

République Algérienne Démocratique et Populaire

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

BERROKIA Khadidja

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : Microbiologie Appliquée

THÈME

Effet des lactobacilles vaginaux (*L.reteuri* et *L.salivarius*) sur les germes causant des infections génitales chez la femme et leur pouvoir de produire l'acide lactique et la détection de bactériocine.

Soutenue publiquement le 26/08/2020

DEVANT LE JURY

Président	Mr. DJIBAOUI Rachid	Professeur	U. Mostaganem
Encadreur	M ^{lle} BECHELAGHEM Nadia	MAB	ESA. Mostaganem
Examineur	Mr. ARABI Abed	MCB	U. Oum El Bouaghi

Année universitaire : 2019-2020

Dédicaces

De tout mon cœur, je dédie ce travail à :

A l'homme qui me donne la volenté d'apprendre et de savoir. Vraiment les mots me manquent, les mots tellement me manquent je n'arrive pas à exprimer ma profonde gratitude, tu as consenti énormément de sacrifices pour nous. Nous sommes conscients, nous sommes convaincus de tous

Mon Abi "ALLAH" te garde pour nous.

A ma mère la plus aimée ; qui veille sur nous jour et nuit depuis notre enfance, qui nous a donnée l'amour et nous appris le respect. La femme qui a souffert et qui a donné sa jeunesse pour nous, qui prie pour je sois une femme exceptionnelle. Tu es la reine de mon cœur... Merci Maman qu'ALLAH te bénisse, JE T'AIME.

A la tante exemplaire FATIMA pour sa disponibilité.

A la joie de notre maison, ma lune AHMED SEDIK ABEDERAHMAN.

A mes adorables sœurs Chifaa, Batoule et Yousra «je suis fière de vous ».

A toutes mes familles BERROKIA et BENAÏSSA sans oublier chère Rania.

*J'ai une particulière pour mes défunts grands parents Ahmed, Djilali et Keira
"رحمهم الله".*

*A mes enseignants de l'école de primaire jusqu'à l'université sans oublier 'NAIMIE
GHENEME' "رحمه الله"*

Ainsi que tous mes amies Rania, Fatima, Sonia, Lolwa, Mimi.

*A tous ceux qui ont une relation de près ou de loin dans la réalisation du présent
travail je leur resterai reconnaissante à tous jamais*

Khadija

Remerciements

J'exprime tout d'abord mes profonds remerciements à Allah qui m'a donné la force, la santé, la patience pour passer tous les moments difficiles, et qui m'a permis d'achever ce travail pour pouvoir le mettre devant vous aujourd'hui.

Ce travail n'aurait certainement jamais vu le jour sans l'aide, le soutien de certaines personnes que je tiens vivement à remercier :

Tous d'abord, je remercie mon encadreur Dr.BECHELACHEM Nadia qui a voulu d'ériger ce travail, aussi pour sa très bonne accueil, sa large disponibilité, ses conseils et ses encouragements. Grace aussi à sa bonne direction de ce travail dans les moments les plus difficiles.

Je remercie par ailleurs vivement les membres du jury de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Mr.Djibaoui d'avoir accepté de présider ce jury et Mr.Arabi d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Aussi je tiens à remercier tous mes enseignants pendant mon cycle universitaire pour leurs efforts et leurs conseils tous le long de cette formation.

Je remercie particulièrement Mr.DJIBAOU et Mme BENAMA pour leurs grands efforts et tous qu'ils ont fourni pour nous.

Un très grand merci à mes parents pour leurs soutiens et leurs encouragements.

Enfin, Je remercie toutes les personnes qui m'ont conseillé lors de la rédaction de ce mémoire : mes familles, mes ami(e)s, tous mes collègues de la promotion

« Mester2 » LMD 2020

ملخص

لا تزال الالتهابات المهبلية قبل سن اليأس، مثل الالتهاب البكتيري والهوائي والتهاب المهبل الفطري، مشكلة صحية عند النساء مثيرة للاهتمام. يشمل علاج هذه الالتهابات أنواع مختلفة من المضادات الحيوية، ورغم ذلك لا يزال معدل تكرارها مرتفعا، مما يجب أيضا أخذ بعين الاعتبار عدم قدرة هذه المضادات على الحفاظ على الفلورا الطبيعية المتميزة بوفرة بكتيريا حمض اللاكتيك المهبلية (*Lactobacilles vaginaux*). القيد الرئيسي هو عدم القدرة على تقديم حاجز دفاعي طويل الأمد، مما يؤدي إلى تسهيل الانتكاسات والتكرارات.

كان الهدف الأساسي من هذه الدراسة هو فحص الخصائص المضادة للميكروبات لبكتيريا حمض اللاكتيك المهبلية والكشف عن انتاجها لحمض اللاكتيك و البكتيريوسين من أجل تقديمها كبروبيوتيك أو بوستيبيوتيك محتملة للوقاية من الالتهابات المهبلية أو علاجها.

في الجزء التجريبي تم عرض اعمال علمية مختلفة، أجرى الباحثون في هذه الاعمال اختبارات حول: النشاط المضاد للميكروبات، الكشف عن انتاج حمض اللاكتيك والبكتيريوسين من طرف عزلات *lactobacilles vaginaux*. تم اجراء اختبار التضاد على الميكروبات الاتية المسببة للالتهابات المهبلية: *Escherichia coli*, *Candida albicans* و *Candida glabrata* و *Gardnerella vaginalis* بطريقة الطبقات المزدوجة، كما تم تقدير انتاج حمض اللاكتيك بطريقتين مختلفتين (معايرة الحموضة والكروماتوغرافيا الغازية). ايضا تم اجراء كشف وتوصيف بكتيريوسين واختبار نشاطه المضاد للميكروبات الممرضة التالية *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*.

تشير النتائج الى ان جميع بكتيريا حمض اللاكتيك المهبلية المدروسة لها تأثير مثبط على جميع الميكروبات المعنية المسببة للأمراض التناسلية، تظهر النتائج ايضا ان جميع عزلات *lactobacilles* التي تم اختبارها تنتج حمض اللاكتيك بكميات متفاوتة. كما توضح النتائج كذلك ان عزلات *lactobacilles vaginaux* يمكن ان تنتج بكتيريوسين له تأثير على الميكروبات الأكثر سببا في اختلاق الامراض التناسلية.

في السنوات الأخيرة، تلقى استخدام البروبيوتيك بما في ذلك انواع الجنس *Lactobacillus* الكثير من الاهتمام. هناك القليل من الدراسات حول النوعين *Lactobacillus salivarius* و *Lactobacillus reuteri* من اصل مهبل و استخدامهما كعامل بروبيوتيك أو مستقلباته (بوستيبيوتيك) للوقاية من الاضطرابات المهبلية او علاجها مما يفتح افاق التركيز على هذا الموضوع المهم للصحة العامة.

الكلمات الدالة: نشاط مضاد للميكروبات، *Lactobacilles vaginaux*, *Lactobacillus salivarius*,

Lactobacillus reuteri، حمض اللاكتيك، بكتيريوسين، التهابات مهبلية.

Résumé

Chez les femmes préménopausées, les infections vaginales, telles que la vaginose bactérienne, la vaginite aérobie et la vaginite à levures, restent un problème de santé important. Le traitement de ces infections implique différents types d'antibiotiques; cependant, le taux de récurrence reste élevé et il faut également souligner que les antibiotiques sont incapables de restaurer spontanément une flore normale caractérisée par une communauté abondante de lactobacilles. La principale limitation est l'incapacité à offrir une barrière défensive à long terme, facilitant ainsi les rechutes et les récurrences.

L'objectif principal de cette étude était d'examiner les propriétés antimicrobiennes des lactobacilles vaginaux et la détection de leur production d'acide lactique et de bactériocine afin de les proposer comme probiotiques ou postbiotiques potentiels pour prévenir ou traiter les infections vaginales.

Dans la partie expérimentale : différents travaux scientifiques ont été présentés. Dans ces travaux, les chercheurs ont réalisé des tests d'activité antimicrobienne et de détection de la production d'acide lactique et de bactériocine par les isolats des lactobacilles vaginaux. L'activité antagoniste contre différents agents pathogènes causant des infections génitales ; *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* et *Gardnerella vaginalis*, ont été réalisées par méthode de double gélose. La production d'acide lactique a été estimée par deux méthodes différentes (acidité titrable et chromatographie en phase gazeuse). La détection et la caractérisation d'une bactériocine et de son activité antimicrobienne contre les pathogènes *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Candida albicans*, ont également été réalisées.

