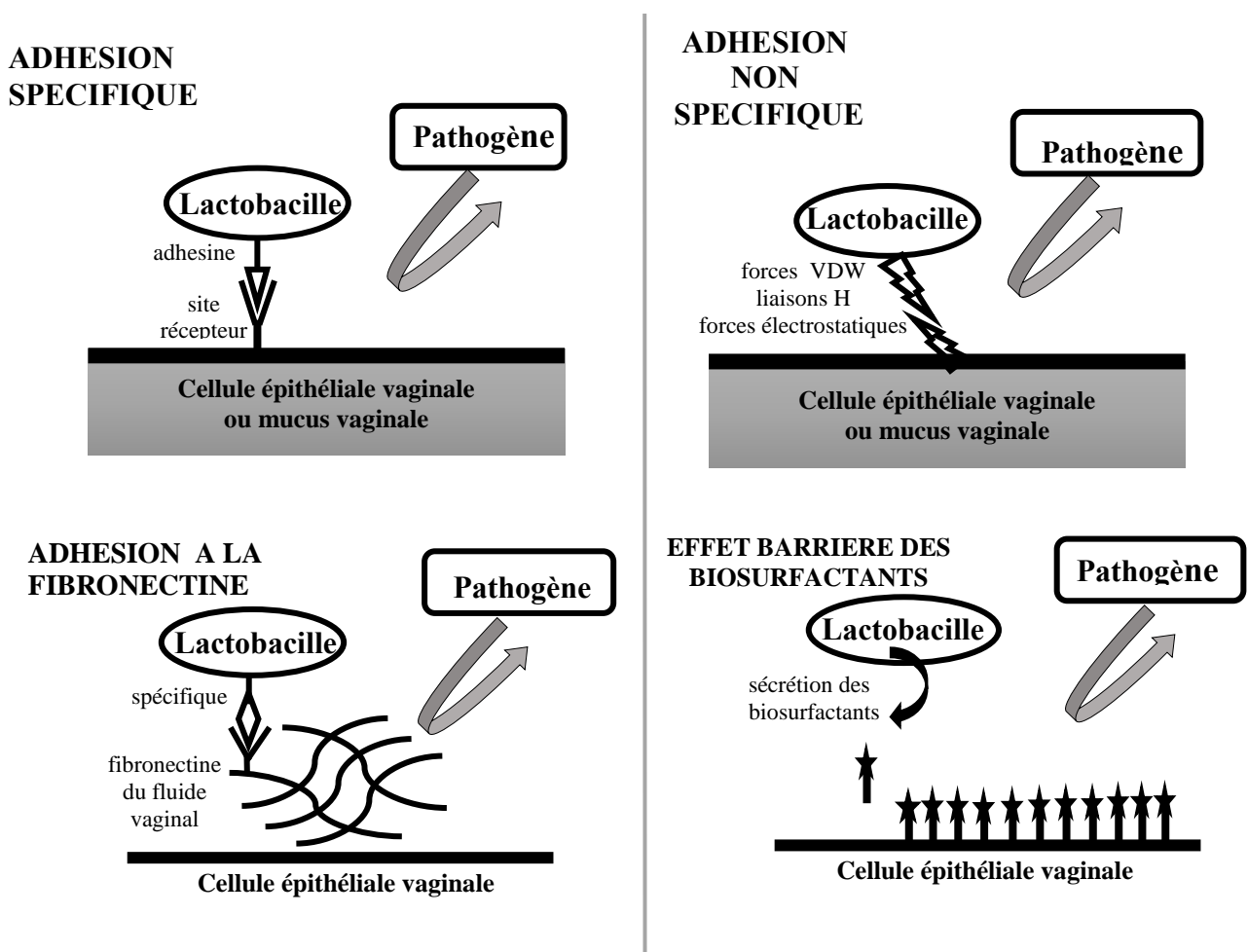


Figure 6 : mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adhésion (Lepargneur et Rousseau, 2002)

IV. Inhibition de l'expansion du pathogène : co-agrégation

Certains lactobacilles peuvent protéger l'écosystème vaginal en se co-agréant avec des micro-organismes pathogènes. Ils empêchent ainsi l'accès des pathogènes aux récepteurs des cellules épithéliales et leur adhérence à la muqueuse. Cela permet alors au fluide vaginal de les évacuer plus rapidement hors du tractus vaginal et cela favorise également l'action de tous les composés bactéricides vus précédemment (acide lactique, peroxyde d'hydrogène, bactériocines...) (Spurbeck et Arvidson, 2011).

Les espèces *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. acidophilus* sont capable de se co-agréer avec *E. coli*, *C. albicans* et *G. vaginalis* empêchant ainsi l'expansion de ces pathogènes (Bohbot, 2007). Tous les lactobacilles ne co-agrègent pas les pathogènes avec la même intensité, certains produisent un facteur promoteur de l'agrégation (FPA) qui leur permet d'être plus efficace, notamment vis-à-vis de *E. coli* (Spurbeck et Arvidson, 2011)

D'autres hypothèses concernant les mécanismes de défense des lactobacilles ont été posées. Celles-ci sont encore à l'étude. Par exemple, certains lactobacilles pourraient augmenter la fonction de barrière de la muqueuse vaginale en protégeant les jonctions entre les protéines au niveau des cellules épithéliales ou encore, certaines souches diminueraient l'expression des facteurs de virulence des pathogènes en interférant avec l'expression de certains gènes (Spurbeck et Arvidson, 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 toutes ces propriétés. Ce qui explique que certaines femmes possédant une flore « normale », c'est-à-dire constituée d'un nombre suffisant de lactobacilles, peuvent quand même être sujettes aux infections vaginales (Bohbot, 2007 ; Bohbot, 2008).

A côté de tous les mécanismes de défense déployés par ces derniers, Rose *et al.* (2012) ont rapporté que les lactobacilles vaginaux jouent un rôle important dans la prévention des infections bactériennes pathogènes, par modulation des systèmes immunitaires dans le tractus vaginal en sécrétant de cytokines inflammatoires par des cultures de cellules épithéliales vaginales stimulées par des composants bactériens.

Troisième chapitre

*Facteurs de déséquilibre de la flore
vaginale*

I. Introduction

L'harmonie de la cohabitation entre la muqueuse vaginale et sa flore et entre les différentes espèces qui la constituent se révèle fragile. Lorsque la quantité de lactobacilles se réduit, les germes pathogènes peuvent se multiplier (Linhares *et al.*, 2010). Par conséquent, le vagin perd beaucoup de sa capacité d'auto-nettoyage et les défenses naturelles (Jaisamrarn *et al.*, 2013). Une rupture de cet équilibre peut être un facteur qui induit des infections (Maggi *et al.*, 2000). Les causes de déséquilibre sont multiples :

- Hormonales dans les cas de troubles de la sécrétion glycogénique lors d'une grossesse, d'alcalinisation du milieu vaginal lors des périodes de menstruation, de la prise de contraceptifs oraux et de la ménopause,
- Physiques dues à certaines habitudes sexuelles, une mauvaise hygiène intime, l'utilisation de spermicides, de diaphragmes, de dispositifs intra-utérins et parfois de tampons,
- Pathologiques dans le cas de patientes diabétiques ou immunodéficientes,
- Iatrogènes induites par des traitements aux antibiotiques à large spectre d'action, par la prise d'ovules, par l'utilisation d'antiseptiques, par la radiothérapie et par des interventions chirurgicales (Barbes et Boris, 1999 ; Berrebi et Ayoubi, 1999).

II. Déséquilibre de la flore vaginale lié à un facteur hormonal

II.1. Le cycle menstruel

La quantité d'hormones, et tout particulièrement des œstrogènes, varie au cours d'un cycle menstruel. Même courte dans le temps cette variation hormonale, va influencer la composition quantitative et qualitative de la flore vaginale. En effet, en début de cycle, l'imprégnation oestrogénique est plus basse et couplée avec la présence abondante de sang dû aux menstruations (figure 7). Ces deux faits entraînent une diminution de la quantité de lactobacilles ainsi qu'une légère augmentation du pH vaginal, faisant de cette vulnérable période, un moment propice à la survenue d'infections vaginales (Turovskiy *et al.*, 2011). Parmi les potentiels pathogènes qui peuvent être retrouvés au moment des règles, *G. vaginalis* est fréquemment rencontré. Pendant cette période, on observe une augmentation du nombre de cette bactérie et une diminution des lactobacilles (Srinivasan *et al.*, 2010). Pendant la deuxième période du cycle, les concentrations plasmatiques en œstrogènes et en progestérone augmentent. Ces conditions sont favorables au développement de *Candida* pathogène. Une mycose vaginale aura plus tendance à se développer au cours de la deuxième partie du cycle (Patel *et al.*, 2004 ; Sobel, 2007 ; Spacek *et al.*, 2007).

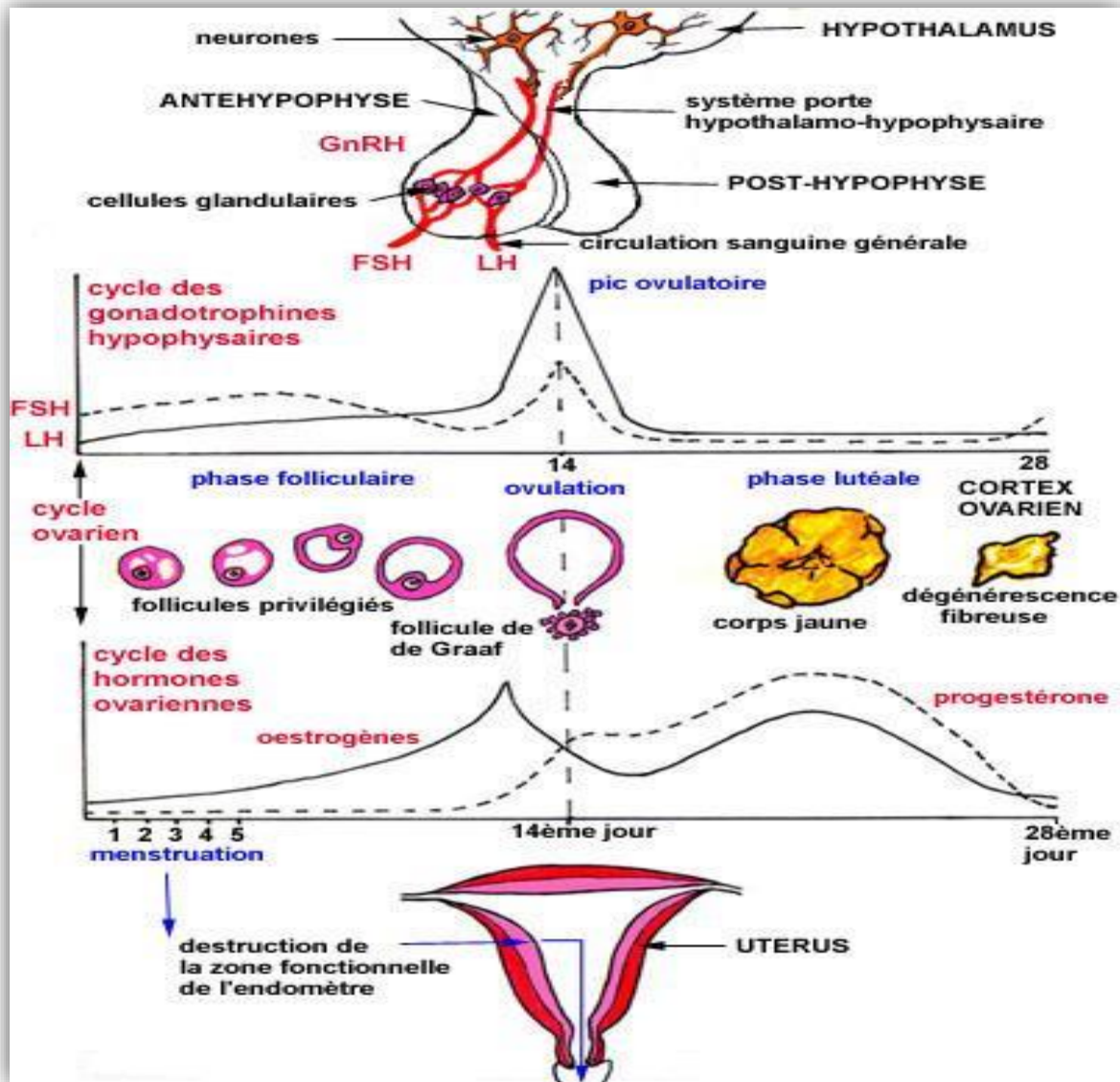


Figure 7 : régulation hormonale du cycle menstruel

(<http://www.cngof.fr/communiqués-de-presse/103-le-cycle-menstruel>)

II.2. La grossesse

Au cours de cette période, les taux d'oestrogènes et de glycogène disponibles au niveau vaginal sont supérieurs à la normale et le système immunitaire est moins performant (Aguin et Sobel, 2015). Ces éléments font de la grossesse, et tout particulièrement le troisième trimestre, une période propice au développement des *Candida* et à la survenue de mycoses vaginales. Selon les études, l'incidence d'une colonisation de la flore vaginale par la levure *Candida* au cours de la grossesse oscille entre 10 et 50%. Il ressort également que 60% à 90% des femmes porteuses du *Candida* seront symptomatiques et que 50% d'entre elles feront deux épisodes au cours de la même grossesse (Xu et Sobel, 2003).

II.3. Les contraceptifs hormonaux

L'utilisation de contraceptifs avec des taux très faibles ou nuls d'éthinylestradiol provoque un état de hypoestrogénie relative, ce qui perturbe la production de glycogène et donc d'acide lactique. Par conséquent, ces femmes sont particulièrement sensibles aux altérations de l'écosystème vaginal, ce qui entraîne une gêne (Güzel *et al.*, 2013).

Les œstrogènes administrés par voie orale, peuvent eux aussi favoriser la croissance et l'adhérence de *Candida* à l'épithélium vaginal, d'autant plus si le contraceptif est fortement dosé (Amouri *et al.*, 2010 ; Anane *et al.*, 2010).

III. Déséquilibre lié à la prise de médicaments

III.1. Les antibiotiques

Les lactobacilles vaginaux sont très sensibles aux antibiotiques, en particulier aux macrolides et aux tétracyclines souvent prescrits dans les infections gynécologiques, mais aussi à la plupart des grandes familles de molécules. Ceci entraîne directement le déséquilibre de l'écosystème vaginal dès la mise en œuvre de la moindre antibiothérapie. Seuls le métronidazole et les quinolones semblent peu actifs sur cette flore de Doderleïn (Bannatyne et Smith, 1998 ; Hillier *et al.*, 2000). Par leur action bactéricide, les antibiotiques administrés par voie locale (vaginale) ou systémique entraînent une diminution, voire une éradication des lactobacilles vaginaux. Cette situation est favorable à la prolifération de micro-organismes opportunistes comme le *Candida*. Le risque de survenue d'une candidose vulvo-vaginale après une antibiothérapie est d'autant plus important que l'antibiothérapie est à large spectre et que la durée du traitement est longue. On estime que le pourcentage des mycoses vaginales qui font suite à une prise d'un antibiotique est autour de 28% à 33% (Pirota et Garland, 2006 ; Sobel, 2007 ; Amouri *et al.*, 2010).

III.2. Les corticoïdes et immunosuppresseurs

Par leurs effets immunosuppresseurs, les corticoïdes diminuent les défenses de l'organisme contre le pathogène. Les autres traitements immunosuppresseurs (chimiothérapie, radiothérapie) sont également considérés comme favorisant l'apparition de mycoses vaginales (Sobel, 2007).

III.3. Les antiseptiques

L'utilisation abusive d'antiseptique entraîne une sélection de germes pathogènes et une modification de la flore vaginale physiologique en une flore anormale mycosique et/ou bactérienne (Delcroix, 1997). Une étude récente réalisée par Neut *et al.* (2015) montre que les ingrédients actifs de ces deux antiseptiques Chlorhexidine et Polyvinylpyrrolidone pourraient avoir un effet destructeur sur les lactobacilles *in vivo*, puisque leurs CMI sont inférieures aux concentrations critiques.

IV. Déséquilibre relié à un comportement de la femme

IV.1. L'hygiène

Une hygiène intime permet le nettoyage de l'excédent de film hydrolipidique de surface, des cellules mortes, de la sueur et des bactéries. Les bénéfices de l'utilisation quotidienne d'un produit d'hygiène intime, mis en évidence par des études cliniques, font partie des conseils à communiquer aux femmes (Graesslin *et al.*, 2005 ; Bohbot, 2007 ; Sobel, 2007). Les produits de douches sont composés principalement d'eau, d'agents acidifiants (vinaigre, acide benzoïque, citrate de sodium, diazolidinyl urée), des antimicrobiens (chlorure de cétalpyridinium, édenté disodique), et / ou tensioactifs (octoxynol-9) (Pavlova et Tao 2000 ; Martino et Vermund, 2002). Une hygiène intime excessive ou inadaptée est toutefois aussi nuisible qu'un défaut d'hygiène. La pratique de multiples toilettes intimes quotidiennes (réalisées par des femmes souhaitant souvent l'obtention d'une quasi-stérilité du vagin), des douches vaginales (ou irrigation vaginale) ou l'utilisation d'antiseptique peuvent ainsi induire l'altération de l'épithélium et de son revêtement, la modification du pH local et le déséquilibre de la flore physiologique. La conséquence est le risque accru d'une colonisation bactérienne ou mycologique (Delcroix, 1997 ; Graesslin *et al.*, 2005). Le défaut d'hygiène de la région anogénitale, associé à la transpiration et à la macération, crée à l'inverse des conditions favorables à la prolifération bactérienne, parfois responsable de pathologies. Par exemple, l'environnement périnéal chaud et humide réunit des conditions favorables au développement des *Candida* (Delcroix, 1997 ; Graesslin *et al.*, 2005).

IV.2. Les tenues vestimentaires

Le port de vêtements serrés, en particulier les pantalons, les collants et le port de sous-vêtements synthétiques, gênent l'aération et augmentent la température locale. En résulte des conditions favorables au développement des *Candida*. Par ailleurs, les vêtements serrés, par frottements répétés, irritent et fragilisent en particulier la muqueuse vulvaire (Graesslin *et al.*, 2005).

IV.3. Les moyens de contraception

De nombreuses recherches ont été effectuées sur une possible influence des différentes méthodes contraceptives sur l'équilibre de la flore vaginale. L'utilisation des dispositifs intra-utérins (DIU) a été largement considérée comme facteur de risque de vaginose bactérienne. De nombreuses études ont affirmé que la mise en place d'un dispositif intra-utérin augmentait significativement la fréquence de vaginose bactérienne, en altérant la flore vaginale (Calzolari *et al.*, 2000 ; Ocak *et al.*, 2007). De plus, les DIU seraient associés à un haut risque d'infections du haut appareil génital, et notamment les maladies inflammatoires pelviennes (Ocak *et al.*, 2007). Les diaphragmes et les dispositifs intra-utérins favoriseraient également le risque de survenue de candidose vulvo-vaginale, grâce à un mécanisme d'adhésion et de production d'un biofilm à la surface du DIU qui permet aux levures de ne plus être soumises aux agressions du système immunitaire (Sobel, 2007 ; Amouri *et al.*, 2010).

Les spermicides, tels que les méthodes contraceptives à base de nonoxynol-9 (N-9), se sont révélés toxiques pour les lactobacilles (Watts *et al.*, 1999). Par conséquent, la perturbation de la flore vaginale a été associée à la mise en place d'infections opportunistes comme la vaginose bactérienne et un risque accru de contracter le VIH de type 1 (Chang *et al.*, 2003). Le nonoxynol-9 est le composé actif dans de nombreuses formules spermicides. C'est un détergent non ionique, qui réduit la tension superficielle de la membrane du spermatozoïde humain, provoquant une perte de motilité, une diminution de sa puissance glycolytique et une altération de la perméabilité. Elle affecte également la teneur en lipides de la membrane du spermatozoïde. Le nonoxynol-9 est généralement utilisé à des concentrations de 5% dans les crèmes. Il est possible que la présence de N-9 puisse affecter l'équilibre écologique du vagin par l'inhibition des lactobacilles protecteurs, en particulier ceux qui produisent l' H_2O_2 (Richardson *et al.*, 1998).

IV.4. Stress chronique

Le stress chronique favorise la production de grandes quantités de stéroïdes, principalement le cortisol, ce qui a un impact négatif sur plusieurs structures systémiques. Le vagin est une de ces structures, c'est-à-dire qu'il est un endroit également atteint par les corticostéroïdes surrénaliens, qui altèrent la croissance des lactobacilles et la production d'acide lactique (Borges et Silva, 2014).

IV.5. Rapports sexuels

Comme on l'a déjà souligné, le pH vaginal des femmes en phase de reproduction varie de 4 à 4,5. Toutefois, le sperme qui renferme des bases azotées a été montré pour agir comme un agent alcalinisant puissant, qui réduit l'acidité vaginale en quelques secondes et maintient le vagin neutralisé (à un pH supérieur à 6-7) pendant plusieurs heures après les rapports sexuels, quand les spermatozoïdes peuvent entrer dans les organes de reproduction. En raison de la neutralisation de l'acidité du vagin, les spermatozoïdes, qui tolèrent mal cette acidité, se protègent et les pathogènes, trouvant les alcalins aptes à la colonisation, peuvent aussi en profiter. Par conséquent, en raison de la présence de sperme dans le vagin, les mécanismes de protection naturels sont neutralisés. Cela peut expliquer que de nombreuses femmes souffrent d'inconfort vaginal après des périodes de relations sexuelles fréquentes en raison de l'altération du microbiote vaginal (O'Hanlon *et al.*, 2010).

V. Déséquilibre lié à un facteur pathologique

V.1. Le diabète

Les patientes diabétiques sont plus sujettes aux infections vulvo-vaginales, en particulier celles dont le diabète est mal équilibré. En effet, la présence de glucose dans les sécrétions vaginales constitue une source nutritive pour les levures et favorise leur adhérence, leur croissance et l'expression de leurs facteurs de virulence. L'hyperglycémie a également un impact sur l'immunité, en inhibant l'action des polynucléaires neutrophiles et, par ce mécanisme, en diminuant leur capacité à phagocyter les agents pathogènes et à éliminer les levures (Patel *et al.*, 2004 ; Amouri *et al.*, 2010 ; Anane *et al.*, 2010). Il a été mis en évidence que le risque de développer une candidose vulvo-vaginale est trois fois plus élevé en cas de diabète de type 1, qu'en cas de diabète de type 2 (De Leon *et al.*, 2002).

V.2. Le VIH

Les femmes séropositives sont plus fréquemment touchées par la candidose vulvo-vaginale. La pathologie infectieuse est également plus persistante mais les symptômes ne sont pas plus sévères ; ceci est d'autant plus vrai que la charge virale est élevée. On sait également que d'autres formes d'immunodépression (neutrophénie, cancer), ainsi qu'une altération de l'état général sont des facteurs pouvant potentialiser le risque de candidose vulvovaginale (Sobel, 2007 ; Amouri *et al.*, 2010 ; Anane *et al.*, 2010).

Quatrième chapitre

*Moyens de régénérescence du
microbiote vaginal*

I. Introduction

Le chapitre III nous a permis de comprendre que le déséquilibre de notre flore est à l'origine de diverses infections génitales. Si les traitements aux antibiotiques actuels des infections génitales sont toujours efficaces, la réduction du nombre de nouvelles molécules mises sur le marché associée au développement des antibiorésistances laissent envisager des complications futures dans les moyens de prise en charge de ces pathologies. L'utilisation de nouvelles stratégies thérapeutiques autant préventives que curatives par les souches probiotiques semble constituer une alternative encourageante en vue de restaurer et maintenir la santé du microbiote vaginal chez les femmes (Aude, 2016).

Aujourd'hui la bactériothérapie peut être considérée sous différentes formes. Ainsi, pour lutter contre les infections vaginales, il est possible d'envisager : • soit l'introduction d'une flore exogène bénéfique agissant comme probiotique, • soit l'ajout de composés glucidiques dits prébiotiques qui sont préférentiellement consommés par la flore saprophyte normale au détriment de la flore pathogène, • soit l'application de mélanges symbiotiques contenant une flore exogène probiotique et un composé glucidique prébiotique qui peuvent agir en synergie (Rousseau, 2004).

II. Définition et rôle des différents traitements utilisés pour rééquilibrer la flore vaginale

L'équilibre de la flore vaginale est assuré à différents niveaux : dans un premier temps, la production d'œstrogènes permet d'obtenir une charge glycogénique suffisante, constituant une source nutritive essentielle pour les lactobacilles qui à leur tour produisent par hydrolyse de l'acide lactique au sein de la cavité vaginale. En cas de dysbiose, la thérapeutique peut s'appuyer sur l'apport hormonal, les lactobacilles avec des probiotiques, et en jouant sur le pH grâce aux prébiotiques. La figure 8 suivante illustre les cibles thérapeutiques visant à rééquilibrer la flore vaginale (Aude, 2016).

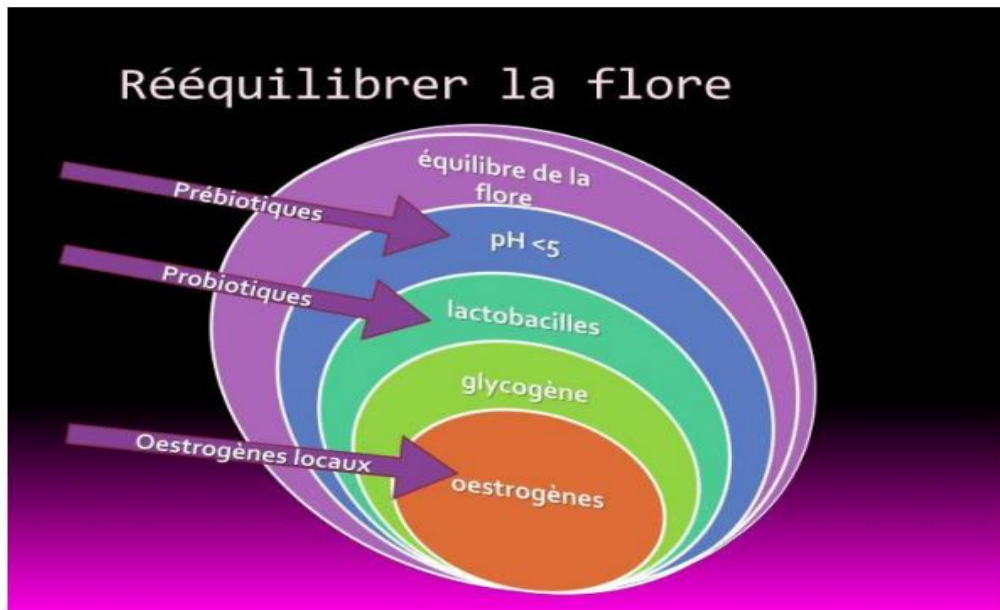


Figure 8 : les différents niveaux d'action pour rééquilibrer la flore vaginale
<http://www.slideserve.com/marlo/infections-uro-genitales-de-la-femme>

II.1. Les probiotiques

Dans le cas des infections vaginales, le but de l'administration d'un traitement probiotique est de restaurer l'équilibre de la flore. En cas de perturbation de la flore vaginale, les probiotiques utilisés sont les lactobacilles. En effet, la cause principale du déséquilibre étant la diminution de ces bactéries protectrices, le rôle des probiotiques est dans un premier temps de remplacer cette flore défaillante, puis dans un second temps, de créer des conditions écologiques favorables à la recolonisation de l'écosystème vaginal par cette flore naturelle (Bohbot, 2007).

II.1.1. Définition

Les probiotiques sont définis par l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) et la FAO (Food and Agriculture Organisation) comme étant des « micro-organismes vivants, qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un bénéfice pour la santé de l'hôte (Reid, 2005 ; Spurbeck et Arvidson, 2011).

II.1.2. Critères de sélection des souches

Pour satisfaire à cette définition, les laboratoires sont tenus de s'assurer que les souches utilisées respectent des critères fonctionnels, technologiques et de sécurité assurant à la fois leur efficacité et leur innocuité. Les caractéristiques requises sont résumées dans le tableau 2.