Les résultats suggèrent que tous les lactobacilles vaginaux testés ont un effet inhibiteur contre les agents pathogènes génitaux concernés. Les résultats montrent également que tous les lactobacilles vaginaux testés produisent de l'acide lactique avec des quantités variées. Les résultats indiquent aussi que les lactobacilles vaginaux peuvent produire une bactériocine avec une activité antimicrobienne contre les pathogènes génitaux les plus répons.

Au cours des dernières années, l'utilisation de probiotiques, y compris les espèces de *Lactobacillus*, a reçu beaucoup d'attention. Il existe peu d'études sur *Lactobacillus salivarius* et *Lactobacillus reuteri* d'origine vaginale et leur utilisation comme probiotique ou ses métabolites «postbiotiques» pour prévenir ou traiter les troubles vaginaux ce qui ouvrent la perspective de se concentrer sur ce sujet important pour la santé publique.

Mots clés : Lactobacilles vaginaux, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, activité antimicrobienne, acide lactique, bactériocine, infections vaginales.

Abstract

In premenopausal women, vaginal infections, such as bacterial vaginosis, aerobic vaginitis and yeast vaginitis remain an important health problem. Treatment of these infections involves different kind of antibiotics; however, the recurrence rate remains high, and it must be also underlined that antibiotics are unable to spontaneously restore normal flora characterized by an abundant community of lactobacilli. The main limitation is the inability to offer a long-term defensive barrier, thus facilitating relapses and recurrences.

The main goal of this study was to review the antimicrobial properties of vaginal lactobacilli and detection of their production of lactic acid and bacteriocin to provide them as potential probiotic or postbiotic for preventing or treating vaginal infections.

In the experimental part: different scientific works were presented. In these works, the researchers carried out tests for antimicrobial activity and detection of lactic acid and bacteriocin production by vaginal lactobacilli isolates. The antagonistic activity against different urogenital pathogens; *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Gardnerella vaginalis*, was carried out by overly method. The production of lactic acid was estimated by two different methods (titratable acidity and gas chromatography). The detection and characterization of a bacteriocin and its antimicrobial activity against genital pathogens *Gardnerella vaginalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*, were also realized.

The results suggest that all tested vaginal lactobacilli have an inhibitory effect against the relevant urogenital pathogens. The results show also that all tested vaginal lactobacilli produce lactic acid with varying amounts. The results indicate that vaginal lactobacilli can produce bacteriocin with antimicrobial activity against relevant genital pathogens.

In the last years, the use of probiotics, including *Lactobacillus* species, has received much attention. There are few studies about *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus reuteri* from human vagina and their use as probiotic or its metabolites “postbiotic” to prevent or treat vaginal disorders that which open the perspective to focus this important subject for public health.

Key words: Vaginal lactobacilli, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri*, antimicrobial activity, lactic acid, bacteriocin, vaginal infections.

Table des Matières

Table des Matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Partie bibliographique

Premier chapitre

Introduction aux lactobacilles vaginaux

I/Tractus génital féminin.....	3
I.1/Le vagin.....	3
II/L'écossystème vaginal.....	4
III/Les lactobacilles vaginaux.....	6

Deuxième chapitre

Les principales infections génitales chez la femme

I/Introduction.....	8
II/Mécanisme des infections.....	8
III/Les infections vaginales.....	9
III.1/ La vaginose bactérienne.....	9
III.1.1/Diagnostic bactérien.....	9
III.2/ La vaginite aérobie.....	11
III.3/ La vaginite à levure.....	12
III.3.1/Diagnostic mycologique.....	13

Troisième chapitre
Le rôle préventif et curatif des lactobacilles
vaginaux

I/Introduction.....	15
II/Utilisation des probiotiques pour traiter et prévenir les infections vaginales.....	16
III/Production d'acide lactique	16
III.1/L'acide lactique comme produit antimicrobien majeur	17
III.2/Administration intravaginale de l'acide lactique	18
IV/Production de bactériocine	19
V/Propriétés probiotiques de <i>Lactobacillus salivarius</i>	20
VI/Propriétés probiotiques de <i>Lactobacillus reuteri</i>	21

Partie expérimentale

L'origine des lactobacilles et des germes infectieux.....	23
Protocole expérimentale A (selon Pirje Hütt <i>et al.</i> (2016)).....	24
Matériel et méthodes.....	24
I/Les participants et prélèvement des échantillons.....	24
II/Souches bactériennes et levures.....	24
II.1/Souches de <i>Lactobacillus</i>	24
II.2/Micro-organismes opportunistes.....	24
III/Détection de la production d'acide lactique.....	25
IV/Détection de l'activité antagoniste.....	25
IV.1/Activité antagoniste des lactobacilles contre les pathogènes urogénitales	25
IV.2/Activité antagoniste des lactobacilles contre <i>Candida</i> spp.....	26
VI.3/Activité antagoniste des lactobacilles contre les souches de <i>G. vaginalis</i>	26
V/Analyses statistiques.....	27
Résultats et discussion.....	28
Protocole expérimentale B (selon Gaspar <i>et al.</i> (2018)).....	30
Matériel et méthodes.....	30
I/Les souches microbiennes.....	30
II/Détection de bactériocine.....	31

III/Production de bactériocine.....	31
IV/Préparation d'extraits de bactériocine.....	32
V/Électrophorèse.....	32
VI/L'activité antimicrobienne.....	33
Résultats et discussion.....	33
Protocole expérimentale C (selon Er <i>et al.</i> (2019)).....	37
Matériel et méthodes.....	37
I/Isolement des bactéries.....	37
II/Identification génotypique des bactéries avec l'analyse de la séquence d'ARNr 16s.....	37
III/ Production d'acide lactique.....	38
Résultats et discussion.....	38
Conclusion.....	39
Références bibliographiques.....	42
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau 1 : les micro-organismes prédominants tout au long du cycle de vie des femmes.....	5
Tableau 2 : les espèces des lactobacilles vaginaux les plus répondus chez les femmes en bonne santé.....	7
Tableau 3 : Score de Nugent.....	10
Tableau 4 : Bactériocines de <i>Lactobacillus</i>	19
Tableau 5 : Activité antimicrobienne des isolats de lactobacilles vaginaux contre les souches urogénitales d' <i>E. Coli</i> déterminée par la méthode de double gélose.....	29
Tableau 6 : Souches bactériennes et fongiques utilisées dans cette étude.....	30
Tableau 7 : Spectre d'inhibition de la bactériocine antimicrobienne produite par <i>LaKS400</i> contre la souche indicatrice et les microorganismes pathogènes.....	36

Liste des figures

Figure 1 : l'appareil génitale féminin.....	3
Figure 2 : l'épithélium vaginal.....	4
Figure 3 : l'aspect macroscopique de différentes colonies des lactobacilles sur gélose MRS..	6
Figure 4 : observation de différentes formes des cellules de <i>Lactobacillus</i> sous microscope...	6
Figure 5 : Frottis vaginal avec présence de « clue cells ».....	10
Figure 6 : Frottis vaginal après coloration de Gram avec présence de levure du genre <i>Candida</i>	12
Figure 7 : Levures et mycélium observés par examen direct d'un prélèvement vaginal.....	13
Figure 8 : Culture de <i>C. albicans</i> sur milieu de Sabouraud-chloramphénicol.....	14
Figure 9 : Mycéliums et Chlamydozoaires de <i>C.albicans</i> observés sous microscope (630x).	14
Figure 10 : l'effet eubiotique des espèces de <i>Lactobacillus</i> dans le milieu vaginal.....	15
Figure 11 : Équilibre entre la forme protonée et non protonée de l'acide lactique.....	17
Figure 12 : Propriétés probiotiques de <i>L.reuteri</i>	21
Figure 13 : Activité anti- <i>Candida</i> des lactobacilles vaginaux.....	29
Figure 14 : Activité antimicrobienne de la bactériocine produite par <i>LaKS400</i> contre <i>L.delbrueckii</i> ATCC9649.....	34
Figure 15 : a Fermentation discontinue de la souche <i>La KS400</i> dans MRSB à pH non contrôlé à 37° C. b Activité antimicrobienne de la souche <i>La KS400</i> pendant la fermentation.....	35
Figure 16 : La détection directe de l'activité antimicrobienne de la bactériocine de <i>La KS400</i>	36