Tableau 2 : proposition des critères de sélection des probiotiques à application vaginale (MacGroarty, 1993 ; Parent *et al.*, 1996 ; Famularo *et al.*, 2001).

Critères de sécurité	<ul style="list-style-type: none"> - Souche isolée du vagin d'une femme saine - Historique de non pathogénicité - Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques - Pas de dégradation excessive du mucus
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion aux cellules vaginales et persistance dans le vagin - Production de substances antimicrobiennes (notamment de peroxyde d'hydrogène) et antagonisme vis-à-vis des pathogènes (notamment compétition d'adhésion) - Effets sur la santé documentés
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> - Stabilité au cours des procédés de fabrication et dans le produit fini - Conservation des propriétés probiotiques après production - Relargage rapide des souches en dehors de la matrice après introduction dans le vagin

II.1.3. Effets probiotiques et voies d'administrations

Les probiotiques pour la santé vaginale ont été administrés par voie vaginale et orale. Les probiotiques oraux ont d'abord été examinés en 2001, lorsqu'il a été démontré que les bactéries probiotiques passent passivement du rectum au tractus génital féminin (Reid *et al.*, 2001a ; Reid *et al.*, 2001b ; Hummelen *et al.*, 2010). L'administration orale d'une combinaison à deux souches de *L. rhamnosus* GR-1 et *L. reuteri* RC-14 a permis d'augmenter le taux de ces espèces dans les selles et dans le vagin, ce qui confirme la notion de transfert ano-vaginal (Morelli *et al.*, 2004). Une dose quotidienne orale de plus d'un milliard d'unité formant colonie (UFC) ont maintenu un microbiome vaginal dominé par *Lactobacillus* (Ried *et al.*, 2001a). En outre, il a été suggéré que les probiotiques administrés par voie orale peuvent inhiber le transfert anovaginal de la levure et des bactéries pathogènes (Reid *et al.*, 2003). Cependant, le taux de bactéries probiotiques administrées par voie orale est inférieur à celui observé après administration vaginale (Cribby *et al.*, 2008). Il est important de noter que le temps requis pour influencer sur la santé vaginale est plus long avec l'administration par voie orale que par voie vaginale directe et dépend de la viabilité des bactéries après qu'ils passent par le tractus gastro-intestinal (Morelli *et al.*, 2004).

II.2. Les prébiotiques

Les prébiotiques stimulent la croissance des lactobacilles indigènes du corps. Ils ont le potentiel d'optimiser, de maintenir et de restaurer la flore de l'écosystème vaginal (Cocolin *et al.*, 2007). Leur action est beaucoup plus étudiée au niveau intestinal mais elle peut facilement être extrapolée au microbiote vaginal (Aude, 2016).

II.2.1. Définition

Il s'agit d'une « substance non digestible, qui induit un effet physiologique bénéfique à l'hôte en stimulant de façon spécifique la croissance et/ou l'activité d'un nombre limité de populations bactériennes déjà établies dans le milieu » (Rousseau, 2004). Cette définition rapportée à l'écosystème vaginal permet de définir les prébiotiques comme étant des substrats favorisant la multiplication et la croissance des lactobacilles vaginaux à l'origine d'une flore saine.

II.2.2. Les différents types de prébiotiques et leur voie d'administration

D'un point de vue structurel, les prébiotiques sont des oligosaccharides et plus précisément des fructo- oligosaccharides (FOS) ou des galacto-oligosaccharides (GOS) mais aussi parfois des fibres, de l'inuline, des polyols, ou du lactose. Ces molécules possèdent une structure chimiquement proche du glycogène ; on sait également que des oligosaccharides de structure complexe composent le mucus vaginal (Bohbot et Lepargneur, 2012). Les oligosaccharides sont utilisables pour permettre la croissance des lactobacilles sans favoriser celle des microorganismes pathogènes qui sont eux incapables de les métaboliser tels que *C. albicans*, *G. vaginalis* ou *E. coli* (Rousseau *et al.*, 2005). Les glucides non-endogènes spécifiques fournissent une approche thérapeutique analogue pour combattre les infections microbiennes en inhibant l'adhésion des pathogènes aux cellules épithéliales vaginales (Al-Ghazzewi et Tester, 2014), ce qui complète tout rôle « prébiotique ». Les hydrates de carbone riche en mannose sont très efficaces à cet égard (Tester et Al-Ghazzewi, 2016).

Rajan *et al.* (1999) ont signalé que l'adhérence de *E. coli* de type 1 à des glucides sur l'épithélium de la muqueuse vaginale joue un rôle majeur dans la pathogenèse des infections urinaires ascendantes chez la femme. Les glucides riches en mannose (par exemple les glucomannanes hydrolés) sont capables de fournir une activité biologique topique supplémentaire par exemple, accélérer la guérison des plaies (Al-Ghazzewi *et al.*, 2015), en favorisant l'accumulation de fibroblastes et la production de collagène (Shahbuddin *et al.*, 2013).

Cette efficacité combinée des glucomannanes pourrait fournir des avantages sanitaires majeurs au contrôle de l'infection vaginal. Le tableau 3 montre les glucides prébiotiques ou bénéfiques indiqués pour une utilisation en thérapie par voie vaginale.

De plus des structures d'oligosaccharides complexes semblables existent également dans les fluides recouvrant la muqueuse vaginale. Enfin certaines substances considérées comme prébiotiques jouent un rôle d'acidifiant assurant un maintien du pH et une inhibition de la croissance des pathogènes. Ce sont par exemple l'acide lactique ou encore l'acide ascorbique (Bohbot et Lepargneur, 2012). Jusqu'à présent, les traitements des infections vaginales ne sont pas beaucoup concentrés sur la restauration naturelle de l'écosystème vaginal acide, ce qui a permis la prolifération des lactobacilles (Haya *et al.*, 2014).

Tableau 3 : des glucides ou des prébiotiques bénéfiques rapportés pour une utilisation en thérapie vaginale (Al-Ghazzewi et Tester, 2016).

Hydrates de carbone	Rôle bénéfique	Type d'étude	Référence
Gluco-oligosaccharides, Fructo-oligosaccharides	Stimuler la croissance de lactobacilles	<i>In vitro</i>	Rousseau <i>et al.</i> (2005)
Gluco-oligosaccharides, Fructo-oligosaccharides, Galacto-oligosaccharides	Promouvoir la croissance du lactobacilles	<i>In vitro</i>	Bou-Antoun (2008)
Gluco-oligosaccharides	Améliore la récupération de la flore vaginale normale	Essai clinique	Coste <i>et al.</i> (2012)
Les hydrolysats de glucomannane (GMH)	Stimuler la croissance de lactobacilles. Inhibition de l'adhérence des agents pathogènes	Essai clinique <i>In vitro</i>	Tester <i>et al.</i> (2012) Sutherland <i>et al.</i> (2008)
Glycogène	Source de carbone pour lactobacilles– nécessite α -amylase pour la dépolymérisation	La revue Essai clinique	Kumar <i>et al.</i> (2011) Mirmonsef <i>et al.</i> (2014)
Oligosaccharide d'alginate	Agent antibactérien Réduit le pH	Essai clinique	Hou <i>et al.</i> (2014)
Sulfate de dextrine	Restriction de l'adhérence cellulaire (microbicide)	Essai clinique Essai clinique Essai clinique	Low-Beer <i>et al.</i> (2002) Bakobaki <i>et al.</i> (2005) D'Cruz et Uckun (2005)

Concernant les prébiotiques, la voie d'administration majoritaire est la voie vaginale. Cela peut s'expliquer par leur mécanisme d'action. En effet, contrairement aux probiotiques qui influencent directement la composition de la flore en apportant de nouvelles bactéries lactiques exogènes, les prébiotiques agissent eux en stimulant la croissance des microorganismes endogènes présents dans la cavité vaginale. Tous les prébiotiques actuellement commercialisés sont présentés sous forme de gel vaginal ou de comprimés intravaginaux (Barberot, 2012).

II.3. Les symbiotiques

Les prébiotiques et les probiotiques se complètent mutuellement lorsqu'ils sont utilisés pour améliorer la santé. Une combinaison des deux composés est définie comme symbiotique (Gibson et Roberfroid, 1995 ; Fooks et Gibson, 2002 ; Rastall et Maitin, 2002), où les prébiotiques peuvent augmenter la survie des souches probiotiques. Les prébiotiques couramment utilisés sont les glucides à courte chaîne, en particulier l'inuline, les oligosaccharides et les pyrodextrines, qui sont résistants à la digestion, fermentescibles par les microbes intestinaux et favorisent la croissance sélective des bactéries administrées (Figuerola-González *et al.*, 2011). Par exemple, l'oligosaccharide de soja (SOS), le fructo-oligosaccharide (FOS) ou l'inuline augmentent la survie et prolongent la période de rétention de *L. acidophilus* LAFTI L10 (L10), *Bifidobacterium lactis* LAFTI B94 (B94) ou *L. casei* L26 LAFTI (L26) *in vivo* (Su *et al.*, 2007).

Ritchie et Romanuk, (2012) ont rapporté que les symbiotiques ont des effets bénéfiques dans le traitement et la prévention des maladies gastro-intestinales, bien que d'autres ont affirmé que la fonction s'étend au-delà de l'intestin en induisant des effets systémiques sur la peau (Ouwehand *et al.*, 2002 ; Suzuki *et al.*, 2010), au niveau buccal où ils protègent les dents contre les caries dentaires (Maitra *et al.*, 2013) et dans le vagin (Sutherland *et al.*, 2008).

III. Les produits de régénérescence de la flore vaginale disponibles

Parmi les produits disponibles (tableau 4) on retrouve des spécialités à prendre par voie orale ou par voie vaginale.

Tableau 4 : les principales spécialités à base de probiotique (Vidal, 2015)

PRODUIT - LABORATOIRE	Souches de lactobacilles	Voie d'administration	Type	Statut réglementaire
TROPHIGIL - BESINS INTERNATIONAL	<i>L. casei</i>	Voie vaginale	Probiotiques + Estriol + Progestérone	Médicament
HYDRALIN FLORA - BAYER HEALTHCARE	<i>L. plantarum</i>	Voie vaginale	Probiotiques	Dispositif Médical
FLORGYNAL TAMPON PROBIOTIQUE - IPRAD	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. fermentum</i>	Voie vaginale	(Tampon imprégnée) Probiotiques	Dispositif Médical
GYNOPHILUS - BESINS INTERNATIONAL	<i>L. casei</i> <i>L. rhamnosus</i>	Voie vaginale	Probiotiques + Prébiotiques	Dispositif Médical
MEDIGYNE - IPRAD	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. gasseri</i>	Voie vaginale	Probiotiques	Dispositif Médical
BACTIGYN - CCD	<i>L. crispatus</i> , <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i>	Voie vaginale	Probiotiques + Prébiotiques	Dispositif Médical
GELIOFIL - EFFIK	X Acide lactique, glycogène,	Voie vaginale	Prébiotiques	Dispositif Médical
PREVEGYNE - TEVA	X Acide ascorbique	Voie vaginale	Prébiotiques	Dispositif Médical
FEMIBION® FLORE INTIME - MERCK	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. reuteri</i>	Voie orale	Probiotiques	Complément Alimentaire
LACTIBIANE CND - PILEJE	<i>L. helveticus</i>	Voie orale	Probiotiques	Complément Alimentaire
OROGYN - CCD	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. crispatus</i>	Voie orale	Probiotiques	Complément Alimentaire

Partie

Expérimentale

Cinquième chapitre

Matériel et méthodes

L'intégralité de ce travail a été réalisée au laboratoire de recherche de Microbiologie et Biologie Végétale ainsi qu'au niveau du laboratoire de bactériologie de l'EPH Aïn-Tedeles. W. Mostaganem, durant la période 31 Décembre 2013 jusqu'au 30 juin 2016 et une petite partie dans le laboratoire de Microbiologie dans la faculté de médecine vétérinaire à l'université de Mustafa Kamel, Antakya-Turquie dans la durée comprise entre 03 et 28 octobre 2016.

Les objectifs de cette étude s'articulent autour des points suivants :

- Isolement, purification et conservation des lactobacilles d'origine humaines (vaginales).
- Identification des isolats par des tests phénotypiques et génotypiques.
- Tester l'effet de ces bactéries vis-à-vis de quelques germes qui peuvent être responsables des infections génitales.
- Détection de leurs substances antagonistes.
- Tester *in vitro* l'adhérence de ces lactobacilles.
- Etudier certains facteurs affectant leur déséquilibre.

I. Echantillonnage

41 échantillons de prélèvement vaginaux ont été recueillis sous certaines conditions à partir de 41 femmes saines et en âge de reproduction entre 18 et 45 ans (La moyenne d'âge= 29,83)

• Prélèvement

La réalisation du prélèvement conditionne la fiabilité de l'ensemble des résultats de l'analyse. Le prélèvement des échantillons vaginaux a été effectué par une sage-femme de manière aseptique avec des écouvillons stériles, pour être transportés directement au laboratoire de bactériologie à l'EPH Aïn-Tedeles. W. Mostaganem.

II. Isolement et purification

Une fois les échantillons arrivés au laboratoire, les écouvillons ont été placés directement dans des tubes à essai contenant du MRSB et incubés à 37° C en anaérobiose pendant 24 h puis ensemencés sur un milieu MRSA pour être incubés à 37° C pendant 48 h dans des conditions anaérobiques. Les colonies des isolats obtenus ont été purifiées sur gélose MRS.

III. Identification des isolats

L'identification a été réalisée par l'application des techniques classiques de microbiologie, basées sur la recherche d'un certain nombre de caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques et une étude génotypique.

III.1. Etude phénotypique

III.1.1. Etude morphologique

➤ Examen macroscopique

Cet examen est basé sur l'étude des caractères morphologiques des colonies (l'aspect, la forme et la couleur).

➤ Examen microscopique

Cette étude est réalisée par une observation à l'état frais et après une coloration de Gram. Cette coloration différentielle permet de connaître le type de Gram des bactéries ainsi que leur morphologie et leurs modes de regroupements.

III.1.2. Etude biochimique

• Recherche de la catalase

Pour réaliser cette recherche, une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes a été déposée sur une lame en verre. Puis une quantité de crème bactérienne a été mise en contact à l'aide d'une effilure de pipette pasteur avec l'eau oxygénée. La présence d'une catalase se traduit, en quelques secondes, par la formation de bulles d'oxygène.

➤ Conservation des isolats

Les isolats qui ont montré une coloration de Gram positive et une absence de catalase ont été cultivés dans des tubes de gélose MRS inclinés puis conservés à 4°C et à -50°C dans un MRS- glycérol à 30%.

• Recherche de cytochrome oxydase

Plusieurs réactifs sont commercialisés et plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Dans notre pratique, la recherche de l'oxydase est effectuée à l'aide de disque oxydase « Sigma-Aldrich » imprégné de N, N-diméthyl-1,4-phénylènediaminedichlorure.

La présence d'une cytochrome oxydase se traduit, en 20 à 60 secondes, par l'apparition d'une coloration rouge virant rapidement au violet très foncé.

• Recherche de la nitrate réductase

Un bouillon nitraté (bouillon nutritif supplémenté de 1,5% de nitrates de potassium) est ensemencé par la bactérie étudiée et incubé pendant 18 heures à 37°C. L'apparition d'une coloration rose fugace après une addition de 3 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Griess A) et 3 gouttes d'une solution de naphtylamine (Griess B) ou si aucune modification de coloration n'est visible après l'addition de poudre de zinc signifie dans les deux cas la présence de nitrate réductase (François *et al.*, 2011).

III.1.3. Etude physiologique

Cette étude a été effectuée selon les méthodes proposées par Bulut, (2003).

➤ Croissance à 15°C et 45°C

50 µl d'une culture jeune des lactobacilles ont été inoculés dans les tubes à 5 ml de MRSB additionné d'un indicateur pourpre de bromocrésol à 0,05 g/l. Puis, incubé à 15° C et 45° C pendant 7 jours en anaérobiose. Durant ce temps d'incubation la croissance cellulaire dans chacune des températures a été marquée positive après un changement de couleur du pourpre au jaune.

➤ Production de gaz à partir de glucose

Afin de déterminer que les isolats sont homofermentaires ou hétérofermentaires. Des tubes avec des cloches de Durham inversés contenant de MRSB dépourvus des citrates ont été inoculés avec 1% de cultures jeune des lactobacilles à tester pour être incubés à 37° C pendant 5 jours en anaérobiose. L'apparition de gaz dans les cloches de Durham signifie la production de CO₂ à partir du glucose.

➤ Croissance à 4% et 6,5% du NaCl

Des tubes contenant 5 ml (MRSB+ 0,05 g/l de pourpre de bromocrésol) additionnés de 4% et 6,5% de NaCl, ont été inoculés par 1% d'une culture des lactobacilles puis incubés à 37°C pendant 7 jours en anaérobiose. Le virage de la couleur du pourpre au jaune confirme la croissance bactérienne.

➤ Test de fermentation des carbohydrates

Ce test a été effectué dans des tubes contenant 5ml de MRSB modifié (sans glucose et extrait de viande) additionnés de 0,05 g/l de pourpre de bromocrésol comme un indicateur de pH, et additionné de 1% des glucides suivants : L-arabinose, D-cellobiose, D-galactose, D-lactose, D-saccharose, D-xylose, D-sorbitol, D-maltose, D-mannitol, D-melibiose, D-raffinose, L- rhamnose, D-ribose, D-xylose, D-tréhalose, sucrose, D-mannose, D- fructose. 1% d'une culture d'une nuit de chaque isolat a été inoculé dans ces tubes contenant les différents sucres et incubé à 37° C pendant 24 h en anaérobiose. Le changement de couleur de pourpre au jaune indique une croissance (Mirlohi *et al.*, 2008).

Ces tests ont été répétés deux fois et des milieux non inoculés ont été utilisés comme témoin.

III.2. Etude géotypique

L'identification des isolats par biologie moléculaire a été réalisée au niveau de laboratoire de Microbiologie dans la faculté de médecine vétérinaire à l'université de Mustafa Kamel, Antakya-Turquie.

III.2.1. Extraction de L'ADN

Dans cette étude l'extraction des ADN a été effectuée par la méthode de Sambrook et Russel, (2001). Pour ce faire, les isolats ont été activés sur MRSA. Après une nuit d'incubation à 37° C en anaérobiose, une seule colonie pour chaque isolat a été mise en suspension dans 500 µl de solution saline de tampon phosphate stérile (PBS) (pH 7,2) puis vortexé. Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 3000 rpm pendant 10 min, le culot cellulaire a été mis en suspension dans une solution contenant 350 µl de tampon TE [10 mM de chlorure de tris, EDTA 1 mM (pH 8,0)] et 20 µl de lysozyme (20mg/ml) (Sigma, USA) et incubés à 37°C pendant 60 min. Chaque tube a été vortexé une fois toutes les 15 min. Ensuite, 350 µl de SDS (10%) ont été ajoutés avec 10µl de protéinase K (100µg/ml) (Vivantis Technologies, Malaisie) et le mélange a été incubé à 37° C pendant 60 min. Chaque tube a été vortexé une fois toutes les 15 min. 700 µl de phénol : chloroforme : alcool isoamylique (25 : 24 : 1, v/v) ont été ajoutés au mélange pour lier les protéines et d'autres débris cellulaires, suivi d'un vortexage et d'une centrifugation à 10 000 tr / min pendant 10 min. 500µl de surnageant ont été soigneusement prélevés dans un tube eppendorf et incubés pendant une nuit à -20°C avec 50µl d'acétate de sodium 3 M et 500 µl d'éthanol absolu froid. Après une incubation d'une nuit à -20° C, le mélange a été centrifugé à 13 000 tr / min pendant 10 min et le surnageant a été éliminé. Le culot a été lavé d'abord avec de l'éthanol à 90%, puis à 70% et séché à 37°C pendant 60 min puis dissous dans 100 µl de tampon TE et conservé à -20°C jusqu'à analyse.

III.2.2. Amplification par PCR

III.2.2.1. PCR spécifique pour le genre

Chaque isolat a été ensuite identifié au niveau du genre par amplification avec l'amorce spécifique de genre LbLMA-rev (5 'CTC AAA ACTA AAA CAA AGT TTC 3') et une amorce universelle R16-1 (5 'CTT GTA CAC ACC GCC CGT TCA 3'). La procédure de PCR a été réalisée dans un volume réactionnel de 25µl contenant 2µl de la solution d'ADN extrait, 2,5µl du tampon (10X, Vivantis, Malaisie), 2,5µl de MgCl₂, 0,5µl de chacun des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs), 0,2µl de chacun des amorces sens et antisens, 0,2µl de l'ADN Taq polymérase (Vivantis, Malaisie) et 16,9µl de H₂O (Eau traitée au pyrocarbonate de diéthyle).

Les mélanges réactionnels ont été mis dans un thermocycleur (BIO-RAD /CFX96 Real-time system) et chauffés pour une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, suivis de 30 cycles de (dénaturation à 94°C pendant 30 s, une hybridation à 55°C pendant 30 s et une élongation initiale à 72°C pendant 30 s) suivi par élongation finale 72°C pendant 7 min (Dubernet et Desmasures, 2002).

III.2.2.2. Multiplex PCR spécifique pour le groupe

Après confirmation du genre, on a utilisé une multiplex PCR-G pour déterminer le groupe auquel l'isolat appartient. Ceci a été fait à l'aide d'un mélange contenant des amorces sens équimolaires, à savoir Ldel-7 (5'ACAGATGGATGGAGAGCAGA3'), LU1' (5'ATTGTAGAGCGACCGAGAAG3 '), LU-3' (5'AAACCGAGAACACCGCGTT 3'), LU-5 '(5'CTAGCGGGTGCACCTTTGTT3') et une amorce antisens commune Lac-2 (5'CCTCTTCGCTCGCCGCTACT 3 ') selon Song *et al.* (2000).

Le processus de la PCR a été réalisé dans un volume réactionnel de 25µl contenant 2 µl de la solution d'ADN extrait, 2,5µl du tampon, 2,5µl de MgCl₂, 0,5µl de dNTPs, 0,2 µl de chacun des amorces sens et des amorces antisens, et 0,2µl de l'ADN Taq polymérase et 16,3 µl de H₂O (Eau traitée au pyrocarbonate de diéthyle). Le programme de PCR spécifique au groupe a utilisé une dénaturation initiale à 95° C pendant 1 min suivie de 35 cycles de (dénaturation à 95° C pendant 20 s, hybridation à 55° C pendant 2 min, élongation à 72°C pendant 30 s) suivi d'une extension finale à 72 ° C pendant 7 min.

III.2.2.3. Multiplex PCR spécifique pour l'espèce

Après la détection du groupe, une multiplex PCR spécifique à l'espèces a été employée selon Song *et al.* (2000) en utilisant les amorces montrées dans le tableau 5.

La procédure de PCR a été effectuée dans un volume réactionnel de 25 µl contenant 2 µl d'ADN extrait, 2,5 µl du tampon, 2,5µl de MgCl₂, 0,5µl de dNTPs, 0,2µl de chacun des amorces et 0,2µl de la Taq polymérase et 15,7µl de H₂O (Eau traitée au pyrocarbonate de diéthyle). Le programme a été réalisé par une dénaturation initiale à 95°C pendant 3 minutes suivi de 35 cycles de (dénaturation à 95° C pendant 20 s, une hybridation à 60°C pendant 60 s et une élongation à 72°C pendant 60 s) suivi d'une extension finale à 72° C pendant 7 min.

Tableau 5 : les espèces identifiées par multiplex PCR

Programme	Amorce (séquence 5'-3').	Espèces	Amplicon
PCR-IV	Lsal-1 AATCGCTAAACTCATAACCT	<i>L. salivarius</i>	411 pb
	Lsal-2 CACTCTCTTTGGCTAATCTT		
	Lreu-1 CAGACAATCTTTGATTGTTTAG	<i>L. reuteri</i>	303 pb
	Lreu-4 GCTTGTTGGTTTGGGCTCTTC		
	Lpla-3 ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	<i>L. plantarum</i>	248 pb
	Lpla-2 CCTGAACTGAGAGAATTTGA		
	Lfer-3 ACTAACTTGACTGATCTACGA	<i>L. fermentum</i>	192 pb
	Lfer-4 TTCAGTCTCAAGTAATCATC		

III.2.3. Electrophorèse sur gel d'agarose et imagerie

Après la procédure d'amplification, une électrophorèse sur gel d'agarose à 2% dans un tampon TAE 0,5× (40 mM Tris acétate, 1 mM EDTA, pH 8,2) a été effectuée. 20µl de (safe red dye) ont été ajoutés au gel d'agarose après dissolution complète dans un micro-onde. Après refroidissement, le gel est mis dans la cuve et les peignes ont été placés. Les ADN amplifiés ont été chargés par mélange avec 10µl de colorant de charge de gel 6×. Ensuite introduits dans les puits. Un marqueur (Vivantis, plus 100 pb) a été utilisé.

Les produits de PCR chargés ont été soumis à un courant électrique de 180 V pendant 60 min. Les résultats ont été examinés sous lumière UV et des photos ont été prises.

❖ L'origine des agents infectieux

Quatre germes ont été isolés à partir des femmes présentant différentes infections des voies génitales, collectés auprès de laboratoire de bactériologie de l'EPH Aïn-Tedeles, W. Mostaganem. Ces isolats ont été identifiés phénotypiquement et rapprochés aux espèces suivantes : *C. albicans*, *E.coli 1*, *S. fonticola* et *Staphylococcus. sp* (Bechelaghem, 2013).

IV. Détermination de l'activité antimicrobienne des lactobacilles

Pour tester l'effet des lactobacilles isolés sur les trois bactéries indicatrices, la méthode de double gélose (spot- on-lawn method) décrite par Jacobsen *et al.* (1999), a été utilisée.

3µl de chaque lactobacille sous forme de spot, ont été déposés en surface d'une gélose MRS modifié contenant 0,2% de glucose et 1,2% d'agar et mises en incubation en anaérobiose pendant 24 h à 37° C. 100 µl d'une culture d'une nuit des bactéries indicatrices ont été mélangés avec 7 ml de MH-semi solide (0,7% agar), et versé dans la boîte de Pétri contenant la culture développée.

L'effet des lactobacilles contre *C. albicans* a été effectué suivant la méthode de Fleming *et al.* (1985). 3µl d'une culture jeune de chaque lactobacille ont été déposés de la même façon que la première mais dans une gélose MRS normale et incubée dans des conditions anaérobiques pendant 48 h à 37°C. Une couche de 5 ml de gélose SD avec 0,75% d'agar contenant 1 ml d'une culture de *C. albicans* a été versé sur la culture de lactobacille.

L'activité des lactobacilles contre les bactéries et la levure indicatrices a été déterminée après une incubation en aérobiose à 37 °C pendant 24 h, par la mesure des zones d'inhibition. Chaque test a été effectué trois fois.

V. Détection de la production de l'acide lactique

Le pouvoir acidifiant des isolats des lactobacilles étudiés a été déterminé dans 10 ml de MRSBensemencé par 1% d'inoculum de chaque lactobacille, puis le pH des échantillons a été mesuré après une incubation en anaérobiose pendant 18 h à 37 ° C. Les échantillons ont été titrés avec du NaOH 0,1 N à l'aide de phénolphtaléine et l'acidité titrable est exprimée en pourcentage de l'acide lactique (Demirci et ve Gündüz, 1994). Ce test a été répété trois fois.

VI. Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène

La production de H₂O₂ a été détectée par la méthode semi-quantitative, décrite par Rosenstein *et al.* (1997). La suspension des lactobacilles à tester a été étalée sur gélose MRS contenant 0,25 mg/ml de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (Sigma, Aldrich) (soluble dans 6mg/ml de DMSO) et 0,1 mg / ml de horseradish-peroxydase (Sigma, Aldrich) (soluble dans une solution de tampon phosphate (KH₂PO₄ à 0,1 M, pH 6), puis incubée en anaérobiose pendant 5 jours à 37°C. Enfin, les géloses ont été exposées à l'air ambiant et des colonies tournant bleues dans les 20 min qui suivent ont été considérées comme productrices d'H₂O₂.