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

A: Adénine

G: Guanine

C: Cytosine

T: Thymine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CO₂ : Dioxyde de carbone

Da, kDa: Dalton, kilodalton

ddH₂O : Eau distillée double

g : gramme

mg : milligramme

h : heure

H₂ : Dihydrogène

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

HP : Haute pression

L : Litre

L: *Lactobacillus*

L'eau milli-Q : (marque déposée par la société Millipore Corporation) est une eau purifiée

m : mètre

cm : centimètre

mm : millimètre

µm : micromètre

nm : nanomètre

M, mM : Molaire, millimolaire

mA : milliampère

min : minute

ml : millilitre

µl : microlitre

n° : numéro

°C : Degré Celsius

% : Pourcentage

N₂ : Azote

NaCl : Chlorure de sodium

Pb : paire de bases

PBS : Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase chain reaction

pH : Potentiel d'hydrogène

DO : Densité Optique

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

sp: espèce inconnue

ssp: sous-espèce

tr :tour / min

u/µl : Unités par microlitre

UFC : Unité formant colonie

UI : Unité Internationale

v/v : Volume par volume

Introduction

L'eubiose vaginale est caractérisée par la présence de microbiote bénéfique produisant de l'acide lactique provenant principalement du genre *Lactobacillus*. *Lactobacillus*, naturellement ou administrés sous forme de probiotiques, peuvent établir une eubiose vaginale en tuant les microbes dysbiotiques et de nombreux types d'agents pathogènes avec de l'acide lactique. Ils peuvent également libérer d'autres facteurs antimicrobiens tels que les bactériocines (**Aroutcheva et al., 2001 ; Selle et Klaenhammer, 2013**).

Des études récentes démontrent que l'acide lactique est un facteur antimicrobien majeur produit par les lactobacilles (**O'Hanlon et al., 2011; Gong et al., 2014**). **Gil et al. (2010)** ont rapporté que *L. salivarius* était le plus grand producteur d'acide lactique. De nombreux articles ont également énuméré les avantages de *L. reuteri* en tant que probiotique (**Indrio et al., 2008; Spinler et al., 2008; Hou et al., 2015**).

Les bactériocines sont un groupe structurellement diversifié de peptides antimicrobiens de synthèse ribosomique qui présentent une activité antimicrobienne contre différentes bactéries. Leurs activités peuvent être à spectre étroit ou à large spectre, capables de cibler des bactéries au sein de la même espèce ou à travers les genres, respectivement (**Cotter et al., 2005**). *L. reuteri* a produit une bactériocine active à la fois de manière bactéricide et bactériolytique contre les cellules sensibles (**Kawai et al., 2001**). En outre, la production de bactériocines par *L. salivarius* a également été rapportée (**Barrett et al., 2007 ; Strahinic et al., 2007 ; Busarcevic et al., 2008**).

Les altérations de la composition microbienne de l'écosystème vaginal sont liées à plusieurs effets néfastes sur la santé tels que la vaginose bactérienne, la vaginite aérobie et la vaginite à levures. Les antibiotiques sont généralement prescrits pour traiter la vaginose bactérienne, alors que la vaginite aérobie nécessite fréquemment un traitement local combiné avec: un antibiotique (composant infectieux); stéroïdes (composant inflammatoire); et / ou des œstrogènes (composant d'atrophie). Le traitement antimicrobien n'est généralement pas totalement efficace en raison de bactéries résistantes aux antibiotiques ou en cas de réinfection (**Menard, 2011; Eade et al., 2012**). La prise d'antibiotiques à large spectre peut également éradiquer la flore vaginale normale, permettant une prolifération de levures (**Spinillo et al., 1999**). La majorité des cas de vaginite à levures qui se caractérisent par des écoulements blancs, des démangeaisons locales et une irritation sont causés par *C. albicans* (**Sobel, 2007**).

Le traitement antimicrobien étant souvent partiellement efficace et les antibiotiques pouvant également provoquer des effets secondaires, les recherches sur des approches alternatives ou complémentaires représentent une priorité médicale. Même s'il existe différentes études démontrant une amélioration significative du traitement des infections vaginales bactériennes avec des probiotiques par rapport aux traitements traditionnels, les résultats sont souvent spécifiques à la souche bactérienne, ce qui suggère que seules certaines bactéries probiotiques semblent avoir des effets contre des infections vaginales définies (**Menard, 2011**).

L'utilisation de l'acide lactique, qui peut être considéré comme un métabolite «postbiotique» avec des propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices favorables, présente une approche alternative qui contourne les défis de stabilité réglementaire et de colonisation présentés par les probiotiques (**Tachedjian et al., 2017**).

En outre, les bactériocines ont attiré l'attention en tant que substituts potentiels aux antibiotiques pour guérir et / ou prévenir les infections bactériennes (**Aguilar-Uscanga et al., 2013**).

L'objectif principal de ce travail consiste à évaluer l'effet des lactobacilles vaginaux généralement et spécifiquement *L.reteri* et *L.salivarius* sur les germes causant des infections génitales chez la femme . Ainsi que le pouvoir de ces deux espèces à produire l'acide lactique et la bactériocine.

Ce travail est structuré en deux parties. La première partie est consacrée à une synthèse bibliographique mettant l'accent sur trois chapitres. Le **premier chapitre** c'est une introduction aux lactobacilles vaginaux. Le **deuxième** chapitre comprend les principales infections génitales chez la femme. Enfin le **troisième chapitre** montre le rôle préventif et curatif de ces bactéries amicales.

La partie pratique est exposée par des travaux expérimentaux réalisés par des chercheurs où nous présentons le matériel, les méthodes et les résultats pour chaque expérience étudiée.

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

Partie

Bibliographique

Premier chapitre

***Introduction aux lactobacilles
vaginaux***

I/Tractus génital féminin

L'appareil génital féminin est composé de deux secteurs microbiologiques. Le premier secteur (comporte la vulve, le vagin, et l'exocol) est largement colonisé par les flores commensales. Inversement, le second secteur (composé de l'endocol, la cavité utérine, la cavité tubaire et le pelvi-péritoine) est stérile (**figure 1**). Ces deux secteurs sont séparés par le col de l'utérus qui peut être considéré comme un véritable « verrou » microbiologique très efficace contre l'ascension des bactéries cervico-vaginales (**Quentin, 2006**).

I.1/Le vagin

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

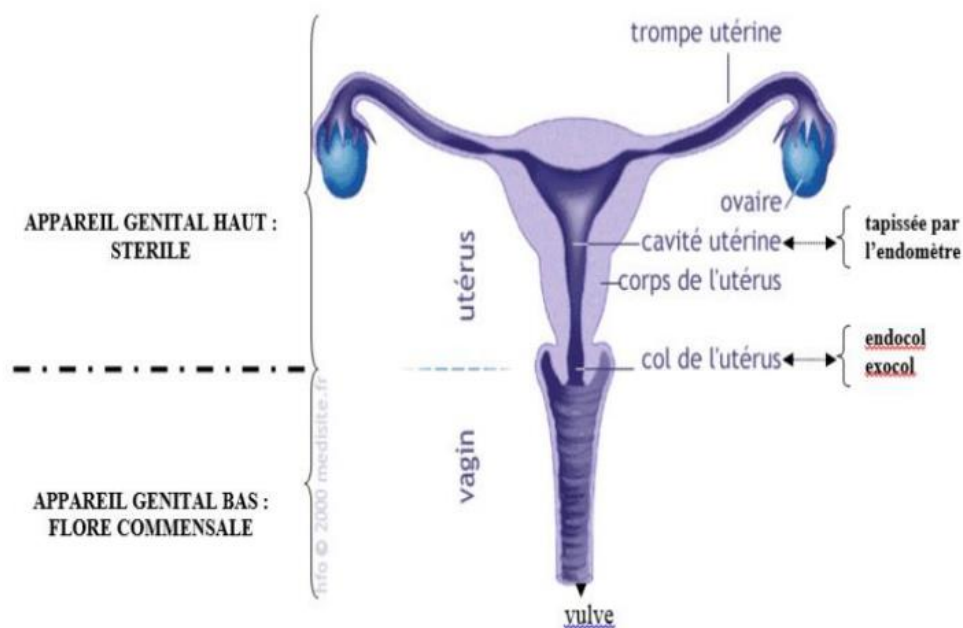


Figure 1 : l'appareil génital féminin

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

II/L'écosystème vaginal

À la naissance, le vagin de la fillette est stérile. En raison de la teneur élevée en glycogène des cellules épithéliales vaginales néonatales, avec le glycogène dérivé de la mère à la naissance, le vagin du nourrisson est colonisé par des lactobacilles migrant de la mère. Cela est conforme au fait généralement reconnu que la flore bactérienne normale chez l'homme provient de la mère (**Forsum et al., 2005**).

La microflore vaginale de la fillette devient entrecoupée de contributions de staphylocoques à coagulase négative, de streptocoques, de *Escherichia coli* et d'autres bactéries intestinales. Il reste cependant de petites quantités de lactobacilles et l'œstrogène produit à la ménarche entraînera un épaississement de la muqueuse vaginale (**figure 2**), une augmentation de la production de glycogène (**Wilks et Tabaqchali, 1987**) et peut-être l'œstrogénisation et l'expression de nouveaux récepteurs, une condition préalable à la propagation des lactobacilles, la microflore vaginale dominante de la femelle adulte (**Redondo-Lopez et al., 1990**).

Les bactéries isolées des sécrétions vaginales des femmes en âge de procréer se situent autour de 10^7 ou 10^8 UFC / g de fluide (**Redondo-Lopez et al., 1990**). Cette composition de microflore se poursuit jusqu'à la ménopause, quand elle est remplacée par une flore mixte semblable à celle de la femelle infantile, mais avec une partie considérable d'espèces de *Mycoplasma* et de petites quantités de bactéries anaérobies (y compris *Gardnerella vaginalis*). Une hormonothérapie substitutive, lorsqu'elle est utilisée, fera en sorte que les lactobacilles continueront d'être la microflore dominante (**Forsum et al., 2005**).

Bien que chez les femmes en bonne santé, le microbiote vaginal possède une diversité relativement faible, il convient de considérer que ses schémas peuvent subir des modifications tout au long du cycle de vie de la femme et du cycle menstruel (**Chen et al., 2017**)(tableau 1).

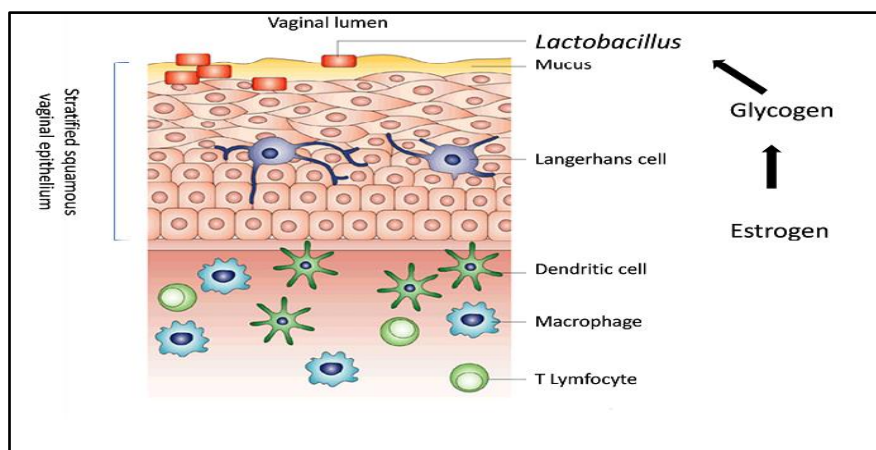


Figure 2: l'épithélium vaginal (**Stone, 2002**).

Tableau 1 : les micro-organismes prédominants tout au long du cycle de vie des femmes

Cycle de vie de la femme	Microorganismes prédominants	Références
Enfance	Bactéries anaérobies à Gram négatif, telles que <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Veillonella</i> . Bactéries anaérobies à Gram positif, telles que <i>Actinomyces</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Peptococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> et <i>Propionibacterium</i> . Bactéries aérobies, telles que <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus viridans</i> et <i>Enterococcus faecalis</i>	(Dei et al., 2010 ; Ran et Mladenovi, 2012)
Prépubère	Faible abondance de <i>Lactobacillus</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> et <i>Prevotella bivia</i>	(Ran et Mladenovi, 2012)
Puberté	Espèces prédominantes sont <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus iners</i> et <i>Lactobacillus jensenii</i>	(Yamamoto et al., 2009)
Adulte	Semblable à la puberté, <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus iners</i> et <i>Lactobacillus jensenii</i>	(Yamamoto et al., 2009)
Ménopause	Espèces prédominantes sont <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus iners</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Prevotella</i> et une moindre abondance de <i>Candida</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i> et <i>Gemella</i>	(Al- Baghdadi et Ewies, 2009)

Un écosystème vaginal sain se caractérise par un épithélium vaginal intact et une microflore dominée par les lactobacilles. *Lactobacillus* spp, représentent plus de 95% de toutes les bactéries présentes (**Spiegel et al., 1980 ; Eschenbach, 1993**). La composition de l'écosystème vaginal n'est pas statique mais change au cours du temps et en réponse aux influences endogènes et exogènes (**Priestley et al., 1997; Schwebke et al., 1999; Eschenbach et al., 2000; Eschenbach et al., 2001**). Les variables comprennent le stade du cycle menstruel, la grossesse, l'utilisation d'agents contraceptifs, la fréquence des rapports sexuels, les douches vaginales et l'utilisation d'antibiotiques ou d'autres médicaments ayant des activités immunitaires ou endocriniennes. L'exposition à un milieu modifié entraînera une fluctuation de l'environnement local et augmentera ou diminuera l'avantage sélectif de microbes vaginaux spécifiques. Par exemple, la perte de lactobacilles dans le vagin a été associée à l'utilisation d'antibiotiques pour les maladies non vaginales (**Eschenbach et al., 2000**).

III/Les lactobacilles vaginaux:

Les lactobacilles sont des micro-organismes nécessitant une croissance dans des milieux riches. Sur milieu MRS (**figure 3**), la plupart d'entre eux présentent de petites colonies rondes et de couleur blanche à crème (**Dasari et al., 2014**). Les cellules des lactobacilles sont à coloration de Gram positive (**figure 4**), non sporulées, peuvent se présenter sous forme de bâtonnets ou de coccobacilles (**Dasari et al., 2014**). Ils sont strictement fermentaires, aérotolérants ou anaérobies. Ils sont catalase négative, même si une activité pseudocatalase peut être présente chez certaines espèces (**Hammes et Vlog, 1995 ; Felis et Dellaglio, 2007**).

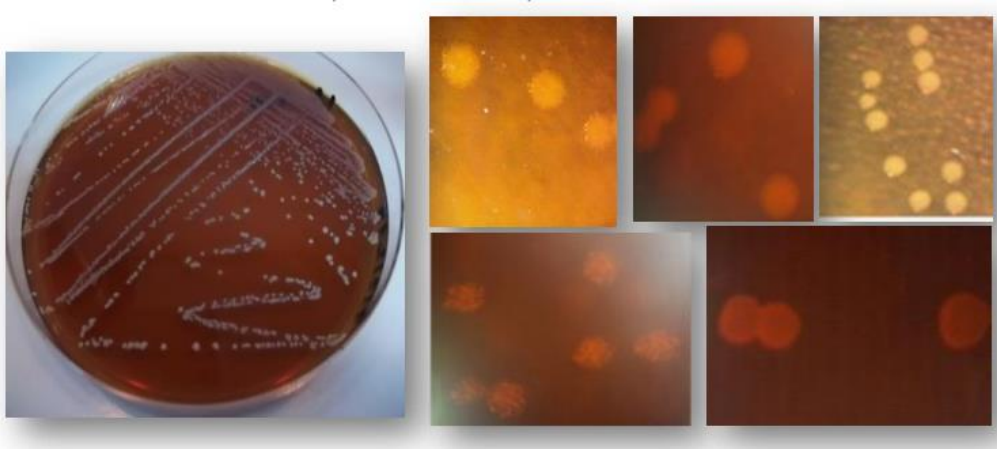


Figure 3 : l'aspect macroscopique de différentes colonies des lactobacilles sur gélose MRS (**Bechelaghem, 2017**).