VII. Détection de la production de bactériocines

Les lactobacilles ont été cultivés en MRSB et en MRSBT (annexe 1) afin d'éliminer l'effet due à la production de l'acide lactique. L'incubation a été réalisée en anaérobiose à 37°C pendant 18 h. Après incubation, les cultures ont été centrifugées à 5000 tr/min pendant 15 min et les SNT et ST obtenus ont été testés contre les germes indicateurs (bactéries et levure).

Après une préculture de la bactérie indicatrice dans le milieu BN à 37°C pendant 18 h, la DO de cette suspension bactérienne à 625nm = (0,08-0,1) qui correspond à une concentration de 10^8 UFC/ml, a été mesurée. Ensuite, une boîte coulée de GN a étéensemencée par étalement puis laisser sécher afin de réaliser des puits. 100 µl de chacun des surnagants d'un lactobacille préparé précédemment sont mis dans un puit et préincubés à 4° C pendant 2 h pour permettre la diffusion de la substance à chercher (Aslim et Kilic, 2006).

La levure *C. albicans* a été inoculée dans un bouillon YEPD et incubée à 37° C pendant 24 h. La concentration de cet inoculum de $1-5 \times 10^6$ UFC/ml a été ajustée à l'aide d'un spectrophotomètre (530 nm) à une turbidité de 0,5 Mc Farland correspondant à une DO comprise entre 0, 12 et 0, 15 (Lee et Chee, 2010). 10 µl ont été pris à partir de cette suspension et mélangés avec 5 ml de SD semi-solide pour être coulé dans une boîte de MRSA préalablementensemencée en spots de 5µl de chaque ST et SNT. La zone d'inhibition a été évaluée après incubation pendant une nuit (Hoover et Harlander, 1993). Pour éviter l'effet supposé due à l'H₂O₂, 1 mg/ml de catalase a été ajouté aux STs.

100 µl de chaque enzyme [pepsine, trypsine et α-chymotrypsine (annexe 2)] ont été ajoutés ensemble dans un tube contenant 1 ml du ST afin de détecter la production d'une substance de nature protéique (bactériocine ou bacteriocin-like) (Martin *et al.*, 2009). Après 24h d'incubation à 37°C en aérobie, les boîtes ont été examinées en vue de détecter les zones d'inhibition autour des puits ou des spots. Tous les essais ont été répétés deux fois.

VIII. Evaluation des propriétés d'adhérence des lactobacilles

L'évaluation de l'adhérence des isolats est une étape indispensable. Deux méthodes différentes ont été utilisées durant cette étude.

VIII. 1. Test d'adhérence sur tube en verre

La méthode d'adhérence sur tube en verre a été utilisée pour évaluer l'adhésion des isolats de lactobacilles sur des supports durs (Hamada et Torii, 1978). Dans un tube en verre contenant 10 ml de MRS additionné de 1% de saccharose (p/v), 500 µl d'une culture de lactobacille à tester (DO 650 nm = 0,1) ont été ajoutés. La culture est incubée à 37° C avec une inclinaison de 30°.

La formation du biofilm est évaluée après 48 h, selon une échelle établie par Murchison *et al.* (1981) ; les valeurs de cette échelle s'étendent de 0 (aucune adhérence) à 4 (fortement adhérent). Ce test a été répété deux fois.

VIII.2. Test d'adhérence sur microplaque

Pour faire ce test 200 µl de BHIB inoculé par chaque isolat ont été mises dans chaque puit de microplaque en polystyrène et incubées pendant 24 h. Après incubation 50 µl de cristal violet à 1% ont été ajoutés à chaque puit, laissés reposer pendant 10 min à température ambiante puis rincer abondamment à l'eau distillée. Après addition de 200 µl d'éthanol à 95% et laissées agir pendant 10 min, l'absorbance à 620 nm a été déterminée par un spectrophotomètre lecteur de microplaques (Biotek) (O'Toole et Kolter, 1998).

IX. Effet de trois détergents sur les lactobacilles sélectionnés

Dans cette étude, trois antiseptiques de douches vaginales (composition résumée dans le tableau 6) ont été utilisés après mesure de leurs pHs. Neuf isolats antagonistes de lactobacilles montrant un large spectre d'activité ont été testés. Les CMI des solutions de douches vaginales contre ces lactobacilles ont été déterminées dans le MRSB. Une série de doubles dilutions (50 à 0,09%) de chaque solution estensemencée par 10^6 UFC/ml de chaque lactobacille et incubées à 37° C pendant 24 h dans des conditions anaérobiques. La CMI a été déterminée par la plus faible concentration de la solution de douche diluée qui a inhibé la croissance bactérienne (Juliano *et al.*, 1992). Ce test a été répété deux fois.

Tableau 6: compositions des détergents testés

Produits	Constituants	pH
A	Chlorure de benzalkonium, digluconate de chlorhexidine, excipients : agents moussants.	5,5
B	Oxyquinol, Acide tartrique, Acide salicylique, Lauryl sulfate de sodium, Propionate de sodium.	2,7
C	Dynaphytols bardane 1,2%, cocoamidopropylbétaine, l'oxyde de stéaramine, l'EDTA tétrasodique, le chlorure de sodium, l'hydroxyde de sodium, glycérides capriques, le cocamide diéthanolamine, eau, parfum.	8,0

X. Effet de quelques antibiotiques sur les lactobacilles sélectionnés

La sensibilité de neuf isolats de lactobacilles à 8 antibiotiques (utilisés souvent dans le traitement des infections uro-génitales) a été déterminée en utilisant la méthode de diffusion sur milieu MRS (Ocaña *et al.*, 2006). Ce test a été effectué deux fois.

Les antibiotiques sous forme de disques utilisés sont : Vancomycine (VA) 30 µg, Pénicilline G (P) 10 U (inhibiteurs de la synthèse de la paroi cellulaire), Erythromycine (E) 15 µg, Chloramphénicol (C) 30µg, kanamycine (K) 30µg, Tétracycline (TE) 30 µg, Clindamycine (CD) 2µg (Synthèse des protéines), Métronidazole (Met) 5µg (synthèse des acides nucléiques). Une suspension de lactobacille équivalente à 0,5 McFarland, a été ensemencée dans des boîtes contenant un milieu MRS par un écouvillon stérile puis laissées séchées avant de déposer les disques d'ATB. L'incubation a été faite à 37° C pendant 48 h en anaérobiose. La lecture des résultats a été faite par la mesure des zones d'inhibition des lactobacilles testés.

Sixième chapitre

Résultats et discussion

I. Isolement des lactobacilles vaginaux

L'isolement réalisé dans le milieu MRSA à partir de 41 échantillons vaginaux a abouti à 37 isolats qui semblent être des lactobacilles.

II. Identification des isolats

II.1. Etude morphologique

L'observation macroscopique a montré que toutes les colonies des isolats sur milieu MRSA, sont de petite taille (figure 9) et de couleur blanchâtre à beige avec un aspect qui se diffère d'une forme à une autre (Dasari *et al.*, 2014).

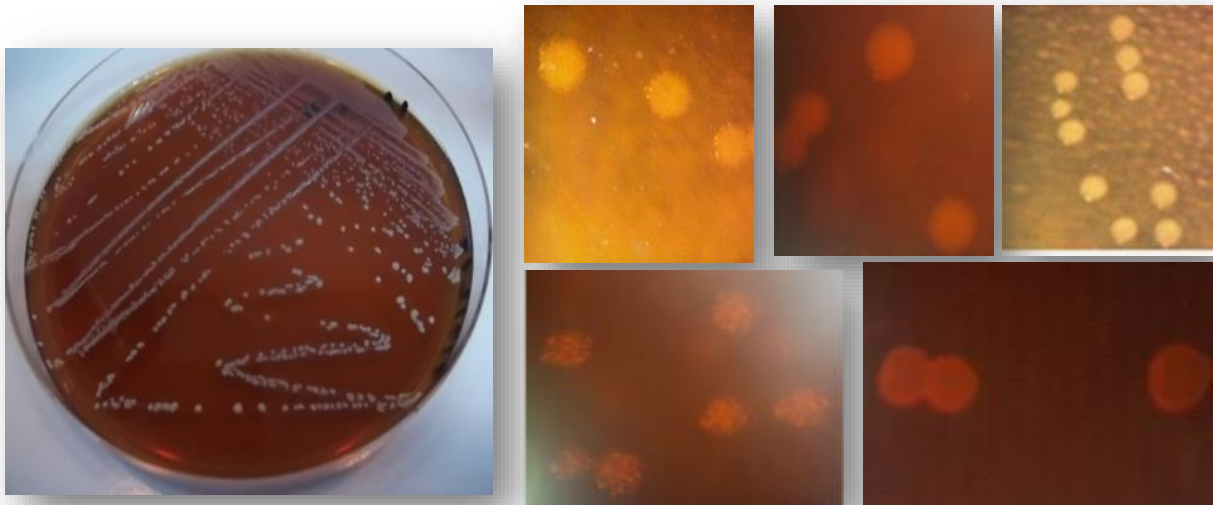


Figure 9 : l'aspect macroscopique des différentes colonies des lactobacilles sur milieu MRSA

➤ Coloration de Gram

L'observation microscopique des cellules après une coloration de Gram, réalisée à partir des cultures purifiées, a montré que tous les isolats sont soit des bacilles ou des coccobacilles à coloration de Gram positive (figure 10) (Dasari *et al.*, 2014).

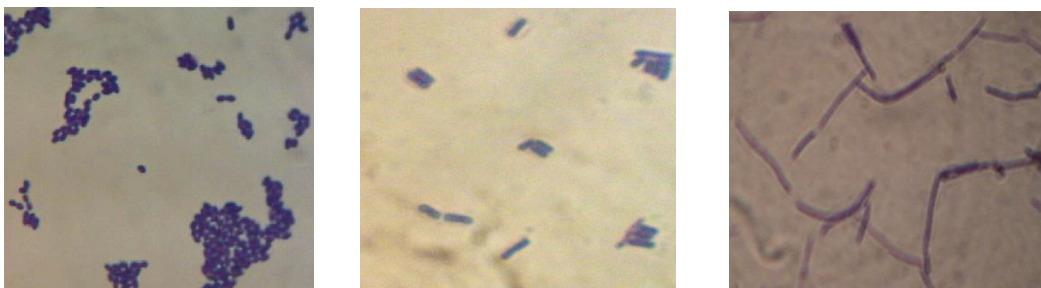


Figure 10 : observation de différentes formes des cellules de *Lactobacillus* sous microscope. Grossissement : 100×

II.2. Etude biochimique et physiologique

Le tableau 7 montre les résultats des tests biochimiques et physiologiques des lactobacilles isolés, qui sont tous catalase, oxydase et nitrate réductase négative (Paul *et al.*, 2009).

Tableau 7 : tests d'identification phénotypique des lactobacilles

	L1	L3	L4	L5	L6	L7	L10	L12	L13	L14b	L14t	L15	L16	L17	L18	L19p	L19g	L20	L21	L22	L23-1	L23-2	L24	
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxydase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reductase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mobilité	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à 20°C	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
Croissance à 45°C	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
Production de gaz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4% NaCl	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
6,5% NaCl	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
Arabinose	+	-	+	+	f	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	+	±	±	+	+	+	±	
Galactose	+	+	+	+	+	+	+	f	+	+	f	f	+	+	+	f	+	f	f	f	+	f	f	
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	+	f	f	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mellibiose	+	±	+	+	+	+	+	+	f	+	±	+	+	+	+	+	f	f	f	f	+	f	f	
Raffinose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	f	-	-	-	-	f	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	f	f	f	f	f	f	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Xylose	+	+	+	+	f	f	±	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tréhalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Sucrose	+	f	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	f	+	+	+	f	f	f	+	+	+	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f	f
Fructose	+	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Abréviations : + : réaction positive ; - : réaction négative ; f : faible ; nd: non-déterminer.

D'après le tableau 7 les résultats de la fermentation des 15 sucres utilisés nous ont permis de classer les isolats en 6 groupes : (**G1** : L1, L4, L10, L14b, L16, L17, L18 ; **G2** : L3 ; **G3** : L5 ; **G4** : L6, L7, L12, L13 ; **G5** : L14t, L15, L19p, L19g, L23-1 ; **G6** : L20, L21, L22, L23-2, L24).

II.3. Etude géotypique

II.3.1. PCR spécifique pour le genre

L'ADN génomique provenant de 37 isolats de lactobacilles a été amplifié en utilisant l'amorce LbLMA1-rev et R16-1. Par conséquent, les résultats du produit de PCR obtenu indiquent que tous les isolats vaginaux testés ont donné une bande correspond à l'amplicon d'une longueur de 200 pb (figure 11 et 12) ce qui confirme que tous les isolats appartiennent au genre *Lactobacillus* (Garg *et al.*, 2009).

Nakagawa *et al.* (1994) ont rapporté que l'amorce 21-mer a été conçue et appelée LbLMA1-rev. C'était la seule séquence identifiée spécifique aux lactobacilles. Ils ont ainsi choisi comme deuxième amorce, une séquence universelle, R16-1, de la région terminale flanquante du gène ARNr 16S qui est conservé parmi diverses bactéries, y compris les lactobacilles.

Dans des études réalisées par Dubernet et Desmasures (2002), la spécificité des amorces a été évaluée. Leurs résultats ont montré que, lorsque l'ADN a été extrait à partir d'autres souches, n'a pas généré d'amplicon, mais lorsque l'ADN des espèces de *Lactobacillus* est utilisé comme modèle, un produit de PCR ~ 250 pb (englobe l'ADNr de la région d'espacement 16S-23S avec un léger polymorphisme) a été obtenu pour toutes les espèces testées. Par conséquent, une PCR basée sur LbLMA1-rev / R16-1 pourrait être un outil utile pour l'identification des membres du genre *Lactobacillus*.

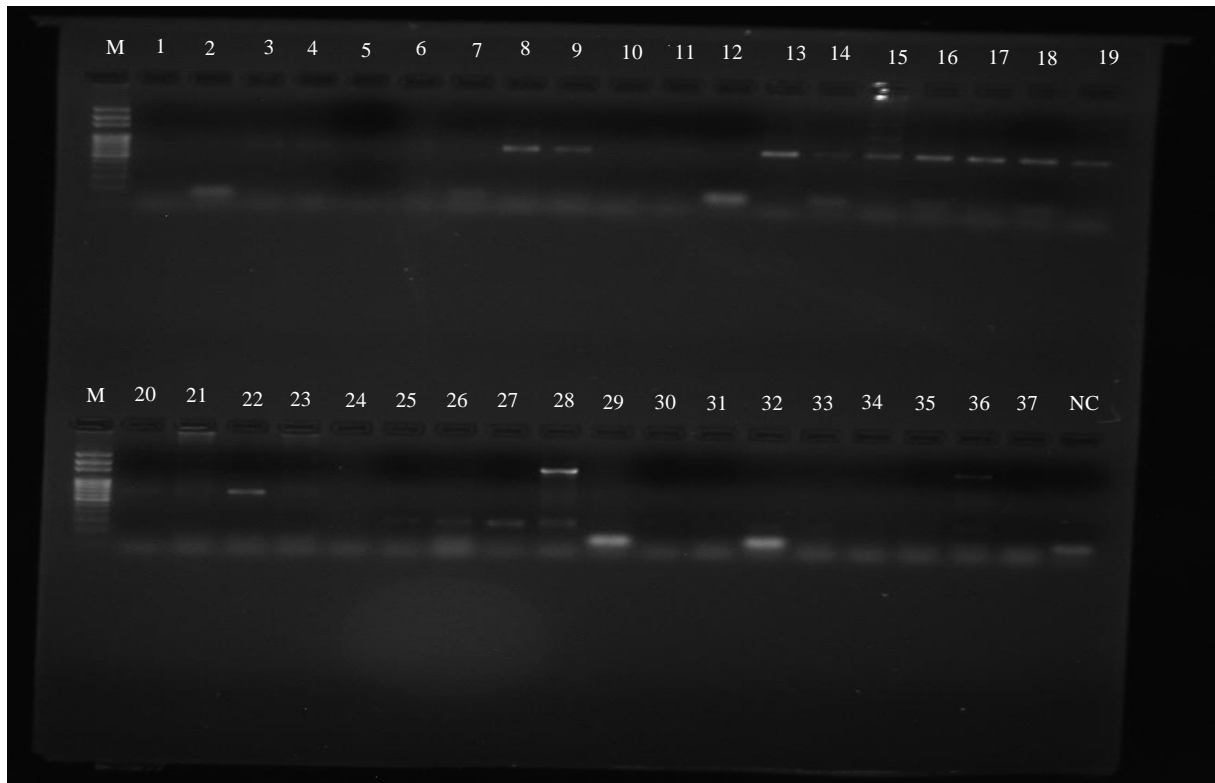


Figure 11 : produits de PCR spécifiques au genre représentatif de 37 isolats sur gel d'agarose 2% (voir tableau 8). Tous les isolats ont donné 200 pb d'amplicon. M : marqueur d'ADN de 100 pb. NC : contrôle négatif sans ADN.

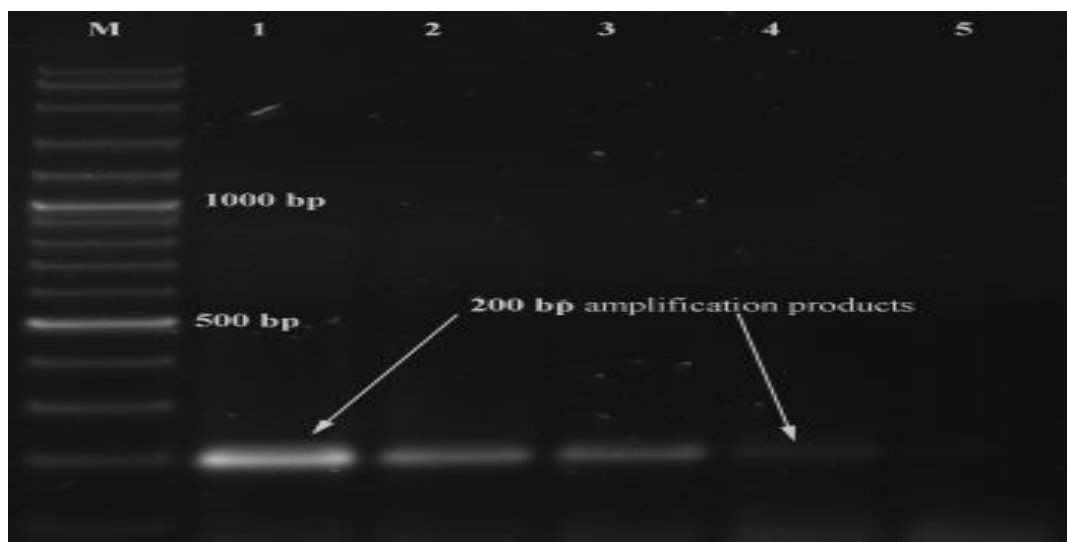


Figure 12 : produits de PCR spécifiques au genre représentatif de 5 isolats sur gel d'agarose à 2%. Tous les isolats ont donné 200 pb d'amplicon. M: marqueur d'ADN de 100 pb.

II.3.2. Multiplex PCR spécifique pour le groupe

Il est très difficile de distinguer plusieurs espèces par un seul type de multiplex PCR. Donc, nous avons suivi un système pour identifier les lactobacilles par deux étapes, comprenant la première multiplex PCR pour le regroupement des lactobacilles, suivie d'un ou plusieurs tests pour chaque groupe pour identifier l'espèce. Pour la PCR spécifique au groupe, un mélange de quatre amorces sens et une amorce antisens ont été utilisées pour différencier les lactobacilles en groupes I, II, III et IV. Notre résultat montre que 100% des isolats appartenaient au groupe IV avec un amplicon de 350 pb (figure 13).

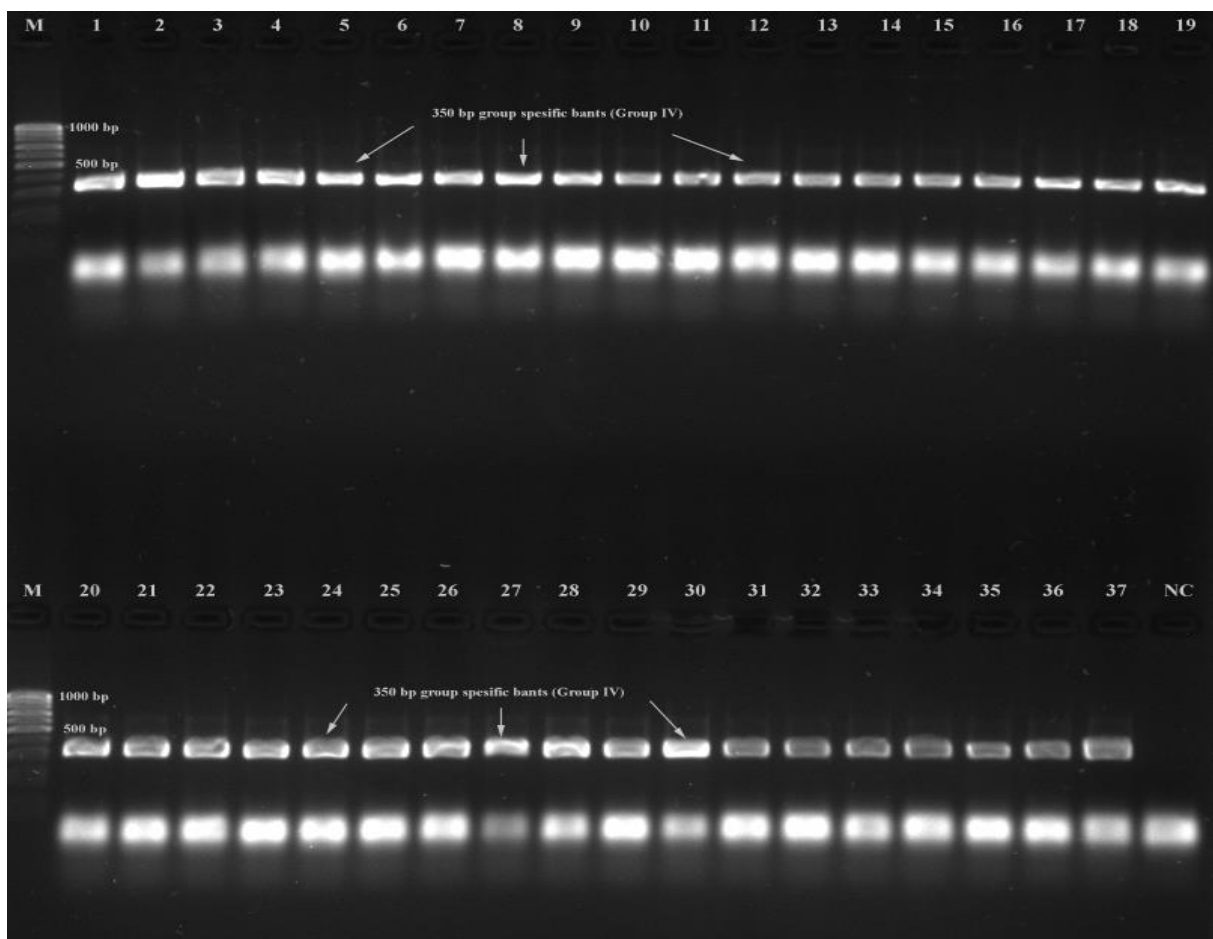


Figure 13 : électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR de 37 isolats (voir tableau 8) par multiplex PCR-G pour le regroupement des lactobacilles. M: marqueur d'ADN de 100 pb, NC: contrôle négatif sans ADN.

Plusieurs travaux ont identifié les lactobacilles par la multiplex PCR (Nakagawa *et al.*, 1994 ; Schleifer et Ludwig, 1995 ; Berthier et Ehrlich, 1998 ; Ward et Timmins, 1999). La multiplex PCR est une méthode de PCR dans laquelle plus d'un locus est simultanément amplifié dans la même réaction (Chamberlain *et al.*, 1988).

Dans l'étude réalisée par Garg *et al.* (2009), 80 isolats de lactobacilles vaginaux ont été identifiés par une multiplex PCR spécifique au groupe par les mêmes amorces de la présente étude. Il a été constaté que 80% des isolats appartenaient au groupe IV, le groupe II était présent à 13,75% et le groupe III à 6,25% des femmes. Aucun isolat n'appartenait au groupe I.

II.3.3. Multiplex PCR spécifique pour l'espèce

Dans l'identification des espèces, 26 isolats (70,27%) ont été rapprochés à *L. reuteri* (303pb) et 11 (29,73%) à *L. salivarius* (411pb) (tableau 8 et figure 14). Ces 2 espèces de *Lactobacillus* appartiennent au groupe IV (figure 15).

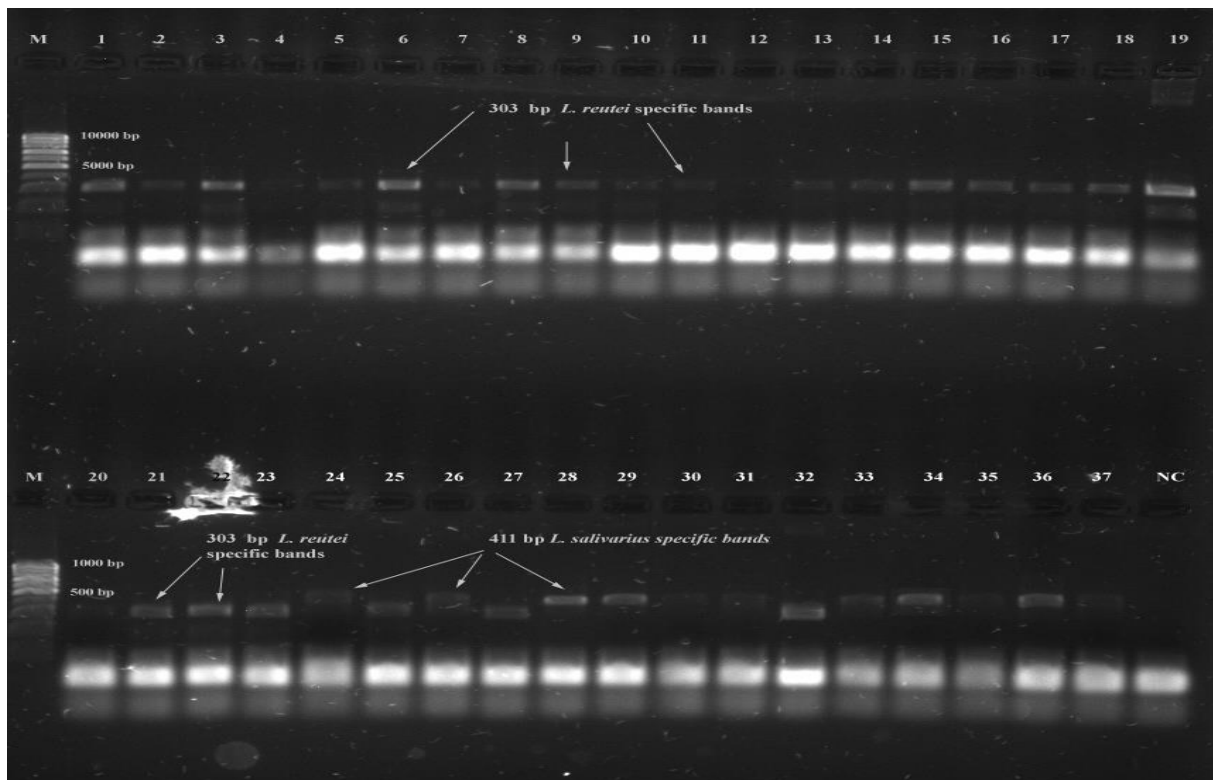
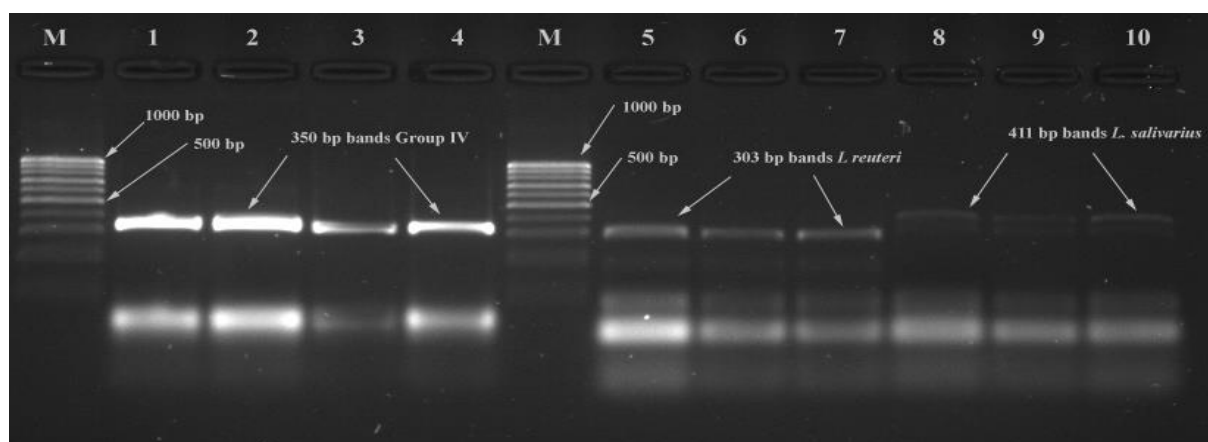


Figure 14 : électrophorèse sur gel d'agarose des produits de PCR de 37 isolats (voir tableau 8) par multiplex PCR spécifique à l'espèce. M: marqueur d'ADN de 100 pb.