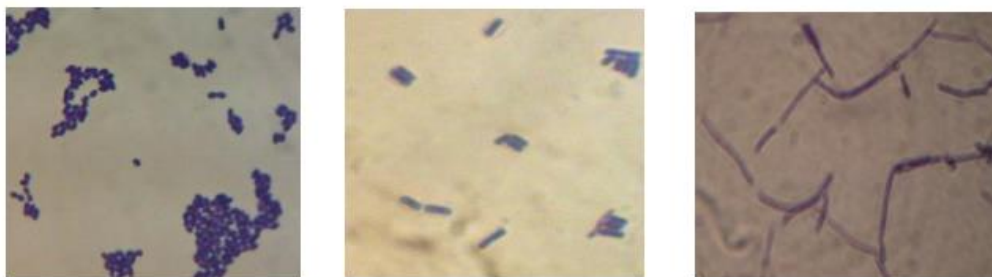


Figure 4 : observation microscopique de différentes formes des cellules de *Lactobacillus*.
Grossissement : x1000 (**Bechelaghem, 2017**).

Depuis la première description des lactobacilles par **Döderlein (1894)**, il a été largement admis que les lactobacilles normalement présents dans le vagin protègent contre la prolifération de microflore indigène potentiellement pathogène et d'agents pathogènes exogènes. Les lactobacilles utilisent des produits de dégradation du glycogène pour produire

de l'acide lactique. Cette acidification du vagin à un pH de 3,0 à 4,5 entraîne une inhibition de la croissance de ces agents pathogènes (Alakomi *et al.*, 2000 ; O'Hanlon *et al.*, 2013).

Les lactobacilles se lient à la surface des cellules épithéliales vaginales et entre en compétition avec d'autres micro-organismes pour les empêcher de se fixer à ces cellules et de les infecter. Ils libèrent également des composants solubles qui les empêchent de s'associer à la membrane des cellules épithéliales (Boris et Barbes *et al.*, 2000).

Les lactobacilles produisent aussi de composés appelés bactériocines, qui tuent les microorganismes pathogènes (Mendes-Soares *et al.*, 2014 ; Ojala *et al.*, 2014)

La pathogénie de la vaginose bactérienne est pensée pour inclure l'élimination ou la réduction de l'activité antibactérienne exprimée par lactobacilles vaginale indigène (Skarin et Sylwan, 1986 ; Redondo-Lopez *et al.*, 1990). Les lactobacilles inhibent la croissance *in vitro* des organismes associés à la vaginose bactérienne, y compris les espèces de *Gardnerella*, *Mobiluncus*, *Peptostreptococcus* et *Bacteroides* (Skarin et Sylwan, 1986 ; Redondo-Lopez *et al.*, 1990). De même, la vaginite à *Candida* consécutive à une antibiothérapie systémique a été attribuée à la perte de la population vaginale protectrice de lactobacilles. Plusieurs espèces différentes de *Lactobacillus* se trouvent dans le vagin (tableau 2).

Tableau 2: les espèces des lactobacilles vaginaux les plus répandus chez les femmes en bonne santé

Espèces	Des études montrent que les deux premières espèces de lactobacilles vaginaux sont les plus répandues
<i>L. acidophilus</i> <i>L. crispatus</i>	Zhou <i>et al.</i> , 2010; Forney <i>et al.</i> , 2010; Srinivasan <i>et al.</i> , 2010; Ravel <i>et al.</i> , 2011; Martin <i>et al.</i> , 2012; Jespers <i>et al.</i> , 2012; Lee <i>et al.</i> , 2013; Macklaim <i>et al.</i> , 2013 ; Drell <i>et al.</i> , 2013; Madhivanan <i>et al.</i> , 2014
<i>L. coleohominis</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. iners</i>	Ravel <i>et al.</i> , 2011 ; Zhou <i>et al.</i> , 2010; Forney <i>et al.</i> , 2010; Martin <i>et al.</i> , 2012; Smith <i>et al.</i> , 2012; Datcu <i>et al.</i> , 2013; Lee <i>et al.</i> , 2013; Macklaim <i>et al.</i> , 2013; Drell <i>et al.</i> , 2013 ; Srinivasan <i>et al.</i> , 2010; Madhivanan <i>et al.</i> , 2014
<i>L. jensenii</i> <i>L. johnsonii</i> <i>L. mucosae</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. ruminis</i> <i>L. salivarius</i> <i>L. vaginalis</i>	Jespers <i>et al.</i> , 2012

Deuxième chapitre

***Les principales infections
génitales chez la femme***

I/Introduction

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

- hormonales 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/Mécanisme des infections

Le mécanisme des infections vaginales peut s'expliquer par une cascade de changements de population. Les facteurs cités précédemment induisent en parallèle une augmentation du pH et une diminution des lactobacilles, laissant alors à la plupart des pathogènes la possibilité de se développer (**Pybus et Onderdonk, 1999**). En effet, le pH est un bon indicateur de l'équilibre ou du déséquilibre de la microflore :

- en absence d'infection, le pH est voisin de 4 sauf en période de menstruation où il augmente ;
- dans les cas infectieux de vaginose bactérienne, vaginite aérobie et de vaginite parasitaire (due à *Trichomonas vaginalis*), le pH est supérieur à 4,5 ;
- dans le cas infectieux de vaginite à levure, le pH est inférieur à 4 (**Lepargneur et Rousseau, 2002**). Parmi toutes ces infections vaginales, les plus courantes sont la vaginose bactérienne, vaginite aérobie et vaginite à levure.

III/Les infections vaginales

III.1/ La vaginose bactérienne

La vaginose bactérienne est une maladie très répandue chez les femmes du monde entier. Il se caractérise par un écoulement blanc-gris et homogène (contenant des cellules épithéliales exfoliées et, fixées à leurs surfaces, des bactéries polymorphes à Gram variable), ainsi qu'un pH $\geq 4,5$ avec un processus non inflammatoire au niveau de l'épithélium. Ce trouble est associé à de graves changements dans la composition du microbiote vaginal, tels que la diminution de *Lactobacillus* et la colonisation par des micro-organismes anaérobies, principalement *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Atopobium vaginae*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mycoplasma hominis*, *Sneathia*, *Leptotrichia.*, *Mobiluncus spp* (Donders et al., 2017 ; Kaambo et al., 2018). Ces bactéries pathogènes peuvent être retrouvées en faibles quantités dans la flore vaginale à l'état normal, en tant que commensales et en l'absence d'infection (Marie, 2018).

Dans ce trouble, un biofilm résistant aux antibiotiques se forme généralement sur les cellules épithéliales vaginales (dénommées "clue cells"), ce qui augmente la persistance et la récurrence de l'infection (Di Paola et al., 2017).

III.1.1/Diagnostic bactérien

A partir d'un prélèvement vaginal réalisé en consultation ou au laboratoire, un étalement sur lame est réalisé. L'examen microscopique après coloration de Gram visualise la disparition de la flore normale donc des lactobacilles, et le polymicrobisme avec la présence de bactéries de morphologies variées et la présence de « clue cells » caractéristiques (cellules épithéliales recouvertes de petits bacilles de type *Mobiluncus* adhérents à la membrane cellulaire) (figure 5). Les polynucléaires sont donc absents ce qui signifie qu'il y a peu ou pas d'inflammation, ce qui permet d'orienter le diagnostic (Bohbot et Lepargneur, 2012). L'examen au microscope du frottis vaginal après coloration de Gram permet l'établissement du score de Nugent qui, s'il est situé entre 7 et 10, évoque une vaginose bactérienne (tableau 3) (Nugent et al., 1991).

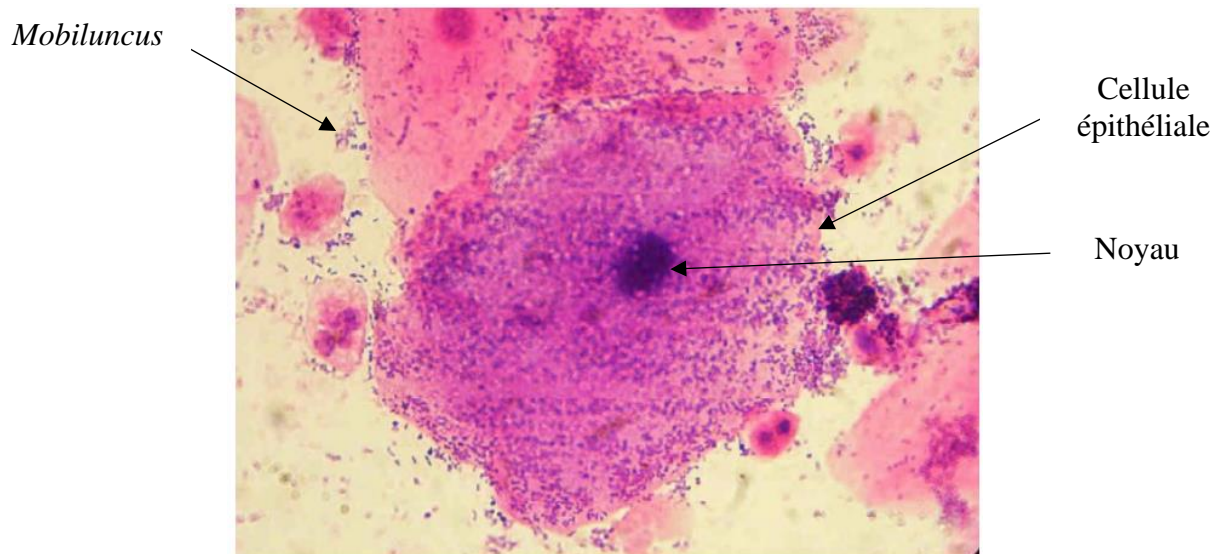


Figure 5 : Frottis vaginal avec présence de « clue cells ». Grossissement : x1000
 (http://disciplines.acmontpellier.fr/biotechnologies/sites/sti3/files/styles/media_gallery_large/public/images/08frottisvaginalcluecellx100.jpg?itok=o6Ta41GX)

Tableau 3: Score de Nugent

Score	Morphotypes de <i>Lactobacillus</i>	Morphotypes de <i>Gardnerella</i> et <i>Bacteroides spp.</i>	Bâtonnet incurvé à Gram variable
0	4+	0	0
1	3+	1+	1+ ou 2+
2	2+	2+	3+ ou 4+
3	1+	3+	
4	0	4+	

0=absence 1+ = < un morphotype présent 2+ = un à quatre morphotypes présents
 3+ = cinq à trente morphotypes présents 4+ = > trente morphotypes présents

On réalise un test d'amines qui lors de la vaginose bactérienne est positif. Ce qui se caractérise par une odeur de poisson avarié après mise en contact des pertes vaginales avec de l'hydroxyde de potasse KOH à 10% (sniff-test). La mauvaise odeur vaginale est due à la production par certaines bactéries anaérobies d'amines aromatiques (cadavérine, putrescine, triméthylamine) à partir de l'arginine (Bohbot et Lepargneur, 2012).

Suite à la diminution du nombre de lactobacilles, le pH dépasse 4,5 pour atteindre 5 à 6. Cette augmentation entraîne la production d'amines et d'acides gras par les bactéries anaérobies, ce qui accentue l'élévation du pH, et instaure un environnement propice à la multiplication des bactéries associées à la vaginose bactérienne.

En définitive, on retient le diagnostic de vaginose bactérienne quand trois des quatre critères suivants sont présents (critères d' Amsel décrits en 1983) (**Amouri et al., 2010**) :

- pH alcalin supérieur à 4,5 repérable par une bandelette colorimétrique
- leucorrhées grisâtres, abondantes, homogènes, fluides
- test d'amines positif
- présence de « clue cells », au moins 20 % à l'examen microscopique à l'état frais

En pratique, la présence des trois premiers critères, qui s'affranchissent de l'usage du microscope, sont les plus utilisés. Néanmoins, 50 % des vaginoses bactériennes seraient asymptomatiques, le recours à un examen bactériologique s'avère donc utile surtout chez la femme enceinte où la vaginose bactérienne est responsable de complications obstétricales (**Marie, 2018**).

III.2/ La vaginite aérobie

Le trouble vaginal connu sous le nom de vaginite aérobie a été décrit en 2002 comme un besoin de le différencier de la vaginose bactérienne (**Donders et al., 2002; Donders, 2007**). Dans la première condition, la microflore de *Lactobacillus* est perturbée, déclenchant une augmentation du pH (entre 6 et 8) et un écoulement homogène jaune ou jaune-vert est présent. De plus, une augmentation du nombre de cellules intermédiaires et parabasales est observée, indiquant une augmentation du renouvellement et de la desquamation des couches superficielles de cellules épithéliales, qui induisent une inflammation épithéliale.

Comme mentionné précédemment, les espèces de *Lactobacillus* remplissent une fonction indispensable dans le microbiote vaginal en inhibant la croissance des pathogènes urogénitaux. Par conséquent, la diminution ou l'absence de lactobacilles permet la prolifération de micro-organismes aérobies, principalement des streptocoques du groupe B, *S.aureus* et *E.coli* (**Tempera et al., 2006**).

Selon celui rapporté par **Donders *et al.* (2002)** chez les patients atteints de vaginite aérobie, *S.aureus* était l'organisme le plus répandu, suivi par *E.coli*. Fait intéressant, d'autres auteurs **Di Paola *et al.* (2017)** ont rapporté que les streptocoques du groupe B et les entérobactéries sont les espèces les plus fréquentes dans cette condition pathologique. Ces légères différences peuvent dépendre de différents facteurs, tels que l'âge, la race ou les partenaires sexuels (**Leyva-Gómez, 2019**).

III.3/ La vaginite à levure

La vaginite à levures est caractérisée par un écoulement blanc, des démangeaisons locales et une irritation (**Sobel, 2007**). La majorité des cas sont causés par *Candida albicans*, saprophyte exclusif des muqueuses digestives et espèce commensale de la flore vaginale qui devient pathogène au cours d'une prolifération importante favorisée par l'acidification du milieu vaginal. Les autres espèces pathogènes possible sont *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* (**Anonyme 1, 2013**).

Elle est diagnostiquée par la détection microscopique d'un nombre dense de cellules de levure sur un frottis vaginal (**figure 6**), et par un examen physique et la présence d'un écoulement de levure blanc, semblable à du mucus. Il convient de noter que les lactobacilles sont souvent trouvés chez les patients atteints de vaginite à levures, par conséquent, l'induction de l'infection ne semble pas exiger que la levure déplace ou tue les lactobacilles (**Cribby *et al.*, 2008**).

Les levures du genre *Candida* sont des champignons unicellulaires qui se multiplient par bourgeonnement. Elles sont non capsulées et non pigmentées. *C. albicans* produit de vrais filaments mycéliens à la différence des autres espèces de *Candida* qui produisent du pseudo-mycélium (**Delorme et Robert, 1997**).

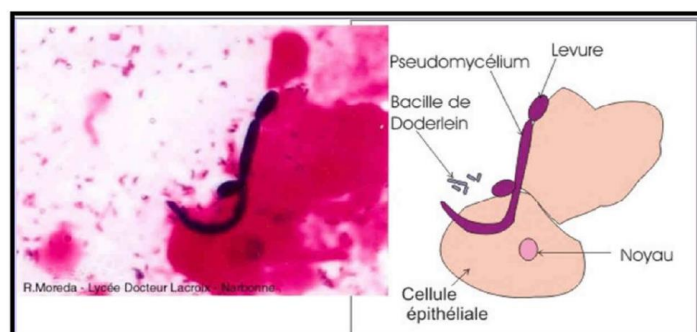


Figure 6 : Frottis vaginal après coloration de Gram avec présence de levure du genre *Candida* (http://disciplines.acmontpellier.fr/biotechnologies/sites/sti3/files/styles/media_gallery_large/public/images/illustrationmycose.jpg?itok=guEHkytW)

III.3.1/Diagnostic mycologique

Un prélèvement vaginal est réalisé à l'aide d'un écouvillon au niveau des parois vaginales et du cul de sac ensuite analysé avec la mesure du pH vaginal qui est acide, inférieur à 3,8. L'examen direct permet une orientation rapide du diagnostic (**figure 7**).



Figure 7: Levures et mycélium observés par examen direct d'un prélèvement vaginal (<http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/candidoses/site/html/images/figure10.jpg>)

Ensemencement sur milieu de Sabouraud, une culture en 24 à 48h et une identification rapide de *C. albicans* avec filamentation et coloration sur milieu de culture chromogène va permettre la détection spécifique de *C. albicans*. Les levures du genre *Candida* croissent sur de nombreux milieux. L'inhibition de la pousse des bactéries est nécessaire pour individualiser les levures. Les cultures sont donc réalisées sur milieu de Sabouraud additionné de chloramphénicol (**figure 8**) ou de gentamicine. Les colonies de levures sont blanc crème. Les champignons de type *Candida* poussent à 37 °C en 48h environ (**Marie, 2018**).