Tableau 8 : les deux espèces des *Lactobacillus* vaginaux trouvées (n = 37)

Isolats	Espèces	Isolats	Espèces
1 (L1)	<i>L. reuteri</i>	20 (L22)	<i>L. reuteri</i>
2 (L3)	<i>L. reuteri</i>	21 (L23-1)	<i>L. reuteri</i>
3 (L4)	<i>L. reuteri</i>	22 (L23-2)	<i>L. reuteri</i>
4 (L5)	<i>L. reuteri</i>	23 (L24)	<i>L. reuteri</i>
5 (L6)	<i>L. reuteri</i>	24 (L25)	<i>L. salivarius</i>
6 (L7)	<i>L. reuteri</i>	25 (L27)	<i>L. reuteri</i>
7 (L10)	<i>L. reuteri</i>	26 (L28)	<i>L. salivarius</i>
8 (L12)	<i>L. reuteri</i>	27 (L30)	<i>L. reuteri</i>
9 (L13)	<i>L. reuteri</i>	28 (L31)	<i>L. salivarius</i>
10 (L14t)	<i>L. reuteri</i>	29 (L32)	<i>L. salivarius</i>
11 (L14b)	<i>L. reuteri</i>	30 (L33)	<i>L. salivarius</i>
12 (L15)	<i>L. reuteri</i>	31 (L34)	<i>L. salivarius</i>
13 (L16)	<i>L. reuteri</i>	32 (L35)	<i>L. reuteri</i>
14 (L17)	<i>L. reuteri</i>	33 (L36)	<i>L. salivarius</i>
15 (L18)	<i>L. reuteri</i>	34 (L38)	<i>L. salivarius</i>
16 (L19p)	<i>L. reuteri</i>	35 (L39)	<i>L. salivarius</i>
17 (L19g)	<i>L. reuteri</i>	36 (L40)	<i>L. salivarius</i>
18 (L20)	<i>L. reuteri</i>	37 (L41)	<i>L. salivarius</i>
19 (L21)	<i>L. reuteri</i>	38	NC (Negative Control)

**Figure 15** : produit de multiplex PCR-G et multiplex PCR spécifique à l'espèce pour quelques isolats choisis au hasard. M : marqueur d'ADN de 100pb.

Les espèces trouvées dans notre étude (*L. reuteri* et *L. salivarius*) figurent parmi les espèces considérées comme flore vaginale. Ceci a été confirmé par Garg *et al.* (2009), qui ont indiqué que les espèces de *Lactobacillus* vaginaux des femmes indiennes examinées à l'aide des mêmes amorces que nous avons utilisées étaient *L. reuteri* (32,5%), *L. fermentum* (25%) et *L. salivarius* (16,25%). La recherche dans les différentes régions du monde montre que *L. crispatus*, *L. gasseri* et *L. jensenii* sont des espèces de *Lactobacillus* vaginaux cultivable les plus communs (Chaban *et al.*, 2014 ; Mendes-Soares *et al.*, 2014 ; Van de Wijkert *et al.*, 2014). Beaucoup d'anciennes études ont montré que la flore vaginale des femmes en bonne santé était dominée par *L. acidophilus* et *L. fermentum*, suivies par *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. casei* et d'autres espèces (Lachlak *et al.*, 1996).

Il est important de noter qu'il existe également des différences significatives dans l'abondance des lactobacilles communs chez les femmes appartenant à différents groupes raciaux. Par exemple, la quantité de *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. iners* chez les femmes chinoises en bonne santé était respectivement de 91%, 67%, 43% et 75% (Yan *et al.*, 2009), Mais l'abondance de ces lactobacilles chez les femmes iraniennes était respectivement de 66,7%, 29,6%, 29,6% et 55% pour les mêmes espèces.

Cette étude montre qu'il existe des similitudes et des différences entre la composition des lactobacilles vaginaux détectés dans une région de notre pays et ceux d'environnements distinctement différents.

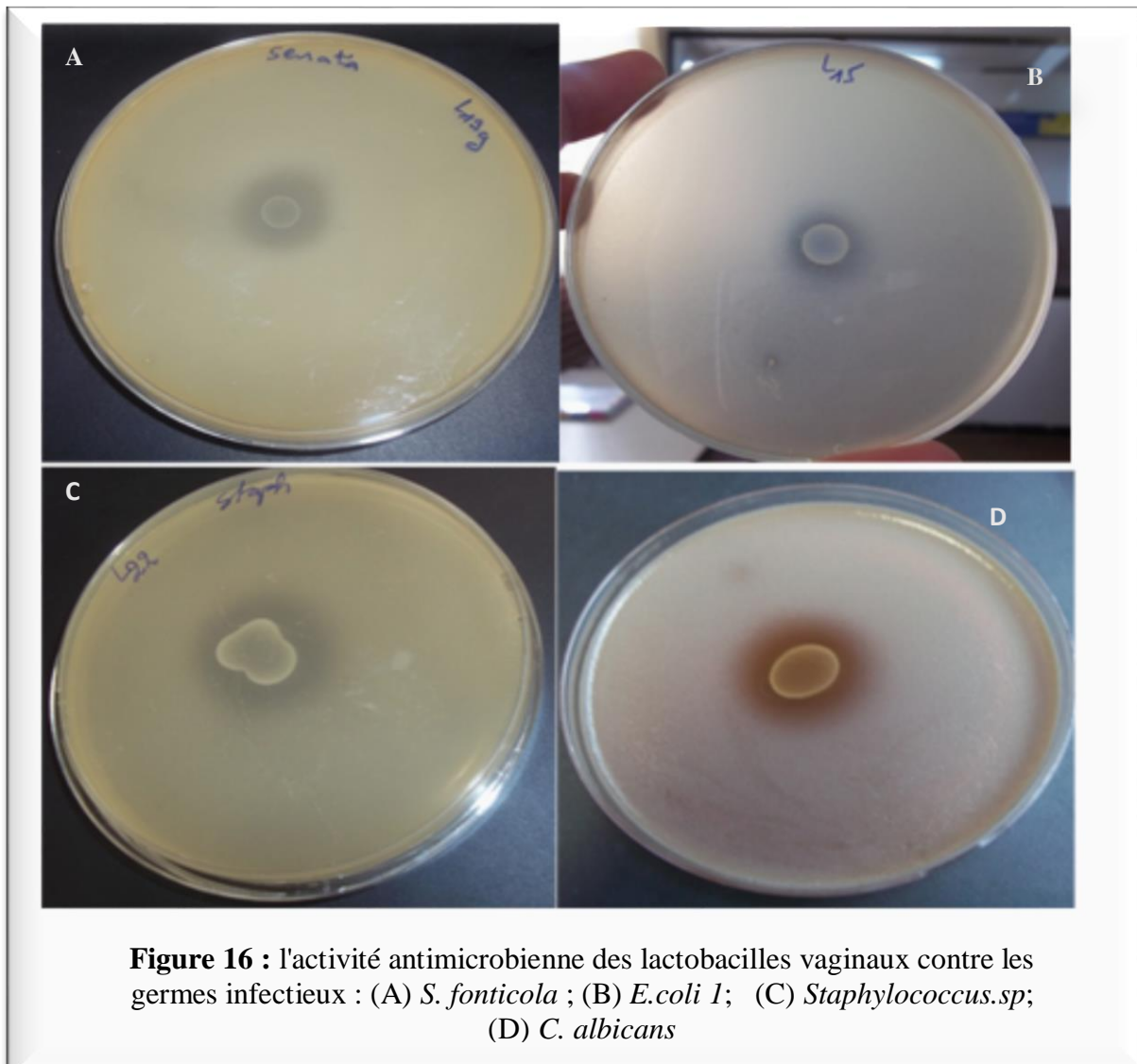
Il existe plusieurs limites d'étude qui devraient être prises en compte lors de l'interprétation de résultats obtenu dans cette étude. Tout d'abord, comme notre méthodologie s'est basée sur la culture pour détecter les espèces de *Lactobacillus*, seules les espèces susceptibles d'être cultivées ont été identifiées. L'absence de *L. iners* qui est normalement parmi la flore dominante de l'écosystème vaginal et due peut-être à l'utilisation du milieu MRS qui ne favorise pas la croissance de cette espèce (Falsen *et al.*, 1999). Notre étude ne donne qu'une vue limitée des espèces de *Lactobacillus* qui peuvent être présentes dans l'environnement vaginal. Les différences constatées dans la diversité et la répartition des espèces de *Lactobacillus* peuvent être due aussi à l'effet du cycle menstruel des différentes femme sujets, puisque la relation entre les hormones et la flore vaginale endogène est étroite (Purnima *et al.*, 2015). De ce fait, les résultats de notre étude ne peuvent en aucun cas reflétés la diversité de la flore vaginale chez les femmes Algériennes sans oublier aussi le nombre limité des prélèvements étudiés.

III. L'activité antimicrobienne des lactobacilles

Les résultats de l'effet inhibiteur des 23 lactobacilles vaginaux *in vitro* montrent que 39,13% possèdent un pouvoir antimicrobien contre les 4 germes infectieux testés (tableau 9 et figure 16) les résultats dans le tableau 9 montrent que les plus grandes zones remarquées sont obtenues par les isolats L17, L22, L23-1 et L20 contre *C. albicans*, *Staphylococcus. sp*, *E. coli 1* et *S. fonticola*, successivement.

Tableau 9 : les zones d'inhibition en mm (moyenne \pm écartype) des *Lactobacilles* isolés contre les germes testés.

Isolats	<i>C. albicans</i>	<i>Staphylococcus. sp</i>	<i>E. coli 1</i>	<i>S. fonticola</i>
L1	15,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	12,67 \pm 0,58	11,00 \pm 0,00
L3	24,00 \pm 1,73	0,00 \pm 0,00	11,67 \pm 0,58	10,67 \pm 1,15
L4	18,33 \pm 1,53	12,00 \pm 1,73	10,67 \pm 0,58	10,33 \pm 0,58
L5	16,33 \pm 1,15	0,00 \pm 0,00	14,00 \pm 0,00	16,33 \pm 1,15
L6	23,33 \pm 1,53	13,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,00	15,00 \pm 3,61
L7	24,00 \pm 0,00	11,00 \pm 0,00	11,67 \pm 0,58	18,00 \pm 0,00
L10	24,33 \pm 1,15	0,00 \pm 0,00	11,67 \pm 0,58	12,00 \pm 0,00
L12	22,67 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	13,67 \pm 0,58	12,00 \pm 0,00
L13	21,33 \pm 1,15	0,00 \pm 0,00	12,67 \pm 0,58	11,33 \pm 0,58
L14t	22,00 \pm 1,73	0,00 \pm 0,00	11,67 \pm 0,58	11,00 \pm 0,00
L14b	21,67 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,00	12,67 \pm 0,58
L15	24,00 \pm 0,00	11,33 \pm 1,15	12,67 \pm 0,58	13,67 \pm 2,31
L16	19,00 \pm 1,73	0,00 \pm 0,00	12,67 \pm 1,15	12,00 \pm 1,73
L17	25,67 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	13,67 \pm 0,58	16,00 \pm 3,46
L18	21,33 \pm 1,15	0,00 \pm 0,00	13,67 \pm 0,58	18,33 \pm 2,89
L19p	18,00 \pm 1,73	0,00 \pm 0,00	13,33 \pm 1,15	12,00 \pm 1,73
L19g	25,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,00	13,67 \pm 0,58	14,33 \pm 0,58
L20	24,33 \pm 1,15	11,67 \pm 0,58	14,67 \pm 0,58	20,00 \pm 0,00
L21	23,00 \pm 0,00	12,00 \pm 0,00	14,33 \pm 1,15	13,67 \pm 1,15
L22	13,00 \pm 0,00	16,67 \pm 2,89	15,33 \pm 2,31	16,67 \pm 1,15
L23-1	21,67 \pm 2,89	0,00 \pm 0,00	16,00 \pm 0,00	14,00 \pm 0,00
L23-2	21,00 \pm 1,00	14,33 \pm 1,15	12,00 \pm 0,00	17,33 \pm 2,31
L24	21,67 \pm 2,89	0,00 \pm 0,00	12,00 \pm 0,00	13,33 \pm 2,31



Aslim et Kilic, (2006), ont rapporté que parmi 58 isolats seulement 10 souches inhibées toutes les bactéries testées. Plusieurs travaux confirment que, des espèces de *Lactobacillus* humains possèdent une activité antagoniste contre les micro-organismes pathogènes ce qui maintient l'écosystème vaginal en bonne santé. Ces fonctions protectrices sont principalement attribuées à des espèces de *Lactobacillus* qui dominent la niche vaginale des femmes saines (Ravel *et al.*, 2011).

Dans de nombreuses études, le rôle important des lactobacilles vaginaux en tant que probiotiques potentiels a été démontré contre *Candida spp.* (Gil *et al.*, 2010) et les bactéries opportunistes les plus courantes (*S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae* et *K. pneumoniae*) (Razzak *et al.*, 2011 ; Stoyancheva *et al.*, 2014).

Les espèces de *Lactobacillus*, y compris *L. crispatus*, sont la composante dominante dans le microbiote vaginal chez la moitié des femmes ayant un vagin en bonne santé qui produisent une quantité substantielle d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène pour maintenir un environnement vaginal acide (pH 3,5 et 4,5). Ceci inhibe la prolifération des micro-organismes nuisibles tels que les streptocoques du groupe B, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Gardnerella vaginalis* ou d'autres anaérobies fastidieuses ou non cultivables (Lee *et al.*, 2016a). Ces anaérobies entraînent souvent des complications obstétricales, gynécologiques ou chirurgicales (Su *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2016b).

IV. Détection de la production de l'acide lactique

Les résultats indiqués dans le tableau 10 montrent que l'acide lactique produit par les lactobacilles étudiés est liée à l'acidité. Le niveau de pH induit par les lactobacilles isolés variait de 4,07 à 4,60 et l'acidité titrable (%) était entre 1,21 et 1,59%. L'isolat L22, a produit la plus grande quantité d'acide lactique avec une acidité titrable de 1,59%. L'acide lactique des lactobacilles vaginaux maintient un faible pH vaginal et un potentiel redox élevé, ce qui peut inhiber la croissance des autres bactéries (Rolfe, 2000).

McLean et Rosenstein (2000) ont observé que les souches dont la culture est plus acide sont les plus inhibiteurs.

Tableau 10 : le pH et le pourcentage de l'acide lactique produit par les lactobacilles. Les valeurs sont les moyennes \pm les écarts types.

Isolats	pH	Acidité titrable (%)	Isolats	pH	Acidité titrable (%)
L1	4,60 \pm 0,00	1,40 \pm 0,52	L16	4,45 \pm 0,01	1,29 \pm 0,45
L3	4,07 \pm 0,06	1,48 \pm 0,00	L17	4,44 \pm 0,01	1,30 \pm 0,00
L4	4,20 \pm 0,01	1,50 \pm 0,00	L18	4,40 \pm 0,02	1,31 \pm 0,17
L5	4,19 \pm 0,01	1,22 \pm 0,00	L19p	4,32 \pm 0,05	1,25 \pm 0,50
L6	4,18 \pm 0,00	1,43 \pm 0,00	L19g	4,31 \pm 0,02	1,38 \pm 1,15
L7	4,15 \pm 0,00	1,32 \pm 0,00	L20	4,42 \pm 0,08	1,35 \pm 0,06
L10	4,13 \pm 0,02	1,23 \pm 0,00	L21	4,41 \pm 0,03	1,40 \pm 0,00
L12	4,14 \pm 0,01	1,21 \pm 0,00	L22	4,47 \pm 0,02	1,59 \pm 0,29
L13	4,16 \pm 0,01	1,35 \pm 0,50	L23-1	4,33 \pm 0,04	1,25 \pm 0,87
L14t	4,16 \pm 0,01	1,37 \pm 0,52	L23-2	4,35 \pm 0,01	1,29 \pm 0,93
L14b	4,16 \pm 0,01	1,43 \pm 0,40	L24	4,32 \pm 0,02	1,31 \pm 0,76
L15	4,17 \pm 0,02	1,40 \pm 0,23	Témoin	6,34 \pm 0,15	0,10 \pm 0,00

L'acide lactique est un composé antimicrobien puissant des bactéries lactiques. La production d'acide lactique par les lactobacilles entraîne une baisse du pH qui est importante pour prévenir la colonisation et la prolifération d'organismes pathogènes non indigènes dans le vagin (Borges *et al.*, 2014). La production d'acide lactique a été détectée dans des études antérieures chez des isolats de lactobacilles vaginaux. Gil *et al.* (2010) ont rapporté que *L. salivarius* était le producteur d'acide lactique le plus élevé.

Les acides organiques sont le produit final de la fermentation des bactéries lactiques. Leur formation et la réduction du pH prolongent la phase de ralentissement de la croissance des microorganismes nuisibles. Il est bien connu que l'activité antibactérienne émerge à des niveaux plus élevés de pH lorsqu'il est dérivé d'acides organiques par rapport à celui dérivé des acides minéraux. Les effets toxiques de l'acide lactique / acétique consistent en la réduction du pH intracellulaire et la dissipation du potentiel membranaire (Lorca et de Valdez, 2009).

V. Evaluation de la production de peroxyde d'hydrogène

Dans le milieu MRSa additionné de horseradish peroxydase et de tétraméthylbenzidine (TMB), les isolats L12, L17 et L19g ont produit de faibles quantités de H₂O₂ qui se traduit en un pigment bleu sur des colonies de ces 3 isolats vue en dessous de ce gélose après l'exposition à l'air. Sachant que la peroxydase est connue pour oxyder le TMB en présence de H₂O₂ pour former un pigment bleu après l'exposition à l'air de la colonie productrice de H₂O₂ (Eschenbach *et al.*, 1989 ; Rosenstein *et al.*, 1997).

La production de H₂O₂ peut expliquer la colonisation de l'écosystème vaginal par les lactobacilles (Aroutcheva *et al.*, 2001a). *Lactobacillus* comme d'autres bactéries lactiques manquent le groupe hème et n'utilisent pas le système du cytochrome pour l'oxydation terminal. Ils possèdent des flavoprotéines qui transforment l'oxygène en H₂O₂. Ce mécanisme ainsi que l'absence de l'hémoprotéine catalase génère le H₂O₂ à des quantités qui dépassent la capacité de dégradation de l'organisme (Aroutcheva *et al.*, 2001a). H₂O₂ seul ou en combinaison avec des halogénures et de peroxydase qui sont présents dans les sécrétions vaginales a des propriétés toxiques efficaces. A cet égard, il faut tenir compte du fait que les souches productrices d'H₂O₂ semblent être plus stables dans l'environnement vaginal (Vallor *et al.*, 2001) et d'inhiber efficacement les micro-organismes indésirables (Eschenbach *et al.*, 1989). Quelques études *in vitro* montrent que les lactobacilles producteurs de H₂O₂ sont bactéricides à *Gardnerella vaginalis*, à quelques espèces de *Bacteroides*, à *Neisseria gonorrhoeae* et à *C. albicans* (Vitali *et al.*, 2007 ; Martinze *et al.*, 2008).

Klebanoff *et al.* (1991) ont mentionné que les lactobacilles producteurs de H₂O₂, sont présents dans le vagin de la plupart des femmes en bonne santé et absents chez la plupart des femmes atteintes de vaginose bactérienne. Ainsi, Antonio *et al.* (2005) ont indiqué que les femmes qui n'étaient pas colonisées par des lactobacilles producteurs de H₂O₂, comme *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri* et *L. vaginalis*, étaient 15 fois plus susceptibles d'avoir une vaginose bactérienne que les femmes colonisées par ces souches.

VI. Détection de la production de bactériocine

Les résultats figurés dans le tableau 11, montrent que la plupart des surnageants non tamponnés testés possèdent une activité inhibitrice contre les germes indicateurs, sauf pour *Staphylococcus.sp* aucun surnageant n'a donné un effet inhibiteur. L'absence d'effet après utilisation des surnageants tamponnés, indique qu'il était lié à la production d'acide lactique. Ceci confirme la capacité des lactobacilles vaginaux à diminuer le pH ce qui le rapproche au pH d'un milieu vaginal sain (Schwiertz *et al.*, 2006). On peut supposer que cela est dû à la synthèse de l'acide lactique qui s'accumule rapidement en conduisant à une diminution du pH puis à une suppression de divers agents pathogènes. Les lactobacilles maintiennent un pH bas par leur activité fermentaire, ce qui pourrait protéger la zone contre l'invasion de microorganismes indésirables (Aroutcheva *et al.*, 2001a).

L'effet inhibiteur par les surnageants tamponnés présumé être due à la production de H₂O₂ ou bien bacteriocin-like en éliminant l'effet de l'acide lactique (Petrova *et al.*, 2009). Sauf les isolats L7, L10, L12, L15, L19g et L20 ont montré une activité antagoniste contre *C. albicans* lorsque la catalase a été additionnée au surnageant tamponné. L'addition de pepsine, trypsine et α -chymotrypsine n'a montré aucun effet inhibiteur sur cette levure (figure 17). Par conséquent, les zones d'inhibition peuvent être liés à la capacité des lactobacilles étudiés à produire des substances protéiques (Bactériocine ou bacteriocin-like).

Tableau 11 : l'activité antimicrobienne des surnageants obtenus à partir des lactobacilles testés

[T (Témoin) : milieu non inoculé ; SNT : Surnageant Non Tamponné ; ST : Surnageant Tamponné ; ST+c : Surnageant Tamponné + catalase ; ST+(p,t, α -cht): Surnageant Tamponné +(pepsine, trypsine, α -chymotrypsine)]

	<i>C. albicans</i>				<i>Staphylococcus</i>		<i>E.coli</i> <i>I</i>		<i>S.fonticola</i>		pH	
	S N T	S T	ST+ c	ST+ (p,t, α - cht)	S N T	S T	S N T	S T	S N T	S T	S N T	S T
T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,10	6,60
L1	+	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,57	6,10
L3	+	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,54	6,16
L4	+	-	/	/	-	-	-	-	+	-	4,45	5,90
L5	+	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,48	5,87
L6	±	-	/	/	-	-	+	-	+	-	4,45	6,09
L7	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4,49	5,97
L10	+	+	+	-	-	-	+	-	±	-	4,52	6,18
L12	+	+	+	-	-	-	+	-	±	-	4,50	6,03
L13	±	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,45	5,92
L14t	±	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,49	5,92
L14b	±	-	/	/	-	-	±	-	±	-	4,47	5,89
L15	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4,41	5,94
L16	±	-	/	/	-	-	+	-	±	-	4,47	5,90
L17	±	-	/	/	-	-	±	-	±	-	4,44	5,98
L18	±	-	/	/	-	-	±	-	±	-	4,44	5,93
L19p	+	-	/	/	-	-	-	-	-	-	4,82	6,62
L19g	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4,42	5,91
L20	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4,41	5,95
L21	+	-	/	/	-	-	-	-	+	-	4,40	5,97
L22	+	-	/	/	-	-	-	-	+	-	4,42	6,00
L23-1	±	-	/	/	-	-	-	-	-	-	4,48	6,08
L23-2	+	-	/	/	-	-	-	-	+	-	4,50	6,00
L24	±	-	/	/	-	-	-	-	-	-	4,50	6,03

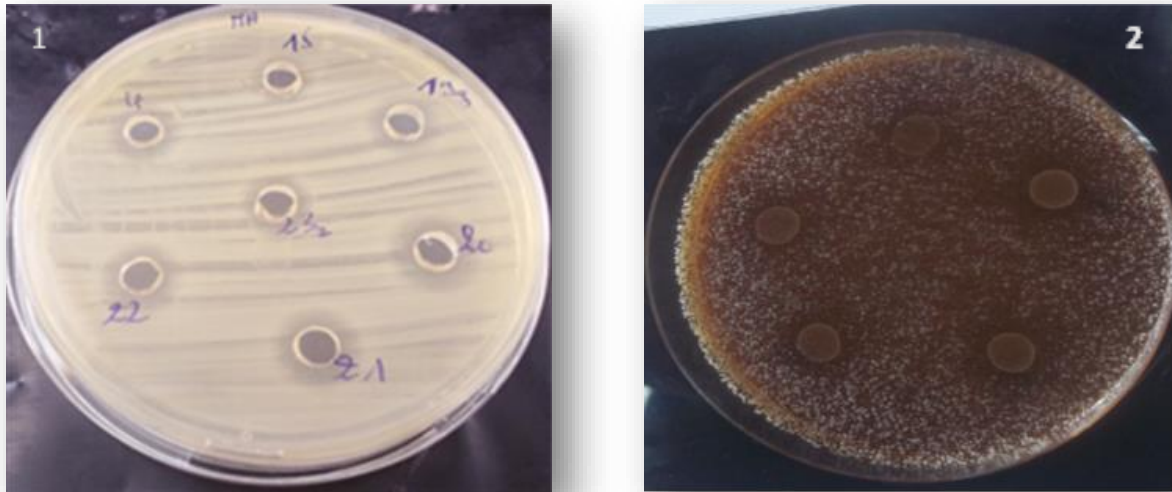


Figure 17 : effet inhibiteur des SNT contre *S. fonticola* (1) et ST+c contre *C. albicans* (2)

Les résultats présentés par Matu *et al.* (2010) qui ont travaillé sur des lactobacilles vaginaux isolés des femmes kényanes prouvent l'activité de ce groupe bactérien dans les mêmes conditions de notre expérimentation. Dasari *et al.* (2014) ont aussi isolé des lactobacilles vaginaux producteurs de bactériocine, capable d'inhiber la croissance des pathogènes du col de l'utérus. Les bactériocines sont moins fréquentes chez les lactobacilles vaginaux que d'autres (Zamfir *et al.*, 2000). Cependant, Aroutcheva *et al.* (2001b) et Annuk *et al.* (2003) ont révélé qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'activité de bactériocine, de l'acide lactique et de la production de H_2O_2 . Ils ont également constaté que certaines souches de *Lactobacillus* produisent l' H_2O_2 , mais ne démontraient aucun effet inhibiteur. Les résultats de la présente étude indiquent que les isolats L22, L4 et L3 produisent un niveau élevé d'acide lactique, mais ne produisent pas de H_2O_2 . Une autre étude menée par Aslim et Kilic (2006), montre aussi que certaines souches productrices d'acide lactique ne produisent pas de l' H_2O_2 .

VII. Test d'adhérence sur tube en verre

Les résultats de l'adhérence des cellules de lactobacilles sur les surfaces des tubes en verre sont indiqués dans le tableau 12 et figure 18. Parmi les 23 isolats étudiés sauf L10, L12, L14t et L21 ont été marqués score 3 ce qui suggère qu'ils sont adhérents en biofilm.