L'examen microscopique révèle des cellules rondes ou ovoïdes, de 2 à 5 μm de diamètre, de bourgeonnement polaire correspondant aux levures et la présence de pseudo mycélium (espèces non-*albicans*) ou de mycélium (espèce *albicans*) (Delorme et Robert, 1997). La présence de filaments oriente vers les espèces capables d'en produire (*C. albicans*) et élimine ainsi *C. glabrata*, incapable de filamenter. La démonstration de la présence de chlamydospores (figure 9) est un bon outil de diagnostic pour faire la distinction entre *C. albicans* et les autres espèces de *Candida* (Al Mosaid et al., 2003).

Les levures sont également visibles sur des frottis colorés au Gram (les levures sont à Gram positif) (Jawetz et al., 1976 ; Chander, 2009).

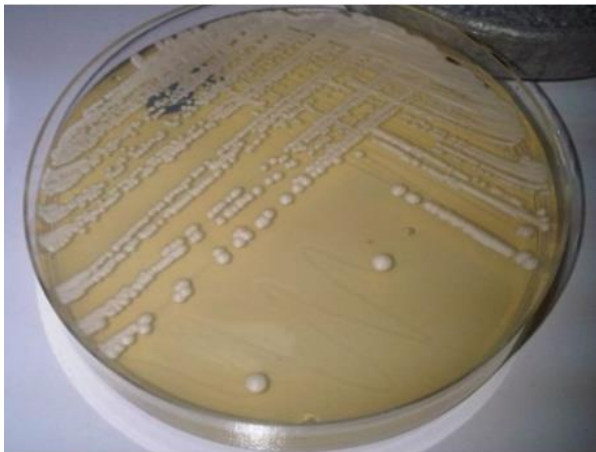


Figure 8 : Culture de *C. albicans* sur milieu de Sabouraud-chloramphénicol (Bechelaghem et al., 2015)



Figure 9 : Mycéliums et Chlamydospores de *C. albicans* observés sous microscope (630x) (Bechelaghem et al., 2015)

Troisième chapitre

***Le rôle préventif et curatif des
lactobacilles vaginaux***

I/Introduction

L'eubiose vaginale est caractérisée par la présence d'un microbiote bénéfique producteur d'acide lactique, principalement du genre *Lactobacillus* (Tachedjian *et al.*, 2017). *Lactobacillus spp.*, naturellement ou administré sous forme de probiotiques «micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité suffisante, exercent un effet physiologique bénéfique sur la santé de l'hôte» (Anonyme 2, 2001 ; Hill *et al.*, 2014) , peut exercer des effets bénéfiques par différents mécanismes (figure 10), comme la production de substances antimicrobiennes (acides organiques, peroxyde d'hydrogène et bactériocines) (Martín et Suárez 2010 ; Mirmonsef *et al.*, 2012 ; Stoyancheva *et al.*, 2014) et biosurfactants (Gudiña *et al.*, 2010), modulation du système immunitaire (Oelschlaeger, 2010 ; Joo *et al.*, 2011 ; De Gregorio *et al.*, 2016) et formation de biofilms (Martín *et al.*, 2008; Leccese Terraf *et al.*, 2012). La capacité de colonisation, y compris l'adhésion aux cellules épithéliales ou aux surfaces muqueuses qui contribuent à l'effet bénéfique à travers le temps, est également l'un des mécanismes suggérés pour les probiotiques (Nader-Macías *et al.*, 2008 ; Bouchard *et al.*, 2015).

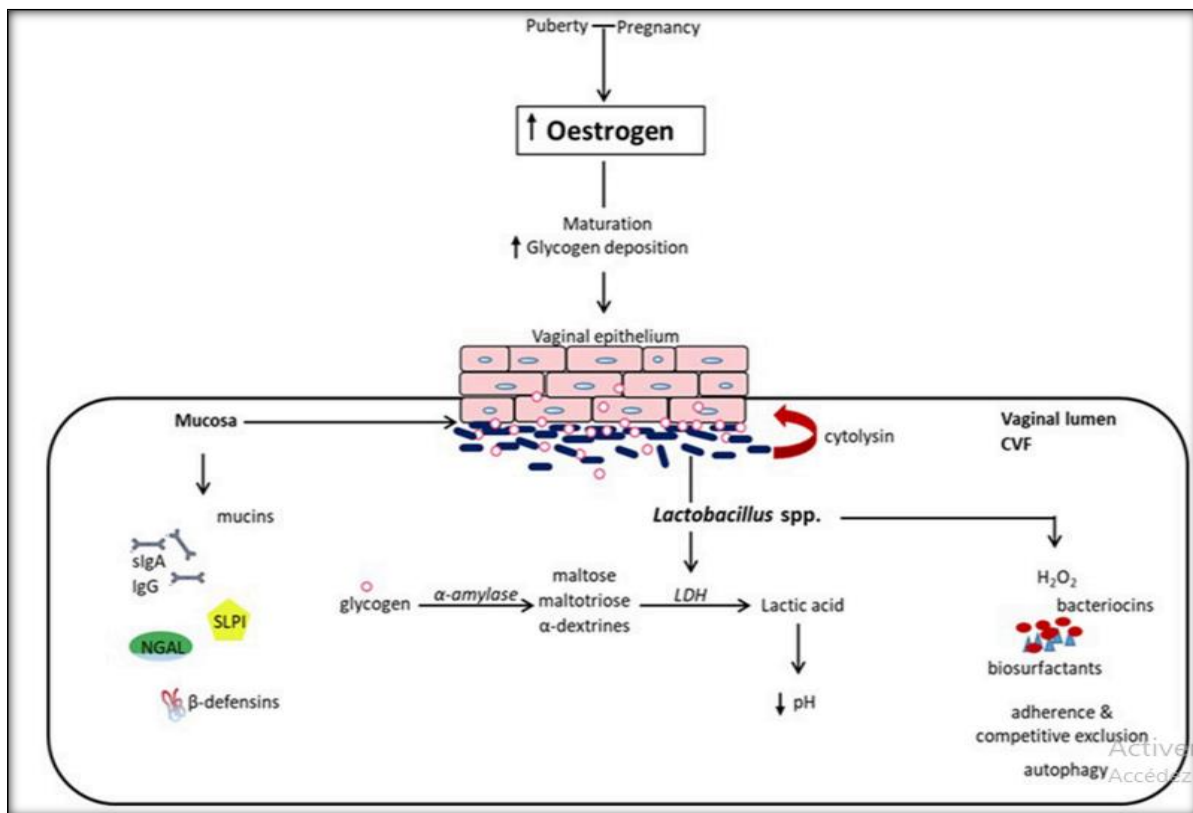


Figure 10: l'effet eubiotique des espèces de *Lactobacillus* dans le milieu vaginal (Amabebe et Anumba, 2018).

II/Utilisation de probiotiques pour traiter et prévenir les infections vaginales

La sélection des probiotiques à base de lactobacilles a été largement centrée sur leurs caractéristiques *in vitro*, y compris la production de facteurs antimicrobiens (bactériocines, H₂O₂,...etc), la capacité à adhérer aux cellules épithéliales vaginales et l'activité antimicrobienne contre les agents pathogènes. Les autres critères souhaitables pour les probiotiques comprennent leur capacité à acidifier fortement le vagin avec de l'acide lactique de manière à avoir des effets positifs sur l'hôte, tels que les activités immunomodulatrices, la capacité de survivre et de concurrencer d'autres bactéries, la co-agrégation et la sensibilité aux antibiotiques, en dehors de ceux utilisés pour traiter la vaginose bactérienne (**MacPhee et al., 2010 ; Santos et al., 2016**).

Les probiotiques contribuent indirectement au traitement de la VB (vaginose bactérienne) et du CVV (candidose vulvo-vaginale), empêchant la récurrence et la contagion des infections (**Falagas et al., 2007**).

Plusieurs souches et espèces de *Lactobacillus* (par exemple *L.rhamnosus* GR-1, *L. reuteri* RC-14, *L.acidophilus*, *L.brevis*, *L.plantarum*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *L.fermentum*) ont été évaluées comme des probiotiques vaginaux (**Senok et al., 2009 ; MacPhee et al., 2010 ; Borges et al., 2014**). Ces probiotiques à base de *Lactobacillus* ont été délivrés directement dans le tractus vaginal par des capsules, des applicateurs et des tampons chargés de lactobacilles lyophilisés ou par voie orale en supposant que le probiotique oral peut être transféré du tractus gastro-intestinal par le rectum vers l'appareil génital bas (**Tachedjian et al., 2017**).