Tableau 12 : scores du biofilm formé sur la surface de verre (0: pas du biofilm ; 1: biofilm non adhérent ; 2: biofilm faiblement adhérent ; 3: biofilm adhérent)

Isolats	Score	Isolats	Score
L1	1	L16	0
L3	0	L17	0
L4	0	L18	0
L5	1	L19p	0
L6	1	L19g	2
L7	2	L20	0
L10	3	L21	3
L12	3	L22	1
L13	2	L23-1	1
L14t	3	L23-2	0
L14b	0	L24	0
L15	2		

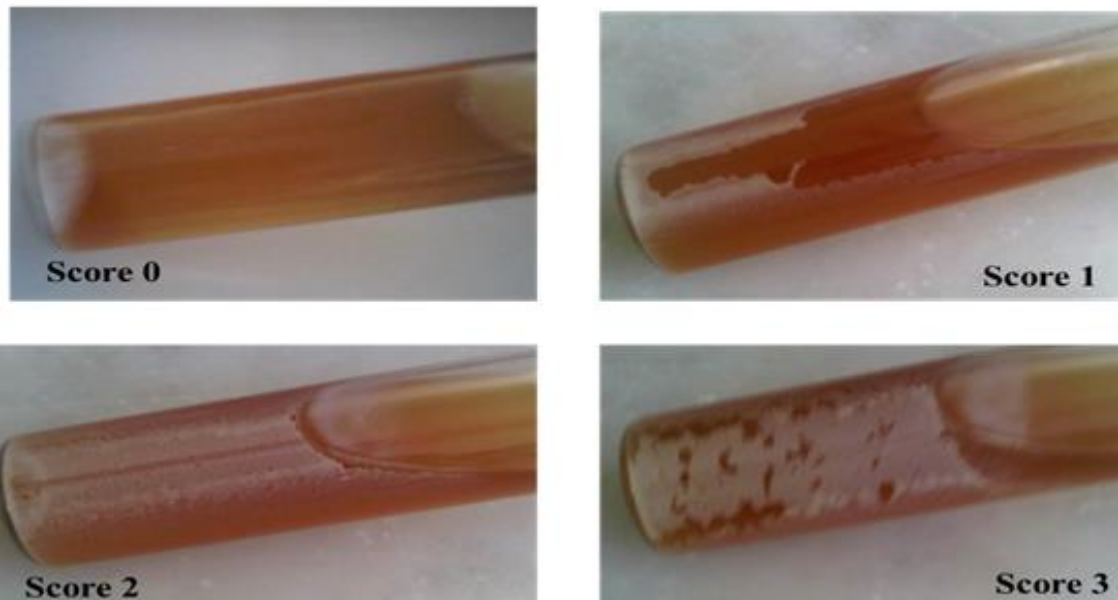


Figure 18 : échelle visuelle d'adhérence sur tube en verre.

Les résultats obtenus par (Samot, 2012) suggèrent que les souches sauvages des lactobacilles orales sont capables de produire des exopolysaccharides (EPS), ces bactéries ont été en mesure d'adhérer à une surface en verre. Les EPS peuvent avoir une influence importante sur les processus de la colonisation de l'hôte (Fanning *et al.*, 2012). En effet, cette adhésion a été bien étudiée chez *Streptococcus mutans* (Hamada et Slade, 1980 ; Tao et Tanzer, 2002).

VIII. Test d'adhérence sur microplaque

Les résultats figurés dans le tableau 13 montrent que parmi les 37 isolats, cinq seulement ont un pouvoir de former des biofilms. Jugés par leurs capacités à retenir le cristal violet (DO=1,13 et 1,05), les isolats L7 et L24 ont une forte capacité de former un biofilm. Les autres isolats L23-1, L12 et L35 ont montré un pouvoir moyen à faible de leur formation de biofilms.

Tableau 13 : les densités optiques des *Lactobacillus* en biofilms (T :Témoin).

Isolats	DO	Isolats	DO
L1	0,481	L23-1	0,939
L3	0,674	L23-2	0,417
L4	0,575	L24	1,130
L5	0,515	L25	0,512
L6	0,625	L27	0,636
L7	1,049	L28	0,392
L10	0,613	L30	0,536
L12	0,815	L31	0,450
L13	0,368	L32	0,478
L14t	0,437	L33	0,448
L14b	0,483	L34	0,550
L15	0,371	L35	0,867
L16	0,514	L36	0,445
L17	0,458	L38	0,409
L18	0,414	L39	0,424
L19p	0,500	L40	0,421
L19g	0,557	L41	0,392
L20	0,562	T1	0,535
L21	0,490	T2	0,481
L22	0,528	T3	0,689

Beaucoup de rapports ont conclu que presque tous les lactobacilles étudiés forment des biofilms sur des surfaces de polystyrène. *Lactobacillus* spp produit un biofilm protecteur épais et que *L. acidophilus* a démontré une capacité de formation de biofilms la plus élevée parmi toutes les espèces testées (Zakaria, 2013 ; Ventolini, 2015). Les biofilms sont des structures de conglomérat biologique particulièrement complexes où les bactéries se développent généralement. Le biofilm est responsable du maintien d'une unité écologique dans un état stable, dans lequel les bactéries sont équilibrées avec une interaction mutuellement bénéfique.

La recherche sur les biofilms des bactéries probiotiques est relativement limitée. Il a été démontré que *Bifidobacterium*, un probiotique intestinal est capable de former un biofilm pendant sa croissance, similaire à *L. rhamnosus* GG (Schwendicke *et al.*, 2014) ; Cependant, très peu d'études ont été menées sur les biofilms des *Lactobacillus* vaginaux. La formation de biofilm de lactobacilles promet de favoriser leur colonisation et leur persistance dans les muqueuses ; De plus, ce phénomène peut masquer les récepteurs cellulaires épithéliaux, empêchant ainsi l'adhérence des pathogènes (Martín *et al.*, 2008). La matrice extracellulaire du biofilm permet une organisation spatiale et une stabilité structurale pendant son développement (Jiao *et al.*, 2011). Cette matrice est un complexe macromoléculaire formée par des exopolysaccharides, des protéines et de l'ADN (Muscariello *et al.*, 2013). Plusieurs rapports l'ont caractérisé chez des micro-organismes pathogènes, mais peu d'études ont décrit sa composante chez les bactéries bénéfiques ou probiotiques (Habimana *et al.*, 2009 ; Muscariello *et al.*, 2013).

La nature chimique (protéines et glucides) de la matrice de biofilm des souches vaginales de *Lactobacillus* peut être pertinente dans le tractus vaginal. Des études protéomiques des fluides cervico-vaginaux ont démontré la présence de plusieurs sérine-protéases principalement avec des fonctions immunologiques, ainsi que des inhibiteurs de sérine et de cystéine protéases et d'autres protéases (Zegels *et al.*, 2009). L' α -amylase est également présente dans le liquide vaginal, où son activité est principalement associée à la dégradation du glycogène, ce qui peut favoriser la prolifération des lactobacilles et prévenir la croissance des pathogènes urogénitaux. Ainsi, la formation et la stabilité des biofilms des lactobacilles vaginaux potentiellement probiotiques dépendront de l'équilibre complexe entre ces différents composants (Nasioudis *et al.*, 2015).

IX. Effet de trois détergents sur les lactobacilles sélectionnés

Les CMI des trois produits de douches vaginales contre neuf lactobacilles testés sont présentés dans la figure 19 et 20. La CMI du produit B et C, se situait entre 1,5% et 0,39%. Cependant, le produit A a présenté une valeur de CMI plus basse par rapport aux mêmes organismes d'essai, se situant entre 0,19% et 0,09%.

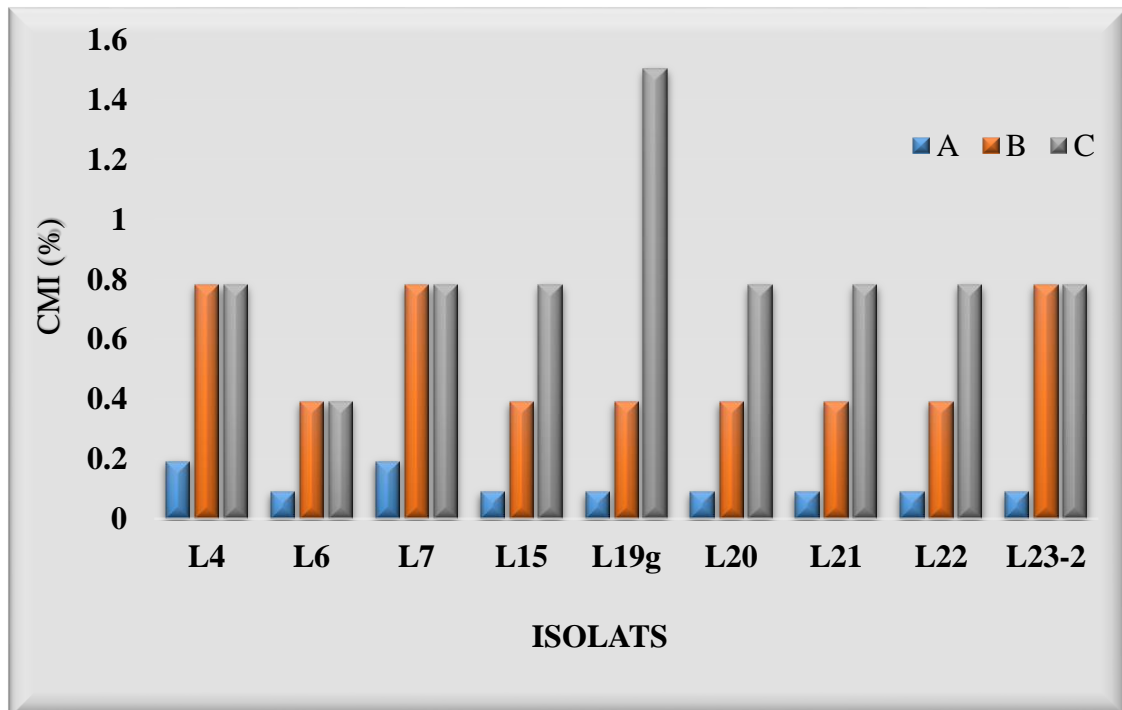


Figure 19 : effet de trois produits de douches sur neuf isolats des lactobacilles vaginaux

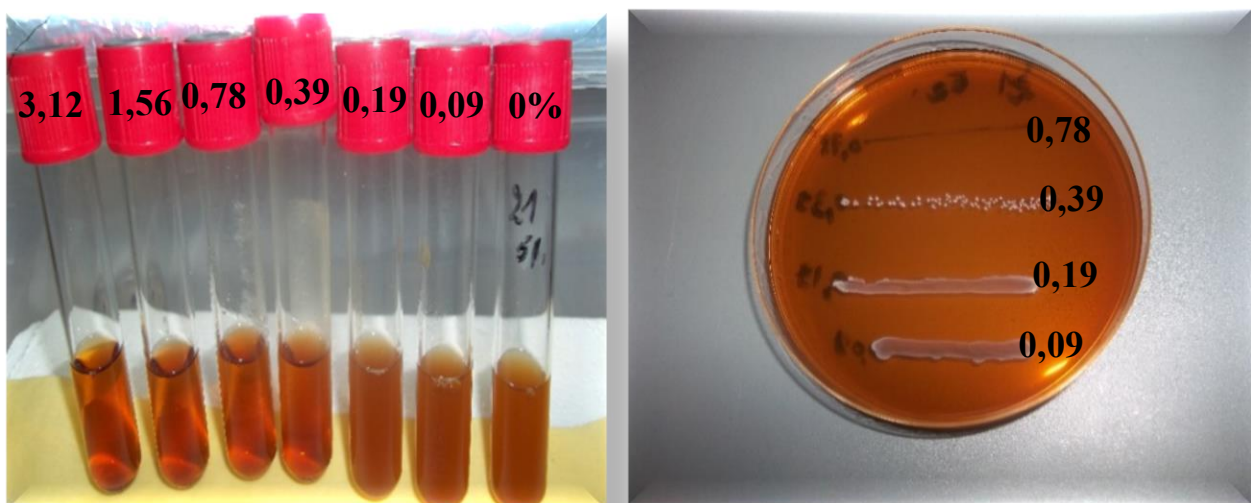


Figure 20 : l'effet inhibiteur du produit B sur l'isolat L21

Les résultats obtenus démontrent que certains produits vaginaux peuvent être nuisibles aux *Lactobacillus* et doivent donc être utilisés avec prudence. Il faut noter que certains produits de douches vaginales sont utilisés pour lutter contre les streptocoques du groupe B et contre les différentes espèces de *Candida* (Chu *et al.*, 2010).

Il doit également être noté que les effets des produits vaginaux sur la croissance bactérienne peuvent être sélectifs et peuvent varier selon les marques commerciales, comme l'a suggéré une autre étude *in vitro*, qui a démontré des différences entre les sept produits de douches commerciaux testés contre des isolats de lactobacilles ainsi que des bactéries associées à la vaginose bactérienne. Les résultats ont montré que les produits de douche composés de divers antiseptiques inhibent la croissance de tous les organismes vaginaux, y compris les lactobacilles (Juliano *et al.*, 1992 ; Pavlova et Tao, 2000). Cependant, les produits contenant principalement l'agent acidifiant et de l'eau, inhibent les organismes associés à la vaginose bactérienne, mais pas les lactobacilles (Pavlova et Tao, 2000).

Le test de TCM (Temps de Contact Minimal) peut mesurer directement les effets antimicrobiens des produits de douches vaginales (Juliano *et al.*, 1992). Le test de CMI pourrait ne pas refléter l'effet réel de l'activité antimicrobienne d'un gel de douche, car une solution de douche est appliquée en temps réduit qui ne peut pas s'étendre à 24h. Les résultats de la CMI de la présente étude peuvent accorder des informations sur l'activité antimicrobienne de divers produits de douches vaginales. En raison que la plupart des études sur ces produits (Gardner *et al.*, 1991 ; Scholes *et al.*, 1993), ont associé les divers risques sur la santé à l'utilisation de ces différents gels, les consommateurs doivent être conscients que certains produits de douches vaginales peuvent avoir un effet négatif sur la microflore vaginale et peut donc être nocif pour la santé des femmes.

X. Effet de quelques antibiotiques sur les lactobacilles sélectionnés

Dans la présente étude nous avons trouvé que le milieu MH agar utilisé n'été pas adéquat à la croissance des lactobacilles. Ceci a été décrit aussi par d'autres chercheurs pour la majorité des lactobacilles (Danielsen et Wind, 2003 ; Ocaña *et al.*, 2006). Par conséquent, l'effet des antibiotiques sur ces lactobacilles a été étudié sur gélose MRS. Selon les données présentées dans le tableau 14, figure 21 et 22, les neuf *Lactobacillus* sélectionnés étaient sensibles à TE, E, P, CD et C et résistants à Met, VA et K.

Tableau 14 : les zones d'inhibitions (en mm) des 8 ATB testés sur les 9 isolats.

ATB \ Isolats	Isolats								
	L4	L6	L7	L15	L19g	L20	L21	L22	L23 ₂
TE	24, 9 /24	19/19	22/23	24/25	23/22	28/28	24/25	20/30	28/30
E	28/25	35/35	28/27	28/28	26/25	35/37	29/30	33/34	30/31
P	37,32/30	37/36	30/31	30/30	36/34	40/44	32/32	35/36	35/36
Met	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R
CD	24/25	30/31	25/26	35/35	32/30	40c/40c	32/31	33c/35c	26/30
VA	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R
C	24/23	24/24	24/27	35/35	35/30	40/40	30/30	35/35	30/35
K	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R	R/R

R: Résistante; c: Présence de quelques colonies autour des disques d'ATB.

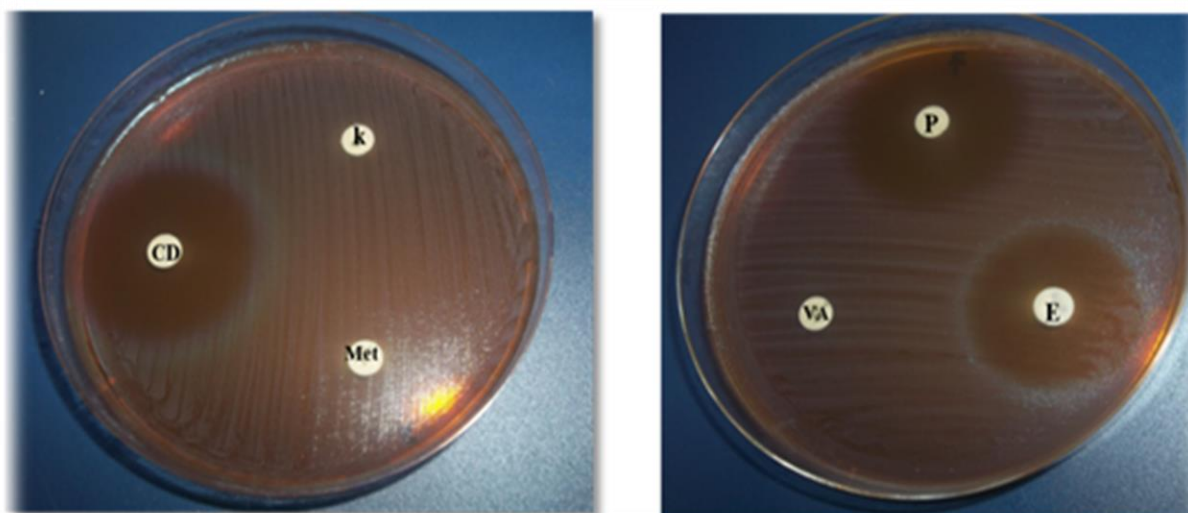


Figure 21 : méthode semi-quantitative des disques sur milieu MRS pour l'isolat **L7** inoculé en surface

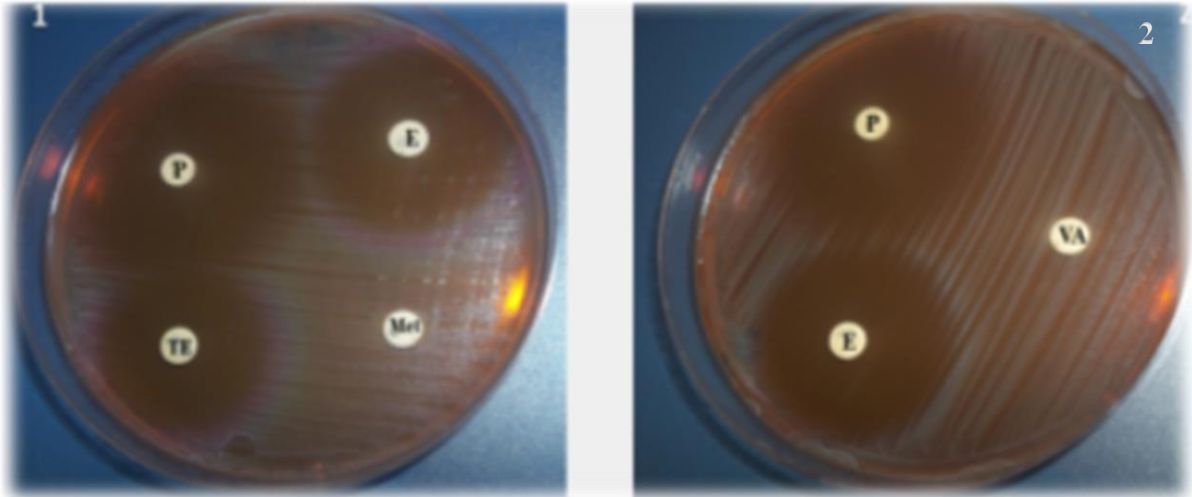


Figure 22 : méthode semi-quantitative des disques sur milieu MRS pour l'isolat **L19g** (1) et l'isolat **L21** (2)

Razzak *et al.* (2011) ont constaté que 93,3% des isolats lactobacilles étaient résistants à la vancomycine, alors que la plupart de ces isolats étaient sensibles à un degré supérieur à l'érythromycine (93,4%). Cette résistance est importante dans la sélection des lactobacilles potentiellement probiotiques.

Plusieurs études ont révélé qu'il y avait une augmentation du profil de résistance des espèces des *Lactobacillus* aux inhibiteurs de la synthèse des protéines (gentamycine, tobramicine) et les inhibiteurs d'acide nucléique (principalement l'acide nalidixique et la ciprofloxacine) (Mandar *et al.*, 2001). Ils ont constaté aussi qu'il y avait un pourcentage élevé de résistance des lactobacilles aux aminoglycosides (gentamycine, streptomycine, kanamycine). Les résultats ont montré que les lactobacilles étaient très sensibles à l'érythromycine et ce corrélait avec les résultats obtenus par Wilks *et al.* (2004) qui ont constaté que les lactobacilles étaient très sensibles à cet ATB.

D'autres études réalisées par Pirje *et al.* (2016), montrent que parmi les lactobacilles vaginaux testés aucune résistance n'a été observée à l'ampicilline, le chloramphénicol, l'érythromycine, la gentamycine, la tétracycline et la vancomycine. Néanmoins, un niveau élevé de résistance à la norfloxacine, au métronidazole et au triméthoprimsulfaméthoxazole a été constaté par Danielsen et Wind (2003) ; Delgado *et al.* (2005), cette résistance pourrait être interprétée comme une résistance naturelle élevée à ces antibiotiques.

Les antibiotiques peuvent indifféremment altérer la croissance des bactéries bénéfiques dans le corps, en créant un déséquilibre de la microflore du vagin, permettant ainsi la fixation et la prolifération des organismes potentiellement pathogènes comme *S. aureus*, *E. coli* et *C. albicans*. En conséquence, le traitement des vaginites doit prendre en considération la sensibilité des lactobacilles à certains antibiotiques. Bien que les agents antimicrobiens soient généralement efficaces pour éradiquer l'infection, mais une forte incidence de la récurrence existe.

La qualité de vie des patients est affectée et beaucoup de femmes deviennent frustrés par l'agent antimicrobien rapporté, dont l'efficacité est diminuée en raison de l'augmentation du développement de la résistance microbienne, en outre, l'utilisation de l'agent antimicrobien non seulement sélectionne les bactéries résistantes, mais il peut également perturber l'équilibre du corps en tuant les bactéries amicales conduisant à des infections (Reid, 2008).

Conclusion

Le but du présent travail était de valider *in vitro* le concept probiotique appliqué à l'écosystème vaginal. Pour cela, nous avons tout d'abord procédé à l'isolement et l'identification des lactobacilles vaginaux à partir des femmes saines et en âge de reproduction. Ces isolats doivent présenter une bonne activité probiotique ; par inhibition des principaux germes causant des infections urogénitales. Cette inhibition est généralement provoquée par la production de l'acide lactique, de peroxyde d'hydrogène et de bactériocine. Puis évalué le caractère d'adhérence des lactobacilles en utilisant deux méthodes : test d'adhérence sur tube de verre et sur microplaque. Enfin testé l'effet de trois produits de douche commerciaux et huit antibiotiques sur neuf isolats de lactobacilles présentant un large spectre d'activité antimicrobienne.

L'isolement à partir de 41 échantillons vaginaux a permis d'obtenir 37 isolats qui semblent être des lactobacilles. L'étude phénotypique a abouti à des résultats qui montrent que tous les isolats sont à coloration de Gram positive et à catalase négatives. La fermentation de 15 sucres par les 23 lactobacilles nous a permis de distinguer des groupes hétérogènes dans leur utilisation.

L'identification génotypique montre que tous les isolats appartiennent au groupe IV de *Lactobacillus*. Dont 26 isolats appartenant à l'espèce *L. reuteri* et 11 isolats à l'espèce *L. salivarius*. Ces deux espèces sont considérées dans la littérature parmi les espèces de la microflore vaginale saine à effet probiotique.

A la suite des tests d'antagonisme réalisés *in vitro* par 23 lactobacilles, 9 isolats seulement montrent un large spectre d'activité antimicrobienne contre les 4 germes infectieux testés. Dont les plus grandes zones d'inhibitions ont été obtenues par les isolats L17, L22, L23-1 et L20 contre *C. albicans*, *Staphylococcus. sp*, *E. coli 1* et *S. fonticola*, successivement.

Tous les isolats produisent l'acide lactique ce qui montre leur capacité à créer un environnement acide. Tandis que le niveau de pH induit par ces isolats variait de 4,07 à 4,60 et l'acidité titrable étaient entre 1,21% et 1,59%. L'isolat L22, a produit la plus grande quantité d'acide lactique avec une acidité titrable de 1,59%. Seulement 3 isolats (L12, L17 et L19g) ont produit de faibles quantités de H₂O₂.

Les résultats de la détection de bactériocine ont montré que la plupart des surnageants non tamponnés possèdent une activité inhibitrice contre les germes indicateurs, sauf contre *Staphylococcus.sp* aucun surnageant n'a donné un effet. L'effet inhibiteur par les surnageants tamponnés est présumé être dû à la production de H₂O₂ ou bien à la production des bactériocines

en écartant l'effet de l'acide lactique. Les isolats L7, L10, L12, L15, L19g et L20 ont montré une activité antagoniste contre *C. albicans* lorsque la catalase a été additionnée au surnageant tamponné. L'addition de pepsine, trypsine et α -chymotrypsine n'a montré aucun effet inhibiteur sur cette levure. Par conséquent, les zones d'inhibition peuvent être liées à la capacité des lactobacilles étudiés à produire des substances protéiques (bactériocine ou bactériocin-like).

Les résultats de l'adhérence des cellules des lactobacilles sur la surface des tubes en verre ont montré que parmi les 23 isolats sauf L10, L12, L14t et L21 ont été marqués score 3 ce qui suggère qu'ils sont adhérents en biofilm. Concernant le test d'adhérence sur microplaque les résultats montrent que parmi les 37 isolats, cinq seulement ont un pouvoir de former des biofilms. Jugés par leurs capacités à retenir le cristal violet (DO=1,13 et 1,05), les isolats L7 et L24 ont une forte capacité de former un biofilm. Les autres isolats L23-1, L12 et L35 ont montré un pouvoir moyen à faible de leur formation de biofilms.

Les résultats de la CMI des trois produits de douches vaginales contre les neuf lactobacilles testés ont montré que la CMI du produit B et C, se situait entre 1,5% et 0,39%. Cependant, le produit A a présenté une valeur de CMI plus basse par rapport aux mêmes organismes d'essai, se situant entre 0,19% et 0,09%.

L'effet des antibiotiques sur ces neuf lactobacilles étudiés sur gélose MRS, ont montré que ces derniers étaient sensibles à TE, E, P, CD et C et résistants à Met, VA et K.

En perspective, nos travaux méritent d'être consolidés par d'autres études *in vitro* et *in vivo* de l'activité probiotique des espèces de lactobacilles sélectionnés. Il sera nécessaire de réaliser des études *in vitro* dans des conditions se rapprochant du milieu vaginal en réalisant des co-cultures avec des pathogènes dans un milieu vaginal reconstitué. Des études *in vivo* avec des modèles expérimentaux d'animaux, ainsi que des études contrôlées et randomisées en double aveugle avec contrôle placebo chez des femmes en nombre suffisant devront être effectuées.

Les concepts probiotique et prébiotique appliqués à l'écosystème vaginal sont ainsi originaux et séduisants. Ils satisferont sûrement les adeptes des traitements dits naturels qui souhaitent éviter l'utilisation excessive d'antibiotiques. Cependant, de nombreuses études *in vivo* sont encore nécessaires afin de valider leur efficacité en tant que traitement préventif ou curatif. L'approche symbiotique semblerait intéressante en préventif pour lutter contre des infections récidivantes. L'avenir des lactobacilles à potentiel probiotique au sein de l'écosystème vaginal est donc prometteur.

Références
bibliographiques

- **Aguin**, T.J., Sobel, J.D. (2015). Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Curr Infect Dis Rep*, 17(6),462.
- **Al-Ghazzewi**, F., Elamir, A., Tester, R. and Elzagoze, A. (2015). Effect of depolymerised konjac glucomannan on wound healing. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 5, 125–128.
- **Al-Ghazzewi**, F.H. and Tester, R. (2014). Inhibition of the adhesion of *Escherichia coli* to human epithelial cells by carbohydrates. *Bioact Carbohydr Diet Fibre*, 4, 1–5.
- **Al-Ghazzewi**, F.H. and Tester, R.F. (2016). Biotherapeutic agents and vaginal health. *Journal of Applied Microbiology*, 121(1):18-27.
- **Amouri**, I., Abbes, S., Sellami, H., Makni, F., Sellami, A., Ayadi, A. (2010). La candidose vulvovaginale: revue. Vulvovaginal candidiasis: A review. *J Med Mycology*, 20(2), 108-15.
- **Anane**, S., Kaouech, E., Zouari, B., Belhadj, S., Kallel, K., Chaker, E. (2010). Les candidoses vulvovaginales : facteurs de risque et particularités cliniques et mycologiques. *J Mycol Med*, 20, 36-41.
- **Annuk**, H., Shchepetova, T., Kullisaar, T., Songisepp, E., Zilmer, M., Mikelsaar, M. (2003). Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. *J Appl Microbiol*, 94, 403-412.
- **Antonio**, M.A., Rabe, L.K., Hillier, S.L. (2005). Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J Infect Dis*, 192, 394-8.
- **Aroutcheva**, A., Gariti, D., Simons, M., Shott S, Faro, J., Simoes, J.A., Gurguis, A and Faro, S. (2001a). Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*, 185, 375-379.
- **Aroutcheva**, A., Simoes, J.A., Faro, S. (2001b). Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 9,33-39.
- **Askienazy-Elbhar**, M. (2000). Flore vaginale et infections génitales. Validité de deux marqueurs : pH vaginal et score de la flore. *Gynecologic and Obstetrics Fertility*, 28, 502-508.
- **Aslim**, B. and Kilic, E. (2006). Some probiotic properties of vaginal lactobacilli isolated from healthy women. *Jpn J Infect Dis*, 59, 249-253.
- **Aude**, C. (2016). Intérêt de l'utilisation des probiotiques en thérapeutique urogénitale. Thèse de doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux, France.

- **Bakobaki, J.M., Lacey, C.J., Bukenya, M.I., Nunn, A.J., McCormack, S., Byaruhanga, R.N., Okong, P., Namukwaya, S.W. et al. (2005).** A randomised controlled safety and acceptability trial of dextrin sulphate vaginal microbicide gel in sexually active women in Uganda. *AIDS*, 19, 2149–2156.
- **Bannatyne, R., Smith, A. (1998).** Recurrent bacterial vaginosis and metronidazole resistance in *Gardnerella vaginalis*. *Sex Transm Infect*, 74, 455-662.
- **Barberot, V. (2012).** Ecosystème vaginal : comment le défendre ? La lettre du Gynécologue. 2012.
- **Barbes, C. and Boris, S. (1999).** Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care and STDs*, 13(12), 747-751.
- **Bechelaghem, N. (2013).** Contribution à l'étude des infections uro-génitales chez la femme : Diagnostic et moyens de lutte. Mémoire de Master, Université de Mostaganem, Algérie.
- **Berrebi, A. and Ayoubi, J. (1999).** Le déséquilibre de la flore vaginale. *Genesis : Gynécologie Obstétrique Endocrinologie*, 44,1-4.
- **Berthier, F. and Ehrlich, S.D. (1998).** Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiol Lett*. 161, 97-106.
- **Bohbot, J.M (2007).** Rôle de l'hygiène intime dans la prévention des désordres génitosexuels. *Genesis*,121, 2-5.
- **Bohbot, J.M. (2008).** Les sécrétions vaginales. *Pelvi-périnéologie*, 3(1), 19-24.
- **Bohbot, J.M., Lepargneur, J.P. (2012).** La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations. *Gynécologie Obstétrique Fertil*, 40(1), 31-6.
- **Borges, S., Silva, J., Teixeira P. (2014).** The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet*, 289, 479-89.
- **Bou-Antoun, S. (2008).** Compositions that aim to promote the development and growth of a beneficial vaginal microflora. European Patent EP 2303300.
- **Bulut, Ç. (2003).** Isolation and molecular characterization of lactic acid bacteria from cheese. Dissertation of Master of Science. İzmir Institute of Technology Izmir, Turkey.
- **Calzolari, E., Masciango, R., Milite, V., Verteramo, R. (2000).** Bacterial vaginoses and contraceptive methods. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 70 (3), 341-6.

- **Chaban**, B., Links, M. G., Jayaprakash, T. P., Wagner, E. C., Bourque, D. K., Lohn, Z., Albert, A. Y., van Schalkwyk, J., Reid, G. & other authors. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome*, 2:23.
- **Chamberlain**, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N. and Caskey, C.T. (1988). Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res*, 16, 11141-11156.
- **Chang**, T.L., Chang, C.H., Simpson, D.A. et al. (2003). Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express function two-domain CD4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11672–7.
- **Chapman**, C.M.C., Gibson, G.R., Rowland, I. (2014). Effects of single- and multi-strain probiotics on biofilm formation and *in vitro* adhesion to bladder cells by urinary tract pathogens. *Anaerobe*, 27, 71-6.
- **Chu**, T.Y., Hsiung, C.A., Chen, C.A., Chou, H.H., Ho, C.M., Chien., T.Y et al. (2010). Post-coital vaginal douching is risky for nonregression of low-grade squamous intraepithelial lesion of the cervix. *Gynecol Oncol*, 120, 449-53.
- **Cocolin**, L., Diez, A., Urso, R., Rantsiou, K., Comi, G., Bergmaier, I. and Beimfohr, C. (2007). Optimization of conditions for profiling bacterial populations of food by culture-independent methods. *Int J Food Microbiol*, 120,100–109.
- **Coste**, I., Judlin, P., Lepargneur, J.P. and Bou-Antoun, S. (2012). Safety and efficacy of an intravaginal prebiotic gel in the prevention of recurrent bacterial vaginosis: a randomised double-blind study. *Obstet Gynecol Int*, ID 147867.
- **Cribby**, S., Taylor, M., Reid, G. (2008). Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, ID 256490.
- **D’Cruz**, O.J. and Uckun, F.M. (2005). Preclinical and clinical profile of Emmella (dextrin-2-sulphate) – a potential anti HIV microbicide. *J Appl Res*, 5, 26–34.
- **Dalié**, D.K.D., Deschamps, A.M. and Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria – Potencial for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21,370-380.
- **Danielsen**, M., Wind A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int J Food Microbial*, 82(1), 1–11.
- **Dasari**, S., Naidu, R., Shouri, D., Wudayagiri, R. and Valluru, L. (2014). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* against microbial flora of cervicovaginal infections. *Asian Pac J Trop Dis*, 4(1), 18-24.

- **De Leon**, E.M., Jacober, S.J., Sobel, J.D., Foxman, B. (2002). Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis*, 2:1.

- **Delcroix**, M. (1997). Les antiseptiques en gynécologie : des dérives trop fréquentes. *Gyn Obs*, 371,1-3.

- **Delgado**, S., Florez, A.B., Mayo, B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Curr Microbiol*, 50, 20-27.

- **Demirci**, M. and ve Gündüz, H. (1994). Süt teknolojisi el kitab 184. Hasad Yayıncılık, Ankara (in Turkey).

- **Denis**, F., Poly, M.C, Martin, C., Bingen, E., Quentin, R. (2007). Bactériologie médicale. Elsevier Masson.

- **Döderlein**, A. (1892). Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. Verlag von Eduard Besold, Leipzig, Germany.

- **Dominguez-Bello**, M.G., De Jesus-Laboy, K.M., Shen, N., Cox, L.M., Amir, A., Gonzalez, A. et al. (2016). Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*, 22, 250–3.

- **Donders**, G.G. (2007). Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 21, 355–373.

- **Donnarumma**, G., Molinaro, A., Cimini, D., De Castro, C., Valli, V., De Gregorio, V., De Rosa, M., Schiraldi, C. (2014). *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC Microbiol*, 14:137.

- **Dover**, S.E., Aroutcheva, A.A., Faro, S. And Chikindas, M.L. (2008). Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *International Journal of Probiotics and Prebiotics*, 3, (4), 219-230.

- **Dubernet**, S., Desmasure, N. (2002). A PCR based method for identification of *Lactobacillus* at genus level. *FEMS Microbiol Lett*, 214, 271-5.

- **Eschenbach**, D.A., Davick, P.R., Williams, B.L., Klebanoff, S.J., Young Smith, K., Critchlow, C.M. (1989). Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*, 27, 251–256.

- **Falsen, E., Pascual, C., Sjoden, B., Ohlen, M., Collins, M.D. (1999).** Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. *Int J Syst Bacteriol*, 49, 217–21.

- **Famularo, G., Pieluigi, M., Coccia, R., Mastroiacovo, P. and DeSimone, C. (2001).** Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypothesis*, 56 (4), 421-430.

- **Fanning, S., Hall, L.J., Cronin, M., Zomer, A., MacSharry, J., Goulding, D., Motherway, M.O., Shanahan, F., Nally, K., Dougan, G., van Sinderen, D. (2012).** Bifidobacterial surface exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 2108–2113.

- **Farage, M.A., Maibach, H.I. (2011).** Morphology and physiological changes of genital skin and mucosa. *Curr Probl Dermatol*, 40, 9-19.

- **Fettweis, J.M., Brooks, J.P., Serrano MG, Sheth NU, Girerd PH, Edwards DJ, et al. (2014).** Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiol Read Engl*, 160 (10), 2272-82.

- **Figuroa-González, I., Quijano, G., Ramírez, G., Cruz-Guerrero, A. (2011).** Probiotics and prebiotics-perspectives and challenges. *J Sci Food Agric*, 91(8), 1341-8.

- **Fleming, H.P., Etchells, J.L., Costilow, R.L. (1985).** Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Journal of Applied Microbiology*, 30, 1040-1042.

- **Fooks, L.J. and Gibson, G.R. (2002).** Probiotics as modulators of the gut flora. *Br J Nutr* 88(1), 39-49.

- **François, D., Marie-Cécile, P., Christian, M., Edouard, B., Roland, Q. (2011).** Bactériologie médicale. 2^{ème} édition.

- **Gardner, J.W., Schuman, K.I., Slattery, M.L., Sanborn, J.S., Abbott, T.M., Overall, J.C. (1991).** Is vaginal douching related to cervical carcinoma? *Am J Epidemiol*, 133, 368-375.

- **Garg, K. B., Ganguli, I., Das, R. & Talwar, G. P. (2009).** Spectrum of *Lactobacillus* species present in healthy vagina of Indian women. *Indian J Med Res*, 129, 652–657.

- **Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, 125, 1401–1412.

- **Gil, N.F., Martinez, R.C., Gomes, B.C., Nomizo, A., De Martinis, E.C. (2010).** Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz J Microbiol*, 41, 6-14.

- **Goldstein**, E.J.C., Tyrrell, K. L. and Citron, M.D. (2015). *Lactobacillus* species: taxonomic complexity and controversial susceptibilities. *Clinical Infectious Diseases*, 60 (2), 98-107.
- **Gorodeski**, G.I., Hopfer, U., Liu, C.C., Margles, E. (2005). Estrogen acidifies vaginal pH by up regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells. *Endocrinology*, 146 (2), 816-24.
- **Graesslin**, O., Fortier, D., Quereux, C. (2005). Hygiène intime féminine : pathologies induites par une hygiène inadaptée. *Corresp Pelvi-Périnéal*, 5(2), 37-40.
- **Güzel**, A.B., Küçükgöz-Güleç, Ü., Aydın, M., Gümral, R., Kalkanci, A. and Ilkit, M. (2013). *Candida* vaginitis during contraceptive use: the influence of methods, antifungal susceptibility and virulence patterns. *Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 33, 850-856.
- **Habimana**, O., Meyrand, M., Meylheuc, T., Kulakauskas, S., Briandet, R. (2009). Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*, 75(24), 7814–7821.
- **Hamada**, S. and Torii, M. (1978). Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun*, 20, 592-9.
- **Hamada**, S., Slade, H.D. (1980). Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev*, 44, 331-84.
- **Haya**, J., Africa, G., Carlos, L.M., Maher, B., Lara, H. (2014). Importance of lactic acid in maintaining vaginal health: a review of vaginitis and vaginosis etiopathogenic bases and a proposal for a new treatment. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 4, 787-799.
- **Hickey**, R.J., Zhou, X., Pierson, J.D., Ravel, J., Forney, L.J. (2012). Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl Res*, 160 (4), 267-82.
- **Hillier**, S., Holloway, M., Rabe, L. (2000). Antimicrobial agent susceptibility of *Lactobacillus crispatus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, and other *Lactobacillus* species. In: 39th Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy, ASM's annual meeting on infectious diseases. American Society for Microbiology, Washington.
- **Hoover**, D.G., Harlander, S.K. (1993). Screening methods for detecting bacteriocin activity. In bacteriocins of lactic acid bacteria (Hoover, D.G. and Steenscr, L.R.); pp.23-39. Academic press, California, USA.
- **Hou**, W., Han, L., Li, M., Chen, J. and Chen, Y. (2014). Effectiveness evaluation of alginate oligosaccharides antibacterial gel for bacterial vaginosis. *Life Sci J*, 11, 528-531.

- **Hummelen**, R., Chagalucha, J., Butamanya, N.L., Cook, A., Habbema, J.D.F, Reid, G. (2010). *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV. *Int J Gynecol Obstet*, 111(3), 245- 8.

- **Jacobsen**, C. N., Rosenfeldt Nielsen, V., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen Pærregaard K. F., A., Sandstro, B., Tvede, M, M., And Jakobsen. M. (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl Environ Microbiol*, 65 (11), 4949-56.

- **Jaisamrarn**, U., Triratanachat, S., Chaikittisilpa, S., Grob, P., Prasauskas, V. and Taechakraichana, N. (2013). Ultralow-dose estriol and lactobacilli in the local treatment of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric*, 16, 347-355.

- **Jiao**, Y., D'haeseleer, P., Dill, B.D., Shah, M., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F., Thelen, M.P. (2011). Identification of biofilm matrix-associated proteins from an acid mine drainage microbial community. *Appl Environ Microbiol* ,77(15), 5230–5237.

- **Jin**, L., Tao, L., Pavlova, S.I., So, J.S., Kiwanuka, N., Namukwaqya, Z., Saberbein, B.A. and Wawer, M. (2007). Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. *J Appl Microbiol*, 102, 1107–1115.

- **Johnson**, J.L., Phelps, C.F., Cummins, C.S., London, J., Gasser, F (1980). Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* Group. *Int J Syst Bacteriol*, 30, 53–68.

- **Juliano**, C., Piu, L., Gavini, E., Zanetti, S., Fadda, G. (1992). *In vitro* antibacterial activity of antiseptics against vaginal lactobacilli. *Eur Clin Microbiol Infect Dis*, 11,1166-1169.

- **Kaewsrichan**, J., Peeyananjarassri, K. & Kongprasertkit, J. (2006). Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 48, 75–83.

- **Klebanoff**, S.J., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A., Waltersdorff, A.M. (1991). Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *J Infect Dis*, 164 (1), 94-100.

- **Kumar**, N., Behera, B., Sagiri, S.S., Pal, K., Ray, S.S. and Roy, S, (2011). Bacterial vaginosis: etiology and modalities of treatment – a brief note. *J Pharm Bioallied Sci*, 3, 496–503.

- **Lachlak**, N., Ageron, E., Zampatti, O., Michel, G., Grimont, P.A. (1996). Composition of the *Lactobacillus acidophilus* complex isolated from vaginal flora. *New Microbiol*, 19(2),123-32.

- **Lamont, R.F.,** Sobel, J.D., Akins, R.A., Hassan, S.S., Chalworapongsa., T, Kusanovic, J.P., Romero, R. (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *An international Journal of Obstetrics and Gynecology*, 118, 533-49.
- **Lauer, E.,** Helming, C., Kandler, O. (1980). Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus* (Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zentbl Bakteriol Microbiol Hyg Abt*, 1,150-68.
- **Lecomte, F.** (1999). Les infections urinaires de la femme. John Libbey Eurotext, 198 p.
- **Lee, J. A. and Chee, H. Y.** (2010). *In vitro* antifungal activity of equol against *Candida albicans*. *Mycobiology*, 38(4), 328-330.
- **Lee, W.L.,** Tsui, K.H., Wang, P.H. (2016 b). *Lactobacillus* and health. *J Chin Med Assoc*, 79, 639-41.
- **Lee, W.L.,** Yeh, C.C., Wang, P.H. (2016a). Did self-sampling improve the adherence to group B streptococci screening in pregnant women? *J Chin Med Assoc*, 79,51-3.
- **Lepargneur, J.P.,** Rousseau, V. (2002). Rôle protecteur d la flore de Doderleïn. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 31, 485-494.
- **Li, J.,** Aroutcheva, A.A., Faro, S., Chikindas, M.L. (2005). Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 13, 135-140.
- **Linhares, I.M.,** Giraldo, P.C., Baracat, E.C. (2010). New findings about vaginal bacterial flora. *Rev Assoc Med Bras*, 56 (3), 370-4.
- **Llewellyn-Jones, D.,** Oats, J., Abraham, S. (2004). Llewellyn-Jones fundamentals of obstetrics and gynecology. 8th edition. Edinburgh; New York: Mosby.
- **Lorca, G.L. and de Valdez, G.F.** (2009). *Lactobacillus* stress responses. In: *Lactobacillus* molecular biology: from genomics to probiotics, E. Ljungh, T. Wadström (Eds.), Caister Academic Press, Norfolk, UK, 115–138.
- **Low-Beer, N.,** Gabe, R., McCromac, S., Kitchen, V.S., Lacey, C.J. and Nunn, A.J. (2002). Dextrin sulphate as a vaginal microbicide: randomised, double-blind, placebo-controlled trial including healthy female volunteers and their male partners. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 31, 391–398.
- **MacGroarty, J.** (1993). Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 6, 252-264.

- **Maggi, L.**, Mastromarino P., Macchia S., Brigidi P., Pirovano F., Matteuzzi D. and Conte U. (2000). Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 389-395.
- **Maitra, A.**, Rollins, M., Tran, L., Al-Ghazzewi, F. and Tester, R. (2013). Prebiotic konjac glucomannan hydrolysate reduces *Streptococcus mutans* in oral biofilms. *Int Assoc Dent Res*, Seattle, Washington, USA.
- **Maldonado-Barragán, A.**, Caballero-Guerrero, B., Martín, V., Ruiz-Barba, J.L and Rodríguez, J.M. (2016). Purification and genetic characterization of gassericin E, a novel co-culture inducible bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* EV1461 isolated from the vagina of a healthy woman. *BMC Microbiology*, 16:37.
- **Mandar, R.**, Lijunkene, K., Haf, H., Karaki, T., Miklsaur, M. (2001). Antimicrobial susceptibility of intestinal lactobacilli of healthy children. *Scand J Infect Dis*, 33 (5), 344-349.
- **Martin, M.N.**, Orinda, G.O., Njagi, N.M., Cohen, C.R. and Bukusi, E.A. (2009). *In vitro* inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Anearobe*, 16 (3), 210-5.
- **Martín, R.**, Soberón, N., Vanechoutte, M., Flórez, A.V., Vázquez, F., Suárez, J.E. (2008). Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol*, 11(4), 261–266.
- **Martin, R.**, Suarez, J.E. (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 76(2), 400-5.
- **Martinez-Pena, M.D.**, Castro-Escarpulli, G. and Aguilera- Arreola, M.G. (2013). *Lactobacillus* species isolated from vaginal secretions of healthy and bacterial vaginosis intermediate Mexican women: a prospective study. *BMC Infect Dis*, 13, 189.
- **Martino, J.**, Vermund, S. (2002). Vaginal Douching: evidence for risks and benefits to women's health. *Epidemiol Rev*, 24,109-124.
- **Martinze, R.C.R.**, Franceschini, S.A., Patta, M.C., Nunes, A.C., Moreira, J.L.S., Anukam, K.C., Martinis, De R.C.P. (2008). Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected women. *Appl Environ Microbiol*, 74(14), 4539-4542.
- **Mastromarino, P.**, Brigidi, P., Macchia, S., Maggi, L., Pirovano, F., Trinchieri, V., Conte, U. and Matteuzzi, D. (2002). Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 884–893.

- **Mastromarino, P., Vitali, B and Mosca, L. (2013).** Bacterial vaginosis: a review on clinical trials with probiotics. *New Microbiol*, 36, 229-238.

- **Matu, M. N., Orinda, G. O., Njagi, E.N.M, Cohen, C. and Bukusi, E.A. (2010).** *In vitro* inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. *Anaerobe*, 16(3), 210-5.

- **McLean, N.W., Rosenstein, I.J. (2000).** Characterization and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonize the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol*, 49, 543–52.

- **Mendes-Soares, H., Suzuki, H., Hickey, R.J. & Forney, L.J. (2014).** Comparative functional genomics of *Lactobacillus* spp. reveals possible mechanisms for specialization of vaginal lactobacilli to their environment. *J Bacteriol*, 196, 1458–1470.

- **Mirlohi, M., Sabihe, S.Z., Mahmoud, S. Z. (2008).** Identification of lactobacilli from fecal flora of some Iranian infants. *Iran J Pediatr Dec*, 18 (4), 357-363.

- **Mirmonsef, P., Hotton, A.L., Gilbert, D., Burgad, D., Landay, A., Weber, K.M., Cohen, M., Ravel, J. et al. (2014).** Free glycogen in vaginal fluids is associated with *Lactobacillus* colonization and low vaginal pH. *PLoS ONE*, 9 (7), e102467.

- **Morelli, L., Zonenenschain, D., Del Piano, M., Cognein, P. (2004).** Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics. *J Clin Gastroenterol*, 38(2), 107–10.

- **Murchison, H., Larrimore, S. and Curtiss, R. (1981).** Isolation and characterization of *Streptococcus. mutans* defective in adherence and aggregation. *Infect Immun*, 34, 1044-55.

- **Muscariello, L., Marino, C., Capri, U., Vastano, V., Marasco, R., Sacco, M. (2013).** CcpA and three newly identified proteins are involved in biofilm development in *Lactobacillus plantarum*. *J Basic Microbiol*, 53(1), 62–71.

- **Nader-Macias, M.E.F. and Tomas, M.S.J. (2015).** Profiles and technological requirements of urological probiotics. *Adv Drug Deliv Rev*, 92, 84–104.

- **Nakagawa, T., Shimada, M., Mukai, H., Asada, K., Kato, I., Fujino, K. and Sato, T. (1994).** Detection of alcohol-tolerant hiochi bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol*, 60, 637-640.

- **Nasioudis, D., Beghini, J., Bongiovanni, A.M., Giraldo, P.C., Linhares, I.M. and Witkin, S.S. (2015).** α -Amylase in vaginal fluid: association with conditions favorable to dominance of *Lactobacillus*. *Reprod Sci*, 22, 1393–1398.

- **Neut, C.**, Verrière, F., Hans, J., Nelis, Coenye, T. (2015). Topical treatment of infectious vaginitis: effects of antibiotic, antifungal and antiseptic drugs on the growth of normal vaginal *Lactobacillus* strains. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*, 5, 173-180.
- **Newton, E.R.**, Piper, J.M., Shain, R.N., Perdue, S.T., Pears, W. (2001). Predictors of the vaginal microflora. *Am J Obstet Gynecol*, 184,845–53.
- **O’Hanlon, D.E.**, Lanier, B.R., Moench, T.R. and Cone, R.A. (2010). Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infectious Diseases*, 10, 120.
- **O’Hanlon, D.E.**, Moench, T.R., Cone, R.A (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis*, 11,200.
- **O’Hanlon, D.E.**, Moench, T.R., Cone, R.A. (2013). Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS ONE*,8 (11), e80074.
- **O’Toole, G.A.**, Kolter, R. (1998). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*, 28, 449-461.
- **Ocak, S.**, Cetin, M., Hakverdi, S., Dolapcioglu, K., Gungoren, A., Hakverdi, A.U. (2007). Effets of intrauterine device and oral contraceptive on vaginal flora and epithelium. *Saudi Medical Journal*, 28 (5), 727-31.
- **Ocaña, V.**, Clara, S., and Nader Macias, M.E. (2006). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic vaginal lactobacilli. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, Article ID 18182, 1-6.
- **Ocana, V.**, Nader-Macias, M. (2004). Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol Biol*, 268, 347-354.
- **Ocana, Y.S.**, Pescede Ruiz Holquado, A.A., Nader-Macias, M.E. (1999). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65,5631-5635.
- **Okkers, D.J.**, Dicks, L.M.T., Silvester, M., Joubert, J.J., Odendaal, H.J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology*, 87, 726-734.

- **Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2002).** Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, 279–289.

- **Parent, D., Bossens, M., Bayot, D., Kirkpatrick, C., Graf, F., Wilkinson, F. and Kaiser, R. (1996).** Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied *Lactobacilli acidophili* and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. *Arzneimittel Forschung/Drug Research*, 46(1), 63-73.

- **Pascual, L.M., Daniele, M.B., Giordano, W., Pájaro, M.C. and Baberis, I.L. (2008).** Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol*, 56, 397-402.

- **Patel, D.A., Gillespie, B., Sobel, J.D., Leaman, D., Nyirjesy, P., Weitz, M.V., Foxman, B. (2004).** Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obstet Gynecol*, 190(3), 644-53.

- **Paul, De V., George, M. G, Dorothy, J., Noel, R.K., Wolfgang, L., Fred, A. R., Karl-Heinz, S. and William, B.W. (2009).** Bergey's manual of systematic bacteriology. 2nd edition. Volume Three. The Firmicutes. University of Georgia Athens, GA 30602-2605 USA.

- **Pavlova, S.I., Tao, L. (2000).** *In vitro* inhibition of commercial douche products against vaginal microflora. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 8, 99-104.

- **Petrova, M., Georgieva, R., Dimitonova, S., Ivanovska, N., Hadjieva, N., Danova, S. (2009).** Inhibitory activity of vaginal lactobacilli against human pathogens. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23, 627-631.

- **Petrova, M.I., van den Broek, M., Balzarini, J., Vanderleyden, J., Lebeer, S. (2013).** Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev*, 37(5), 762-92.

- **Pirje, H., Eleri, L., Jelena, S., Imbi, S., Heleri, T., Natalja, B., Helen, O., Ave, A., Tiiu, R., Dagmar, H., Kulli, S., Andres, S and Reet, M. (2016).** Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 27: 304-84.

- **Pirotta, M.V., Garland, S.M. (2006).** Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. *J Clin Microbiol*, 44(9), 3213-7.

- **Purnima, M., Harry, N. A., Eva, R., Karl, K., Kavitha, R., Roshan, N., Anjali, A., Arthur, L. Reingold, Lee W. Riley and Jeffrey D. Klausner. (2015).** Identification of culturable vaginal *Lactobacillus* species among reproductive age women in Mysore, India. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 636-641.

- **Rajan**, N., Cao, Q., Anderson, B.E., Pruden, D.L., Sensibar, J., Duncan, J.L. and Schaeffer, A.J. (1999). Roles of glycoproteins and oligosaccharides found in human vaginal fluid in bacterial adherence. *Infect Immun*, 67, 5027–5032.
- **Rastall**, R.A., Maitin, V. (2002). Prebiotics and synbiotics: towards the next generation. *Curr Opin Biotechnol*, 13 (5), 490-6.
- **Ravel**, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S.K., McCulle, S.L., et al. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(1),4680-7.
- **Razzak**, M.S.A., Al-Charrakh, A.H., AL-Greitty, B.H. (2011). Relationship between lactobacilli and opportunistic bacterial pathogens associated with vaginitis. *North Am J Med Sci*, 3, 185-92.
- **Reid**, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 437-443.
- **Reid**, G. (2005). The importance of guidelines in the development and application of probiotics. *Curr Pharm Des*, 11(1),11-6.
- **Reid**, G. (2008). Probiotic lactobacilli for urogenital health in women. *J Clin Gastroenterol*, 42 (3), 234-236.
- **Reid**, G. et al. (2011). Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol*, 9, 27–38.
- **Reid**, G., Beuerman, D., Heinemann, C., Bruce, A.W. (2001a). Probiotic Lactobacillus dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 32 (1), 37-41.
- **Reid**, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. (2001b). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 30 (1), 49-52.
- **Reid**, G., Charbonneau, D., Erb, J., Kochanowski, B., Beuerman, D., Poehner, R. et al. (2003). Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 35(2), 131-4.
- **Richardson**, A.B., Martin, H.L., Stevens, C.E. et al. (1998). Use of nonoxynol-9 and changes in vaginal lactobacilli. *J Infect Dis*, 178, 441–5.
- **Riley**, M.A. and Chavan, M.A. (2007). Bacteriocins ecology and evolution. Chapter 4: the diversity of bacteriocins in Gram positive bacteria. 45-46.

- **Ritchie**, M.L. and Romanuk, T.N. (2012). A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. *PLoS One* 7 (4), e34938.
- **Rodriguez**. J.M, Collins, M.D, Sjoden, B., Falsen, E. (1999). Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 49,1573-6.
- **Rolfe**, D.R. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr*, 130, 396–402.
- **Romero**, R., Hassan, S.S., Gajer, P. et al. (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*, 2 :4.
- **Rose**, W.A., McGowin, C.L., Spagnuolo, R.A., EavesPyles, T.D., Popov, V.L., Pyles, R.B. (2012). Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. *PLoS One* 7(3), e32728.
- **Rosenstein**, I.J., Fontaine, E.A., Morgan, D.J., Sheehan, M., Lamont, R.F., Taylor-Robinson D. (1997). Relationship between hydrogen peroxide-producing strains of lactobacilli and vaginosis-associated bacterial species in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,16, 517-22.
- **Rousseau**, V. (2004). Evaluation d’oligosaccharides à effet prébiotique vis-à-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat. Institut national des sciences appliquées de Toulouse, France.
- **Rousseau**, V., Lepargneur, J.P., Roques, C., Remaud-Simeon, M., Paul, F. (2005). Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe*,11 (3), 145-53.
- **Sambrook**, J., Russell, W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed., Cold spring harbor laboratory press, Cold spring harbor, NY.
- **Samot** J. (2012). Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. Thèse de doctorat. Université Bordeaux 2, France
- **Schleifer**, K.H., Ludwig, W. (1995). Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol*, 18,461–7.
- **Scholes**, D., Daling, J.R., Stergachis, A., Weiss, N.S., Wang, S.P., Grayston, J.T. (1993). Vaginal douching as a risk factor for acute pelvic inflammatory disease. *Obstet Gynecol*, 81, 601-606.

- **Schurman, J.J.** (2001). Antibacterial activity of hydrogen peroxide against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in fruit juices, both alone and in combination with organic acids. Master thesis. Faculty of the Virginia polytechnic institute and state university. United States.
- **Schwendicke, F., Dorfer, C., Kneist, S., Meyer-Lueckel, H., Paris, S.** (2014). Cariogenic effects of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in a dental biofilm model. *Caries Research*, 48,186-192.
- **Schwartz, A., Taras, D., Rusch, K., Rusch, V.** (2006). Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints? *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 5:4.
- **Shahbuddin, M., Shahbuddin, D., Bullock, A.J., Ibrahim, H., Rimmer, S. and MacNeil, S.** (2013). High molecular weight plant hetero-polysaccharides stimulate fibroblasts but inhibit keratinocytes. *Carbohydr Res*, 375, 90–99.
- **Sobel, J.D.** (2007). Vulvovaginal candidiasis. *Lancet*, 369,1961-71.
- **Song, Y.L., Kato, N., Liu, C.X., Matsumiya, Y., Kato, H., Watanabe, K.** (2000). Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol Lett*, 187, 167-73.
- **Spacek, J., Buchta, V., Jílek, P., Förstl, M.** (2007). Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 131(2), 198-202.
- **Spear, G.T., French, A.L., Gilbert, D., Zariffard, M.R., Mirmonsef, P., Sullivan, T.H. et al.** (2014). Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *J Infect Dis*, 210(7),1019-28.
- **Spear, G.T., McKenna, M., Landay, A.L., Makinde, H., Hamaker, B., French, A.L. et al.** (2015). Effect of pH on cleavage of glycogen by vaginal enzymes. Zhong G, éditeur. *PLOS ONE*, 10(7), e0132646.
- **Spurbeck, R.R., Arvidson, C.G.** (2011). Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiology*, 6(5), 567-82.
- **Srinivasan, S., Liu, C., Mitchell, C.M., Fiedler, T.L., Thomas, K.K., Agnew, K.J., Marrazzo, J.M., Fredricks, D.N.** (2010). Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS one*, 5(4), e 10197.
- **Stoyancheva, G., Marzotto, M., Dellaglio, F., Torriani, S.** (2014). Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*, 196, 645-53.

- **Su, P.**, Henriksson, A. and Mitchell, H. (2007). Prebiotics enhance survival and prolong the retention period of specific probiotic inocula in an *in vivo* murine model. *J Appl Microbiol*, 103, 2392–2400.
- **Su, W.H.**, Ho, T.Y., Tsou, T.S., Lee, W.L., Wang, K.C., Yu, Y.Y. et al. (2013). Development of a chip-based multiplexed immunoassay using liposomal nanovesicles and its application in the detection of pathogens causing female lower genital tract infections. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 52, 25-32.
- **Sutherland, A.**, Tester, R., Al-Ghazzewi, F., McCulloch, E. and Connolly, M. (2008). Glucomannan hydrolysate (GMH) inhibition of *Candida albicans* growth in the presence of *Lactobacillus* and *Lactococcus* species. *Microb Ecol Health Dis*, 20, 127–134.
- **Suzuki, H.**, Oomizu, S., Yanase, Y., Onishi, N., Uchida, K., Mihara, S., Ono, K., Kameyoshi, Y. et al. (2010). Hydrolysed konjac glucomannan suppresses IgE production in mice B cells. *Int Arch Allergy Immunol*, 152, 122–130.
- **Tao, L.**, Tanzer, J.M. (2002). Novel sucrose-dependent adhesion co-factors in *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*, 81,505-10.
- **Tester, R.**, Al-Ghazzewi, F., Shen, N., Chen, Z., Chen, F., Yang, J., Zhang, D. and Tang, M. (2012). The use of konjac glucomannan hydrolysates to recover healthy microbiota in infected vaginas treated with an antifungal agent. *Benef Microbes*, 3, 61–66.
- **Tester, R.F.** and Al-Ghazzewi, F.H. (2016). Beneficial health characteristics of native and hydrolysed konjac (*Amorphophallus konjac*) glucomannan. *J Sci Food Agric*, 96(10):3283-91.
- **Thoma, M.E.**, Grat, R.H, Kiwanuka, N et al. (2011). The short-term variability of bacterial vaginosis diagnosed by Nugent Gram stain criteria among sexually active women in Rakai, Uganda. *Sex Trans Dis*, 38, 111-6.
- **Thomas, S.** (1928). Döderlein's bacillus: *Lactobacillus acidophilus*. *J Infect Dis*, 43, 218-227.
- **Turovskiy, Y.**, Sutyak Noll, K. and Chikindas, M.L. (2011). The aetiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol*, 110, 1105–1128.
- **Vallor, A.C.**, Antonio, M.A., Hawes, S.E., Hillier, S.L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis*, 184, 1431–1436.
- **Van de Wijgert, J. H.**, Borgdorff, H., Verhelst, R., Crucitti, T., Francis, S., Verstraelen, H. & Jaspers, V. (2014). The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One* 9 (8), e105998.

- **Vásquez**, A., Jakobsson, T., Ahrné, S. et al. (2002). Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. *J Clin Microbiol*, 40, 2746–2749.
- **Ventolini**, G. (2015). Vaginal *Lactobacillus*: biofilm formation *in vivo* clinical implications. *Int J Womens Health*, 7, 243-247.
- **VIDAL**. Dictionnaire, 91^{ème} édition 2015. ISBN 13 :9782850912061.
- **Vitali**, B., Pugliese, C., Biagi, E., Candela, M., Ballen, S.T., Donders, G.G., Brigidi, P. (2007). Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis and real time PCR. *Appl Environ Microbiol*, 73(18), 5731-5741.
- **Ward**, L.J. and Timmins, M.J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett Appl Microbiol*, 29, 90-92.
- **Watts**, D.H., Rabe, L., Krohn, M.A., Aura, J., Hillier, S.L. (1999). The effects of three nonoxynol-9 preparations on vaginal flora and epithelium. *J Infect Dis*, 180, 426–37.
- **Wilks**, M., Wiggins, R., Whiley, A. et al. (2004). Identification and hydrogen peroxide (H₂O₂) production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *JCM*, 42 (2), 713-717.
- **Xu**, J., Sobel, J.D. (2003). Antibiotic-associated vulvovaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep*, 5(6):481-87.
- **Yan**, D.H., Lu, Z., Su, J.R. (2009). Comparison of main *Lactobacillus* species between healthy women and women with bacterial vaginosis. *Chin Med J (Engl)*, 122(22):2748-51.
- **Yoshimura**, K., Morotomi, N., Fukuda, K. et al. (2011). Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol* , 205 (3) ,235.e1-9.
- **Zakaria** Gomaa, E. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J Gen Appl Microbiol*, 59 (6), 425-36.
- **Zamfir**, M., Callewaert, R., Cornea, P.C., De Vuyst, L. (2000). Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. *FEMS Microbiol Lett*, 190, 305-308.

- **Zegels, G.**, Van Raemdonck, G.A., Coen, E.P., Tjalma, W.A., Van Ostade, X.W. (2009). Comprehensive proteomic analysis of human cervical-vaginal fluid using colposcopy samples. *Proteome Sci*, 7:17.

- **Zhou, X.**, Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R, Forney, L.J. (2004). Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*,150, 2565-73.

- **Zhou, X.**, Brown, C.J, Abdo, Z., Davis, C.C., Hansmann, M.A., Joyce, P. et al. (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J*, 1,121-33.

- **Zhou, X.**, Hansmann, M.A., Davis, C.C., Suzuki, H., Brown, C.J., Schütte, U., et al. (2010) The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58(2),169-81.

Annexes

Annexe 1 : Composition des milieux liquides, semi-solides et solides utilisés

Milieux liquides

Bouillon Nutritif (BN) (g/l)

Peptone.....	6g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Eau distillée.....	1000ml
pH=7,3±0,2	

MRS Bouillon (MRSB) (g/l)

Peptone de caséine.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Hydrogénophosphate dipotassique.....	2g
Tween 80.....	1g
Hydrogénocitrate di-ammonium.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse.....	0,04g
Eau distillée.....	1000 ml
pH =6,5±0,1	

Brain Heart Infusion Broth (BHIB) (g/l)

Infusion déshydratée de cerveau.....	12,5g
Infusion déshydratée de coeur de bœuf.....	5g
Peptone de protéose.....	10g
Glucose.....	2g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate disodique.....	2,5g
Eau distillée.....	1000 ml
pH =7,4 ± 0.2	

Bouillon YEPD

Extrait de levure.....	10g
Peptone.....	8g
Glucose.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml
pH= 6,5 ± 0, 2	

Milieu MRS tamponné

Ce milieu est obtenu en substituant l'eau distillée du MRS liquide par une solution tampon à pH 7.

Préparation de la solution tampon

La solution tampon K/ Na₂ à 0,2 M, pH 7 est obtenue par le mélange de deux solutions.

La solution A : dissoudre 5,44g de KH₂PO₄ (136,09 g/mole) dans 200 ml d'eau distillée.

La solution B : dissoudre 11,35g de Na₂HPO₄ (141,96 g/mole) dans 400ml d'eau distillée.

Mélanger les deux solutions A et B pour l'obtention de 600 ml de tampon en vérifiant le pH du mélange.

Milieus semi-solides

MH semi-solide

Extrait de viande.....	3g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g
Amidon.....	1,5g
Agar.....	7g
Eau distillée.....	1000 ml
pH= 7,3	

Sabouraud semi-solide

Peptone.....	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	7,5g
Eau distillée.....	1000 ml
pH=5,7± 0,2	

Milieus solides

Gélose nutritive (GN) (g/l)

Peptone.....	6g
Extrait de viande.....	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml
pH=7,3±0,2	

MRS Agar (MRSA) (g/l)

Peptone de caséine.....	10g
Extrait de viande.....	8g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	20g
Hydrogénophosphate dipotassique.....	2g
Tween 80.....	1g
Hydrogénocitrate di-ammonium.....	2g
Acétate de sodium.....	5g
Sulfate de magnésium.....	0,2g
Sulfate de manganèse.....	0,04g
Agar.....	20g
Eau distillée.....	1000 ml

pH =6,5±0,1

Sabouraud-chloramphénicol (g/l)

Peptone.....	10 g
Glucose.....	20 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
Chloramphénicol.....	0,5g

pH=5,7± 0,2

Mac-Conkey (g/l)

Peptone de caséine.....	15g
Extrait de viande.....	3g
Lactose.....	10g
Chlorure de sodium.....	5g
Sels biliaires.....	5g
Rouge neutre.....	0,07g
Agar.....	20g
Cristal violet.....	0,001g
Eau distillée.....	1000 ml

pH= 7,1±0,2

Annexe 2 : Composition des différents tampons

Tampon phosphate de sodium (Catalase, Trypsine)

Solution (A) 27.8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{L}$

Solution (B) 28.37g $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{L}$

Mélanger 39ml (A) + 61 ml (B) ; Ajouter l'eau pour avoir 200 ml de volume final

pH=7

Tampon pour pepsine

Préparer une solution d'HCl

110 μl HCl, ajusté à 50 ml d'eau distillée.

pH=2

Tampon pour α -chymotrypsine

Cette enzyme est soluble dans 1 mM HCl (2mg/ml).

Publication

Et

Communications

Liste de publication et communications issues de la thèse

PUBLICATION

Bechelaghem Nadia, Djibaoui Rachid, Ettalhi Mehdi, Arabi Abed. (2015). Diagnosis of a chronic vaginitis: Characterization of *Candida albicans* and *in vitro* antagonistic activities of vaginal *Lactobacillus*. *South Asian Journal Experimental Biology*, 5(4): 143-150.

COMMUNICATIONS NATIONALES

Bechelaghem Nadia, Djibaoui Rachid, Ettalhi Mehdi. (2017). Probiotic properties of some vaginal lactobacilli isolated from healthy women. VII^{ème} journée scientifique de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Mostaganem, Algérie.

Bechelaghem Nadia, Djibaoui Rachid, Ettalhi Mehdi. (2016). Diagnostic d'une vaginite chronique : Caractérisation de *Candida albicans* et étude *in vitro* de l'effet antagoniste des *Lactobacillus* vaginaux. VI^{ème} journée scientifique de la faculté des sciences de la nature et de la vie, Mostaganem, Algérie.

COMMUNICATION INTERNATIONALE

Bechelaghem Nadia, Djibaoui Rachid, Ettalhi Mehdi. (2016). Study of Some Healthy Women Vaginal Lactobacilli: Probiotic Properties and Susceptibility to Detergents and Antibiotics. Academic Fora, 34th International Conference on Medical, Medicine and Health Sciences-MMHS, Gönen Hotel, Istanbul, Turkey.

**REGULAR ARTICLE**

Diagnosis of a chronic vaginitis: Characterization of *Candida albicans* and *in vitro* antagonistic activities of vaginal *Lactobacillus*

Bechelaghem Nadia^{1*}, Djibaoui Rachid¹, Ettalhi Mehdi², Arabi Abed¹

¹Laboratory of Microbiology and Plant Biology, Faculty of Nature and Life Sciences, University of Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem, Algeria

²Health public department, Public Hospital of Ain-Tedeles, Mostaganem, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 7 Oct 2015

Revised: 7 Nov 2015

Accepted: 9 Nov 2015

***Corresponding Author:**

Email: nadia201107@hotmail.com

Phone: +213 782314836

Keywords: Antibiotics; Chronic vaginitis; *C. albicans*; Morphogenesis; Pathogenesis; *Lactobacillus*

ABSTRACT

Long-term use of antibiotics, in the treatment of vaginal infection can lead to *Candida* overgrowth. The motive of the present study was real case of a woman with chronic vaginitis. During ten years, the patient was subjected to a treatment with antibiotics such as gentamycin and lincomycin. Following remarks of a gynecologist, the complicated infection showed like yeast vaginitis symptoms. Consequently we isolated the germ from a vaginal swab sample taken from the patient, and then it was identified phenotypically and belonged to *Candida albicans*. Our study was followed by examination of the effects of pH, temperature and growth media on the morphogenesis of the isolated *C. albicans*. The results showed that pH 7.4, temperature at 37 °C and glucose free medium were optimal conditions for filamentation. In order to study the antagonistic effect of vaginal lactobacilli against *C. albicans*, we used 23 *Lactobacilli* isolated from several healthy women. The results showed that all isolates had an inhibitory effect against *C. albicans* with a maximal zone of 25.67 ± 0.58 mm obtained by the isolate L17.

1. Introduction

Taking of broad-spectrum antibiotics, can eradicate the normal vaginal flora, allowing overgrowth of yeast (Spinillo et al., 1999). The majority of yeast vaginitis cases which are characterized by white discharge, local itching, and irritation was found to be caused by *C. albicans* (Sobel, 2007). *C. albicans* is an opportunistic fungal pathogen in the human body, which can live as commensal in different locations such as gastrointestinal and genitourinary tracts in about 70% of humans. In immunocompromised patients, this organism can convert from harmless commensal to pathogen (Schulze and Sonnenborn, 2009). It is a polymorphic fungus, capable of converting from unicellular to a filamen-

tous form including pseudo and true hyphae. This morphogenesis is interrelated to the pathogenesis of *C. albicans* (Calderone, 2002). Adherence by germ tubes has been shown to play a critical role in the pathogenesis of infections. This morphological change between the yeast and the various filamentous forms occurs in response to different environmental factors. *In vivo*, the yeast mycelium transition appears to play a role in pathogenesis and considered as an important virulence factor (Yang, 2003). *In vitro*, the morphological transition can be easily induced by environmental and /or nutritional conditions (Johnson et al., 2005). Serum is one of the most potent inducers of hyphal development. Morphogenesis is an essential trait in the patho-

genic fungus where *C. albicans* is clearly required for virulence (Saville et al., 2003). Lactobacilli, which are well known for their potential ability to prevent diseases in humans, are also the predominant members of the vaginal flora in healthy women (Martinez et al., 2008). They effectively protect the vagina against pathogens by producing antimicrobial compounds such as hydrogen peroxide, bacteriocins, and weak organic acids like acetic and lactic acid (Valore et al., 2002). Some researchers from developing countries have reported significant *in vitro* inhibition of pathogenic vaginal *Candida* by certain lactobacilli species isolated from vaginal and non-vaginal sources (Osset et al., 2001).

In the present work, we investigate a chronic vaginal infection in a woman. We isolated and identified the responsible germ; we studied some factors affecting its morphogenesis. Finally, we proposed the human lactobacilli as an antagonistic agent to inhibit *C. albicans*. Consequently, our main goal was to diagnosis and to characterize the chronic vaginitis and to propose how it can be cured.

2. Material and Methods

2.1. Isolation and identification of the causative germ

The sampling was effectuated by a midwife using a swab. The isolation of germs from the swab was carried in the laboratory of bacteriology in Public hospital in Aïn- Tedeles (Mostaganem- Algeria).

The causative organism was isolated using Sabouraud -Chloramphenicol medium (SDA-C) and incubated at 37 °C for 48 h, to be identified by:

Germ tubes test: A single colony was inoculated into 1 ml of human serum and incubated at 37 °C. After 2-4 h, a wet mount was prepared and examined under the microscope to look for the presence of germ tubes. The germ tubes are indicative of *C. albicans* and *C. dubliniensis* (Bhavan et al., 2010).

Chlamydospores formation: The medium is composed as follows: Glucose, (NH₄)₂SO₄, MgSO₄, 7H₂O (0.5 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l) and agar (15 g/l). After streaking the medium by *Candida*, a cover-slip was placed on agar and subsequently incubated for 48 h at 30 °C. A direct observation under optical microscope was made (Braga de Souza et al., 2010).

Growth at 45 °C: This test has been considered useful for the differentiation of *C. albicans* (growth) from *C. dubliniensis* (no growth). It was examined

using the samples, forming germ tubes during 24 h and those showing chlamydospores production. The temperature test was performed using yeast peptone dextrose (YPD) and Sabouraud dextrose agar (SDA) medium. The culture was incubated at 45 °C, and growth was assessed daily for 10 days (Pinjon et al., 1998).

Gram stain: Gram stained was used to look for the presence of gram positive budding yeast cells.

Tween 80 agar: The Tween 80 medium (10 g peptone, 5 g NaCl, 0.1 g CaCl₂, 1000 ml distilled water, 5 ml Tween 80, pH 6.8) was used to evaluate the lyplolytic activity of the isolate. The samples previously cultured in SDA medium at 30 °C for 24 h, which were indicative of *C. albicans* or *C. dubliniensis*, were transferred to Tween 80 agar by softly touching the colony with a sterile swab perpendicularly oriented toward the agar. The cultures were incubated at 30 °C and evaluated daily, for 5 days. Esterase production was evidenced as the presence of a halo around the site of inoculation, observed with transmitted light after 2 to 3 days, being indicative of *C. albicans* (Slifkin, 2000).

Carbohydrate assimilation:

An API 20C AUX system (BioMerieux) was used to determine the species.

2.2. Influence of some parameters on the morphogenesis of *C. albicans*

Morphology was observed under light microscope every 1.5 h for all effects of the following parameters:

The culture of a stored *C. albicans* was inoculated in YEPD broth and incubated at 37 °C for 24 h. Yeast cells were washed twice by centrifugation with sterile water. The turbidity of the suspension was adjusted to 0.5 Mc Farland solutions (1-5 × 10⁶ UFC/ml) (Nadeem et al., 2013). Two growth media were used to study their effect on morphogenesis. The first was horse serum media and the second was a modified sabouraud's glucose broth (MSGB) media.

The horse Serum media composition is: 20 ml of YEPD broth mixed with 20 ml of horse serum. YEPD is first autoclaved and cooled before the addition of serum, the final pH being 6.8.

The MSGB media contain per 1000 ml of distilled water: 10 g of peptone and 2 g of D-glucose. The final pH of the media was 7.4. Both of the media

cited above were inoculated with 1 ml of culture inoculum in 9 ml medium. After inoculation, the tubes were kept in water bath shaker at 37 °C for 6 h (Nadeem et al., 2013).

To study the effect of temperature, 1 ml of *C. albicans* was inoculated with 9 ml of MSGB media (pH 7.4) and incubated at temperatures of 34 °C, 37 °C and 40 °C for 6 h (Nadeem et al., 2013).

The influence of pH was observed by inoculating 1 ml of inoculum culture in 9 ml of MSGB media under different pH values: 5.4, 6.4 and 7.4. The incubation was at 37 °C for 6 h (Nadeem et al., 2013).

The medium used to study the effect of glucose and nitrogen on chlamydosporulation, is the same used previously in the test of chlamydo spores detection by adding different concentrations of glucose and (NH₄)₂SO₄ (Table 1). The cell inoculum was obtained according to Sidrin and Rocha (2004). 25 µl of a cell suspension (1 × 10⁴ CFU / ml), originated from a 24 h and 48 h culture, was dropped onto the culture medium surface and covered with a cover slip, to be then incubated for 48 h at 30 °C. Observation was made directly under light microscope, in order to quantify the chlamydo spores. 10 microscopic fields were used to calculate the average value of the number of chlamydo spores per microscope field (Braga de Souza et al., 2010).

Test	1	2	3	4	5	6	7
Glucose (g/l)	20.5	12	12	24.02	3.5	3.5	0
Ammonium sulfate (g/l)	5	0	5.9	3	0.9	5	3

Table 1: The different glucose concentrations and nitrogen used.

2.3. Lactobacillus isolates and their antagonistic effect against C. albicans

A total of 23 *Lactobacillus* isolates (LAB) were isolated from the vaginas of healthy women of 18 to 45 years old. All were premenopausal and were not menstruating at the time of collection. The isolates were cultured on MRS agar under anaerobic conditions at 37 °C for 48 h.

The presumptive colonies were examined, through Gram-staining technique and catalase test. Other identification tests were effectuated to determine lactobacilli species (data not shown). The colonies were preserved in MRS glycerol at 30% and were also grown in MRS agar tubes for further studies (Liliana, 2006).

For antagonistic effect of vaginal LAB against *C. al-*

bicans, an overlay method adapted from Fleming et al. (1985) was used. Overnight cultures of the LAB isolates were spotted onto surface of MRS agar plates and incubated for 48 h at 37 °C under anaerobic conditions to allow the colonies to develop. A layer of 5 ml of sabouraud broth with 0.75% agar containing 1 ml of the yeast overnight culture was poured over the spotted MRS agar. The plates were aerobically incubated at 37 °C for 24 h, and checked for inhibition zones.

3. Results and Discussion

3.1. Diagnosis and characterization of C.albicans

The isolation of the causative germ on SDA-C medium showed whitish, creamy and smooth colonies (Figure 1). Under light microscope the formation of chlamydo spore and mycelium was observed (Figure 2).

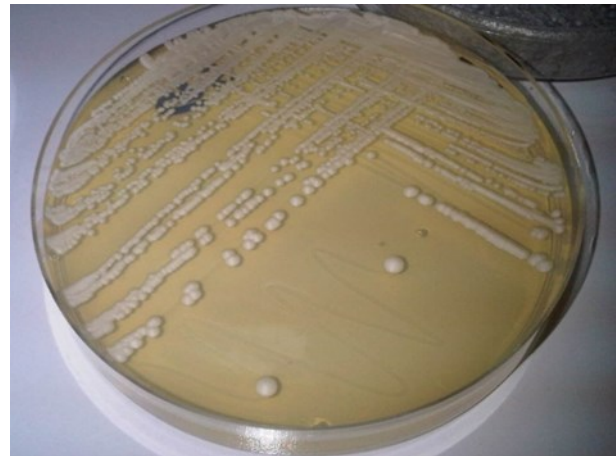


Figure 1: Macroscopic appearance of *Candida* streaked onto medium (SDA-C).

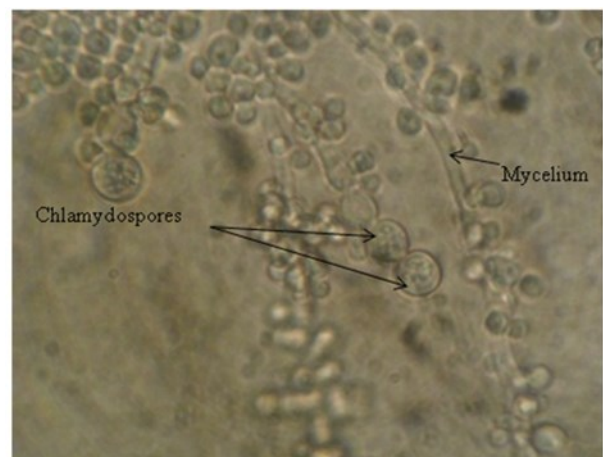


Figure 2: Observation of *Candida* Chlamydo spores under a microscope. Magnification: 63X

The results of all tests performed on the *Candida* isolate (morphology of colonies, microscopic fresh state, Gram stain, germ tubes test, chlamydo sporulation test, Tween 80 agar, growth at 45 °C and car-

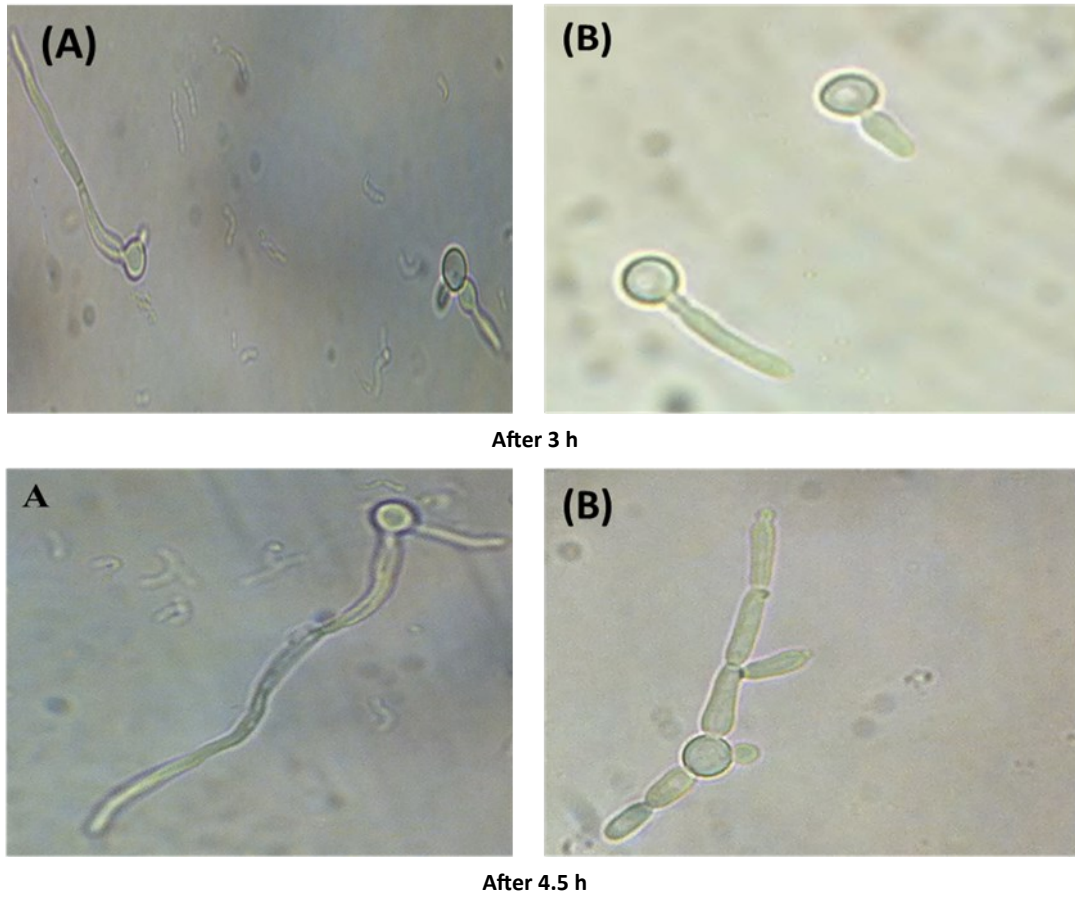


Figure 3: Formation of germ tube in *C. albicans* in (A) horse serum and (B) MSGB. Magnification: 40X

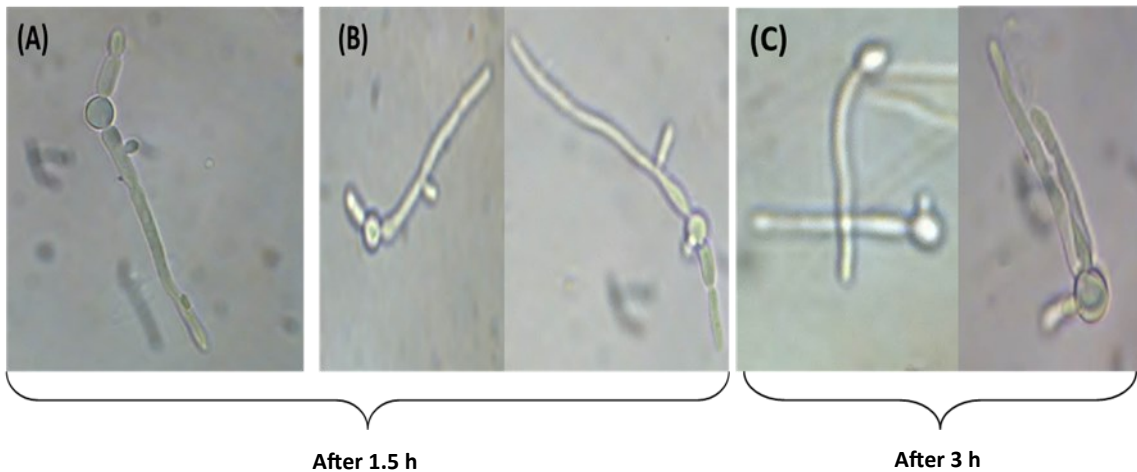


Figure 4: Formation of germ tube in MSGB at 34 °C (A), at 37 °C (B) and at 40 °C (C). Magnification: 40X

bohydrate assimilation test with the gallery API 20 C AUX), have allowed us to infer that our isolate belongs to *C. albicans*.

3.2. Influence of some parameters on the morphogenesis of *C. albicans*

The germ tube formation of *C. albicans* was observed in the MSGB and horse serum after 3 h of incubation at 37 °C. After 4.5 h an elongation and

an increase in the number of filaments have been observed in serum, unlike MSGB where we observed much more pseudo mycelia (Figure 3). After 6 h we noticed a decrease in the number of germ tubes in the MSGB and a weak decrease in serum medium. According to Nadeem et al. (2013) after 4.5 h of incubation, the increase of filamentation in horse serum and MSGB is about 52% and 40%, respectively, while the percentage of cells forming germ tubes decreases progressively from 7.5 h to

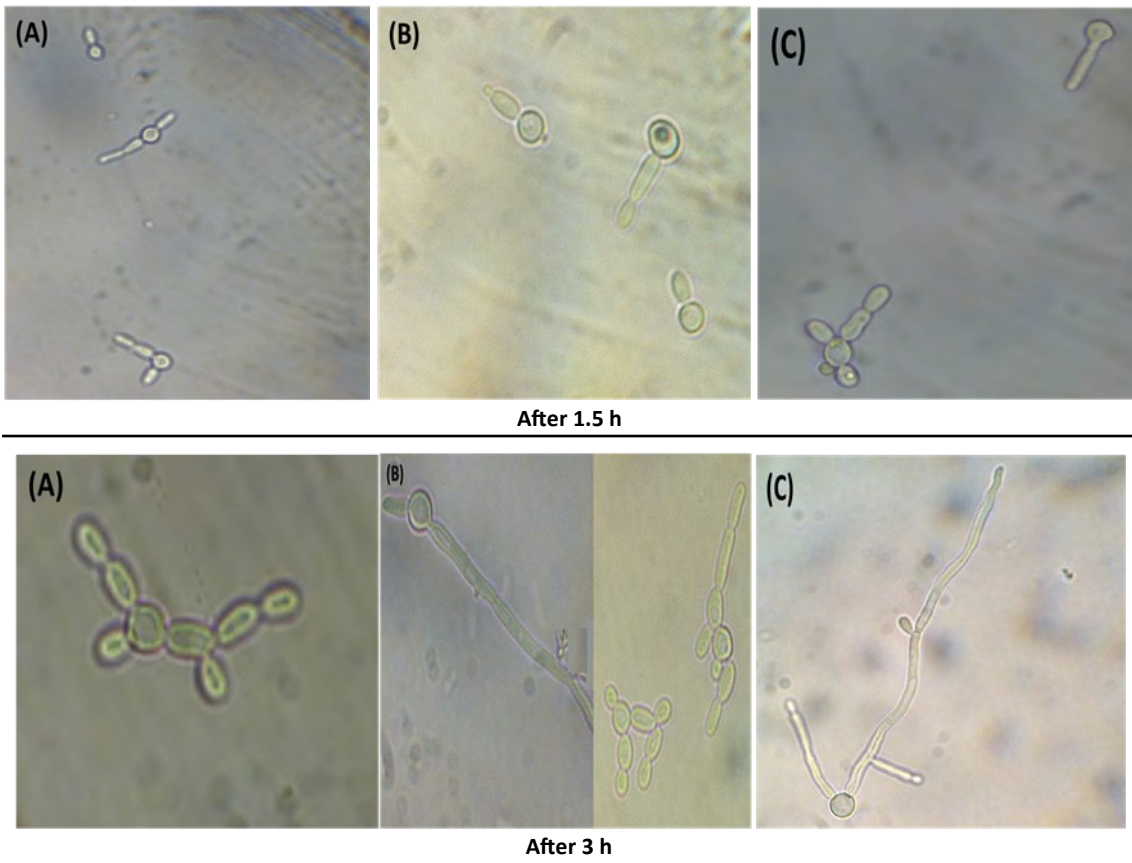


Figure 5: Formation of germ tube of *C. albicans* in MSGB under (A) pH 5.4, (B) pH 6.4 and (C) pH 7.4. Magnification: 40X

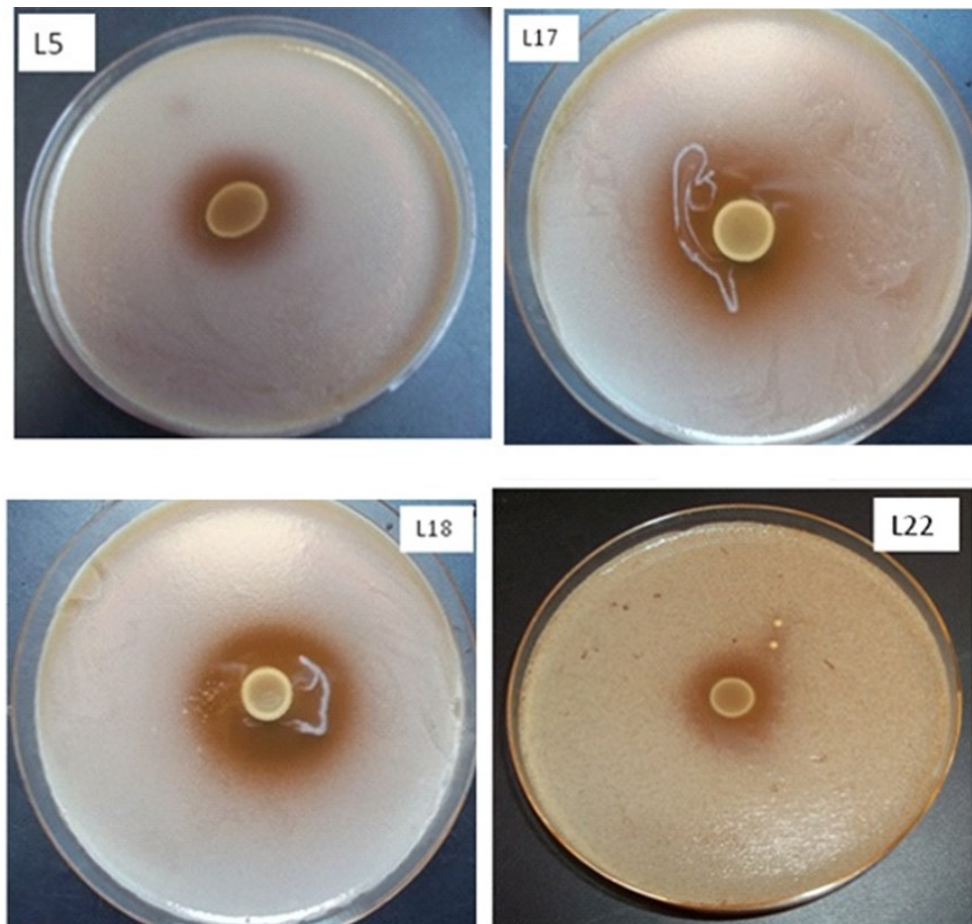


Figure 6: Positive antagonistic effect of *Lactobacillus* isolates against *C. albicans*

10.5 h and 7 h to 11 h of incubation in horse serum and MSGB respectively.

In the stationary phase, *C. albicans* cells are repressed by glucose. Inhibition of germ tube formation was also indicated when this element is available. The glucose effect was absent in starving cells that were derived from similar cells in stationary phase. In addition, these cells require glucose to form germ tubes, suggesting that it was the exhaustion of energy reserves that was the main key factor of the "machinery of glucose repression" during starvation (Paranjape and Datta, 1991).

Horse serum, with its natural ingredients of hemin, hormones and other constituents, appeared to be necessary for germ tubes formation and hence increased pathogenicity for most *C. albicans* strains (Clemons et al., 2004). However, MSGB medium, which only contains 0.2% glucose, stimulates the formation of mycelium. As previously shown by some investigators, this can be due to the lower concentration of glucose (Paranjape and Datta, 1991; Johnson et al., 2005).

Temperatures of 34 °C, 37 °C & 40 °C were used to detect the germ tube formation in *C. albicans* keeping the pH of the medium at 7.4. We observed a formation of germ tube after 1.5 h in the temperature of 40 °C, formation of hyphae after 3 h of incubation in the temperatures 34 °C and 37 °C, this filamentation was slightly high in 37 °C then at 34 °C (Figure 4). After 6 h an increased number of germ tubes were observed at 37 °C, a slight decrease at 40 °C and high decreased at 34 °C. According to Nadeem et al. (2013) no filamentation was seen at 34 °C after 1.5 h while 14% of filamentation was formed after 4.5 h. At 37 °C, 42% of germ tube formation was observed after 4.5 h while at 40 °C a 28% of germ tube formation was after 1.5 h and a peak of filamentation (about 36%) was seen after 4.5 h. Hyphae are readily induced from unbudded yeast cells by a growth temperature of 37 °C, confirming that it was optimal for filamentation.

Kabli, (2007) indicates that the human body temperature promotes filamentation and therefore the pathogenicity of *C. albicans*. Consistent with these findings, it has been reported that 37 °C is optimal for germ tube formation in *C. albicans* and its adherence to host cells (Westwater et al., 2005).

Different pH values, i.e., 5.4, 6.4 and 7.4 were used to study germ tube formation in *C. albicans* keeping the temperature constant at 37 °C (Figure 5). After

1.5 h incubation we observed budding yeast and the formation of germ tube and pseudohyphae at different pH. After 3 h we observed the formation of pseudo-mycelia at pH 5.4. At pH 7.4 a mixture of true mycelium and pseudohyphae was shown.

The same results were obtained at pH 6.4 but moderately less than those at pH 7.4. After 6 h we noticed that the number of germ tubes increases at pH 7.4, decreases slightly at pH 6.4. At pH 5.4 a lowering of the number of budding cells was obtained unlike the two previous pHs. Nadeem et al. (2013) suggested that budding yeast and pseudohyphae cells with low filamentation under pH 5.4, a short cell elongation of yeast at pH 6.4. The peak of germ tube formation was seen at pH 7.4 and about 40% cells form germ tubes after 4.5 h of culture inoculation. It is well established that a pH around neutrality promotes the development of hyphae of *C. albicans in vitro*, while a low pH (< 6.5) blocks the formation of hyphae and stimulates the growth of the yeast form (Buffo et al., 1984). Other work by Kabli, (2007) indicates that the change of pH from acidity to neutrality promotes the growth of yeast, better than the changing from neutrality to alkalinity.

The effect of glucose and nitrogen on chlamydo- sporulation, was studied in 10 microscopic fields, the results allowed us to observe only mycelia in certain concentrations of the medium with a total absence of chlamydo spores in all fields (Table 2). We find in literature the affirmation that chlamydo- spores are refractile, thick-walled cells that are produced at low temperatures, under nutrient poor and oxygen limited conditions (Kumar et al., 2006). The glucose content inhibited *C. albicans* chlamydo- sporulation two times more than ammonium sul- phate. The negative influences of glucose in chla- mydo spore production have been described since

Test	Glucose (g/l)	Ammoni- um sulfate (g/l)	Forma- tion of mycelium	Chlamydo- spores number
1	20.5	5	-	0
2	12	0	+	0
3	12	5.9	-	0
4	24.02	3	-	0
5	3.5	0.9	++	0
6	3.5	5	+	0
7	0	3	+++	0

Table 2: Effect of varying concentrations of glucose and nitrogen on the formation of the mycelium and chlamydo- spores by *C. albicans*.

+: Presence of mycelium; -: Absence of mycelium

1970 (Jansons and Nickerson, 1970). However, it was the first study that quantified chlamydo spores, using an experimental design and surface response methodology.

The presence of glucose inhibits the formation of chlamydo spores, while the levels of nitrogen have no major influence (Dujardin et al., 1980a). When glucose and (NH₄)₂SO₄ were added together, it seems that one of the components C or N should be in low concentration for good sporulation. Chlamydo spores are considered as cell dormant forms, but because they quickly lose their viability, they do not seem to allow survival for a long-term (Raudonis and Smith, 1982). Further Dujardin et al. (1980b) indicated that, light inhibits chlamydo spores formation.

3.3. Antagonistic effect of vaginal Lactobacillus against C.albicans

All lactobacilli isolates tested in the present study were Gram positive rods or coccobacilli, no sporulated and catalase negative. The results of *in vitro* antagonism carried out by the method of double layers on *C .albicans*, using 23 isolates of LAB showed an antagonistic power. Different inhibition zones, varied between (25.67 ± 0.58 mm and 13 ± 0.00 mm) were obtained (Table 3, Figure 6). Rousseau (2004) gets similar results that we have obtained. The researcher indicates that vaginal LAB had the ability to inhibit *C. albicans*. Therefore LAB, as candidates for vaginal probiotics, is usually tested *in vitro* for their antimicrobial activity towards *C. albicans*. According to several authors lactic acid and H₂O₂ productions, may be mainly responsible for inhibitory activity (McGroarty et al., 1992). However, lactic acid is produced by all the LAB. It is therefore not sufficiently discriminating to differen-

tiate between strains. The hydrogen peroxide is in turn produced by certain LAB which is characteristic of a healthy vaginal flora and in the presence of oxygen (Rousseau, 2004).

4. Conclusion

In this study, we were able to find the causative agent of vaginal infection in a patient taking of broad-spectrum antibiotics. After being solicited by a gynecologist to rediagnosis this infection in woman previously subjected to a treatment for 10 years with gentamycin and lincomycin successively. The infection showed like a yeast vaginitis symptom. The germ was isolated and belonged to *C. albicans* by phenotypic tests. Horse serum medium favors during 6 h germ tube formation in *C. albicans* more than MSGB medium. The use of different temperatures indicates that the most remarkable effect was at 37 °C witch was optimal for filamentation. While, at different pH used the formation of germ tubes was increased only at pH 7.4.

We also concluded that different concentrations of glucose were found to have an important effect on the production of chlamydo spores and mycelia, contrary to the nitrogen which does not have clear effects. The investigation of antagonistic power showed that all isolates of vaginal LAB had an inhibitory effect against *C .albicans*, with a maximal zone of 25.67 ± 0.58 mm, obtained by the isolate L17.

References

Bhavan PS, Rajkumar R, Radhakrishnan S, Seenivasan C, Kannan S (2010) Culture and Identification of *Candida albicans* from Vaginal Ulcer and Separation of Enolase on SDS-PAGE. International Journal of Biology 2: 84-93.

Braga de Souza JV, Talhari C, Reinel D, Talhari S (2010) Utilization of experimental design and surface response methodology to study the influence of glucose and ammonium sulphate in the chlamydo sporulation of *Candida albicans* FMT123-05. Journal of Yeast and Fungal Research 1: 30-34.

Buffo J, Herman MA and Soll DR (1984) Characterization of pH regulated dimorphism in *Candida albicans*. Mycopathologia 85: 21-30.

Calderone RA (2002) *Candida* and candidiasis. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Clemons KV, Spearow JL, Espiritu M, Stervens DA (2004) Genetic susceptibility of mice to *Candida albicans*. Vaginitis correlates with host estrogen sensitivity. Infection and Immunity 72:4878-4880.

Dujardin L, Walbaum S, Biguet J (1980a) Influence de la concentration du glucose et de l'azote sur la morphologie de *Candida albicans* et la formation de ses chlamydo spores dans un milieu de culture synthétique. Mycopathologia 71: 113 -118.

Lactobacilli isolates	Diameter	Lactobacilli isolates	Diameter
L1	15 ± 0.00	L16	19 ± 1.73
L3	24 ± 1.73	L17	25.67 ± 0.58
L4	18.33 ± 1.53	L18	21.33± 1.15
L5	16.33 ± 1.15	L19p	18 ± 1.73
L6	23.33 ± 1.53	L19g	25 ± 0.00
L7	24 ± 0.00	L20	24.33 ± 1.15
L10	24.33 ± 1.15	L21	23 ± 0.00
L12	22.67 ± 0.58	L22	13 ± 0.00
L13	21.33 ± 1.15	L23-1	21.67 ± 2.89
L14t	22 ± 1.73	L23-2	21 ± 1.00
L14b	21.67 ± 0.58	L24	21.67 ± 2.89
L15	24 ± 0.00		

Table 3: inhibition zones in mm ± standard deviation produced by Lactobacillus strains against C.albicans.

- Dujardin L, Walbaum S, Biguet J (1980b) Chlamydosporulation de *Candida albicans*: déroulement de la morphogenèse, influence de la lumière et de la densité d'ensemencement. *Annals of Microbiology* 131A :141-149.
- Fleming HP, Etchells JL, Costilow RL (1985) Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Journal of Applied Microbiology* 30: 1040-1042.
- Jansons VK, ET Nickerson WJ (1970) Induction, morphogenesis, and germination of the chlamydo-spores of *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* 104: 910-921.
- Johnson D, Cano K, Kroger E, McNabb D (2005) Novel regulatory function for CCAAT-binding factor in *Candida albicans*. *Eukaryotic cell* 4: 1662- 1676.
- Kabli SA (2007) Optimal conditions for induction of mycelial formation by *Candida albicans* (ATCC10231). *Bull. Fac. Sci. Alex. Univ* 45: 1-9.
- Kumar CPG, Menon T, Prabu D, Nandhakumar B (2006) Chlamydo-sporulation of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* on mustard agar. *Mycoses* 50: 71–73.
- Liliana M, Pascual, Mari´a, B. Daniele, Cristina Pa´jaro, Lucila Barberis (2006). *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance, *Contraception* 73, 78– 81.
- Martinez RC, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Nunes AC, Moreira JL, et al (2008) Analysis of vaginal lactobacilli from healthy and infected Brazilian women. *Applied Environmental Microbiology* 74: 4539–4542.
- McGroarty JA, Tomczek L, Pond DG, et al (1992) Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species: correlation with susceptibility to the spermicidal compound nonoxynol-9. *Journal of Infectious Diseases* 165:1142–1144
- Nadeem, SG, Shafiq A, Hakim ST, Anjum Y, Kazm SU (2013) Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. *Open Journal of Medical Microbiology* 3: 185-192.
- Osset J, Garcia E, Bartolome RM, Andreu A (2001) Role of *Lactobacillus* as protector against vaginal candidiasis. *Medicina Clinica (Barc)* 117: 285–298.
- Paranijape V, Data A (1991) Role of nutritional status of the cell in pH regulated dimorphism of *Candida albicans* *FEMS Microbiology Letters* 80:333-336.
- Pinjon E, Sullivan D, Salkin L, Shanley D, Coleman D (1998) Simple, inexpensive, reliable method for differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology* 36:2093-95.
- Raudonis BM, Smith AG (1982) Germination of the chlamydo-spores of *Candida albicans*. *Mycopathologia* 78: 87-91.
- Rousseau Virginie (2004) Evaluation d'oligosaccharide son effet prébiotique vis-a-vis de la microflore vaginale. Thèse de doctorat en Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries. L'institut national de sciences appliquées de Toulouse.
- Saville SP, Lazzell AL, Monteagudo C, Lopez-Ribot JL (2003) Engineered Control of Cell Morphology *in Vivo* Reveals Distinct Roles for Yeast and Filamentous Forms of *C. albicans* during Infection, *Eukaryotic Cell* 2: 1053-1060.
- Schulze J, Sonnenborn U (2009) Yeast in the Gut: From commensals to Infectious Agents, *Deutsches Arzteblatt* 106: 837-842.
- Sidrin JCC, Rocha MFG (2004) *Micologia Médica à luz de autores contemporâneos*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 1-123.
- Slifkin M (2000) Tween 80 opacity test responses of various *Candida* species. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4626-8.
- Sobel JD (2007) Vulvovaginal candidosis, *The Lancet* 369: 1961–1971.
- Spinillo A, Capuzzo E, Acciano S, De Santolo A, Zara F (1999) Effect of antibiotic use on the prevalence of symptomatic vulvovaginal candidiasis. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 180: 14–7.
- Valore EV, Park CH, Igrati SL, Ganz T (2002) Antimicrobial components of vaginal fluid. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 187: 561-568.
- Westwater C, Balish E, Schofield DA (2005) *Candida albicans*, conditioned medium protects yeast cells from oxidative stress: a possible link between quorum sensing and oxidative stress resistance. *Eukaryotic cell* 4:1654-1661.
- Yang YL (2003) Virulence factors of *Candida albicans* species. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 36: 223-228.

Probiotic properties of some vaginal lactobacilli isolated from healthy women

Abstract:

Lactobacillus species, that are commonly present in the human vagina, have received considerable attention due to their probiotic properties and their protective effects against infections. The purpose of the present study was to assess *in vitro* the ability of 23 vaginal lactobacilli isolated from healthy women to protect the vagina. The antimicrobial activities and production of lactic acid, hydrogen peroxide (H₂O₂) and bacteriocin, were estimated. Nine of lactobacilli isolates exerted a broad spectrum of antimicrobial activity. The all were able to create an acidic environment and only three were able to produce H₂O₂. The supernatants activity of six isolates, raised the question for a possible production of bacteriocin-like or low molecular microbicides. The findings of the present study encourage to candidate the studied lactobacilli as probiotics. Further researches are needed for their application in prophylaxis of vaginal disorders.

Key words: Vaginal lactobacilli, Probiotic, Antimicrobial activities, lactic acid, H₂O₂, Bacteriocin.

Diagnostic d'une vaginite chronique : Caractérisation de *Candida albicans* et étude *in vitro* de l'effet antagoniste des *Lactobacillus* vaginaux

Résumé :

L'utilisation à long terme des antibiotiques, dans le traitement des infections vaginales peut conduire à la prolifération de la levure du genre *Candida*. Cette étude est une contribution pour résoudre un problème réel qui n'a pas été pris en charge d'une façon convenable d'une femme atteinte d'une vaginite chronique. Pendant dix ans, la patiente a été soumise à un traitement aux antibiotiques tels que la gentamicine et la lincomycine. Suite à l'examen d'un gynécologue, cette infection a montré des symptômes semblables à une vaginite à levure. Par conséquent après isolement, le germe a été identifié par une étude phénotypique à l'espèce *Candida albicans*. Notre étude a été suivie par un examen des effets du pH, de la température et des milieux de croissance sur la morphogenèse de *C. albicans* diagnostiqué. Les résultats ont montré que la valeur de pH 7,4, la température de 37° C et le milieu sabouraud non additionné de glucose sont des conditions optimales pour la filamentation de la levure identifiée. L'étude de l'effet antagoniste de 23 lactobacilles vaginaux isolés des femmes saines contre *C. albicans* a montré des effets inhibiteurs avec une zone d'inhibition maximale de $25,67 \pm 0,58$ mm obtenus par l'isolats L17.

Mots clés : Antibiotiques ; Vaginite Chronique ; *C. albicans*; Morphogenèse ; Pathogenèse; *Lactobacillus*.

Study of Some Healthy Women Vaginal Lactobacilli: Probiotic Properties and Susceptibility to Detergents and Antibiotics

Abstract

Lactobacillus species, that are commonly present in the human vagina, have received considerable attention due to their probiotic properties and their protective effects against infections. The purpose of the present study was to assess *in vitro* the ability of 23 vaginal lactobacilli isolated from healthy women to protect the vagina.

The antimicrobial activities and production of lactic acid, hydrogen peroxide (H₂O₂), bacteriocin and biofilm formation, were estimated. The effect of 3 commercial douche products and 8 antibiotics, was analysed.

Nine of lactobacilli isolates exerted a broad spectrum of antimicrobial activity. The all were able to create an acidic environment and only three were able to produce H₂O₂. The supernatants activity of six isolates without the putative effects of lactic acid and H₂O₂, raised the question for a possible production of bacteriocin-like or low molecular microbicides peptides. Only four isolates showed biofilm formation with an adhesion score equal to 3. The 3 antiseptic-containing douche products showed a strong inhibitory effect with MIC (Minimal Inhibitory Concentration) ranging from 1.5 to 0.09%. The nine selected lactobacilli were sensitive to: Tetracycline, Erythromycin, Penicillin G, Clindamycin and Chloramphenicol, but they were resistant to Metronidazole, Vancomycin and kanamycin.

The findings of the present study encourage to candidate the studied lactobacilli as probiotics. Further researches are needed for their application in prophylaxis of vaginal disorders.

Key words: Vaginal Lactobacilli, Antimicrobial Activity, Lactic Acid, H₂O₂, Bacteriocin, Antibiotics, Detergents.