III/Production d'acide lactique :

On a longtemps pensé que les lactobacilles produisaient de l'acide lactique à partir du glycogène, mais le degré de polymérisation en glucose de cette molécule, trop élevé, ne permet pas sa dégradation par les lactobacilles vaginaux dénués de la machinerie enzymatique adéquate. Ce n'est qu'après l'intervention d'une alpha amylase sécrétée par les cellules de l'épithélium vaginal, qui transforme le glycogène principalement en oligosaccharides (maltose, maltotriose, et maltotetraose) (**Spear et al., 2014**), que les lactobacilles peuvent disposer d'une source de carbone. Cependant, à pH 4, l'amylase voit son activité réduite de 52 %, ce qui laisse penser à l'existence complémentaire d'une seconde enzyme (**Spear et al., 2015**) distincte de l'amylase et active à des pH bas (de l'ordre de 4).

Dans le vagin, l'acide lactique est produit à la fois par les cellules épithéliales sous forme de L-acide lactique (Brin, 1965) et par les lactobacilles, qui produisent les deux formes racémiques L et D (Smith *et al.*, 1989 ; Bongaerts *et al.*, 1997 ; McCabe *et al.*, 1998). Les concentrations physiologiques de ces deux formes à pH 4,5 varient de 55 à 110 mM. Lorsque l'écosystème vaginal est sain, l'acide lactique est présent sous sa forme protonique (figure 11) et c'est sous cette forme que l'acide lactique lévogyre est de loin la plus microbicide : elle est bactéricide pour 17 espèces associées à la vaginose (y compris *G.vaginalis* ou *A.vaginae*), pour *Neisseria gonorrhoeae*, *E.coli* (O'Hanlon *et al.*, 2013).

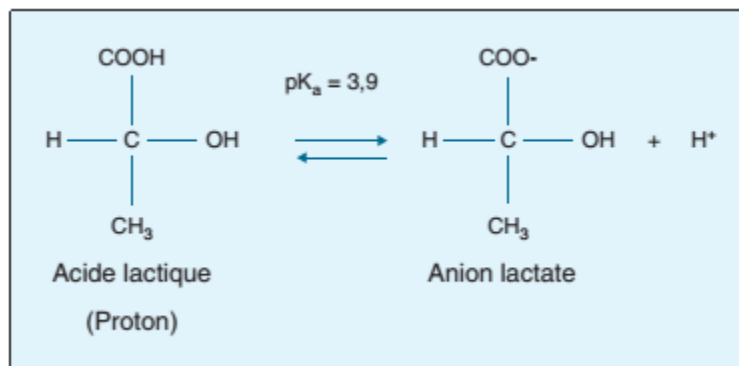


Figure 11 : Équilibre entre la forme protonée (virucide, bactéricide et immunomodulatrice) et non protonée de l'acide lactique (dépourvue de ces propriétés) (Lepargneur, 2016).

III.1/L'acide lactique comme produit antimicrobien majeur

Jusqu'à récemment, l'opinion dominante était que le H_2O_2 est le principal facteur antimicrobien produit par les lactobacilles. Des études antérieures avec H_2O_2 ont été réalisées dans des conditions aérobies malgré des conditions hypoxiques dans le vagin (Klebanoff et Coombs, 1991 ; Klebanoff *et al.*, 1991). Un rôle antimicrobien dominant pour H_2O_2 manque de plausibilité en raison de plusieurs résultats récents. Dans les conditions hypoxiques présentes dans le vagin, les lactobacilles produisent peu ou pas de H_2O_2 (Ocana *et al.*, 1999). Le peroxyde d'hydrogène est inactivé par le puissant effet antioxydant du liquide cervico-vaginal et du sperme (O'Hanlon *et al.*, 2010). Les concentrations physiologiques de H_2O_2 ne sont pas bactéricides contre les bactéries associées à la VB et à mesure que lorsque H_2O_2 exogène est ajouté, il affecte la viabilité des lactobacilles vaginaux plus que les bactéries associées à la VB (O'Hanlon *et al.*, 2010).

Contrairement à H₂O₂, l'acide lactique à des concentrations physiologiques (par exemple 110 mM), même à pH 4,5, entraîne une diminution puissante de 10⁶ fois de la viabilité de 17 différentes bactéries associées à la VB sans affecter la viabilité de quatre *Lactobacillus* spp vaginales (O'Hanlon *et al.*, 2011). Notamment, l'activité antimicrobienne de l'acide lactique est de plusieurs ordres de grandeur supérieure à celle des milieux acidifiés à pH 4,5 avec HCl seul ou avec de l'acide acétique, et l'activité bactéricide est médiée par la forme protonée de l'acide lactique, et non par l'anion lactate (O'Hanlon *et al.*, 2011). De plus, dans des conditions proches d'*ex vivo*, l'acide lactique seul, sans bactériocines, est efficace contre les microbes de VB dans les sécrétions VB. Ces études *in vitro* et *ex vivo* suggèrent que l'acide lactique délivré directement ou par une souche probiotique a le potentiel de maintenir l'eubiose vaginale ou d'inverser la dysbiose et de protéger contre les infections sexuellement transmissibles bactériennes (Tachedjian *et al.*, 2017).

D'autres pathogènes urogénitaux opportunistes comprennent le streptocoque du groupe B (SGB) et *C.albicans* qui provoquent la morbidité et la mortalité néonatales (Maisey *et al.*, 2008) et la CVV (Goncalves *et al.*, 2016), respectivement. Bien que le SGB est acidotolérant et produit de l'acide lactique comme facteur de virulence (Kling *et al.*, 2009), la concentration d'acide lactique produit est inférieure à celle des lactobacilles cultivés dans les mêmes conditions de culture (De Gregorio *et al.*, 2014). Les lactobacilles inhibent le SGB *in vitro* (Juarez Tomas *et al.*, 2011 ; De Gregorio *et al.*, 2014), et cette inhibition est associée à la production d'acide lactique et à une diminution du pH, impliquant la forme protonée de l'acide lactique (Juarez Tomas *et al.*, 2011 ; De Gregorio *et al.*, 2014).

III.2/Administration intravaginale de l'acide lactique

L'utilisation de l'acide lactique, qui peut être considéré comme un métabolite «postbiotique» avec des propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices favorables, présente une approche alternative qui contourne les défis réglementaires et de stabilité de colonisation présentés par les probiotiques. Étant donné que la production d'acide lactique est plus importante dans la plupart des microbiotes vaginaux associés à l'eubiose (Ravel *et al.*, 2011), l'acide lactique peut représenter une stratégie pour restaurer la fonction du microbiote vaginal indépendamment des préoccupations entourant l'introduction de probiotiques qui peuvent être étrangers et présenter d'autres effets indésirables pour les femmes (Tachedjian *et al.*, 2017).

Les gels topiques contenant de l'acide lactique ont été évalués dans plusieurs essais cliniques pour le traitement de la VB. Cela comprend le gel vaginal Lactacyd (GVL), contenant 225 mg d'acide lactique et 5 g de glycogène prébiotique pour favoriser la croissance de *Lactobacillus* (Andersch *et al.*, 1986 ; Bahamondes *et al.*, 2011). GVL a été bien toléré par rapport à l'antibiothérapie au métronidazole. Tandis que la combinaison du métronidazole et du GVL a montré des preuves d'être supérieur pour le traitement de la VB par rapport au GVL ou au métronidazole seul (Decena *et al.*, 2006). Une autre étude a évalué le gel d'acide lactique (Lactal) pour le traitement et la prévention de la récurrence de VB (Andersch *et al.*, 1990).

IV/Production de bactériocine

En plus des enzymes, *Lactobacillus* libère également d'autres substances importantes pour le maintien de l'homéostasie du microbiome vaginal (Dover *et al.*, 2008 ; Kaur *et al.*, 2013 ; Stoyancheva *et al.*, 2014). Les bactériocines sont des protéines ou des complexes protéiques synthétisés dans les ribosomes des lactobacilles avec de forts effets bactéricides et peuvent être divisés en quatre groupes en fonction de leur taille (Tableau 4) (Dover *et al.*, 2008 ; Bodaszewska-Lubas *et al.*, 2012 ; Stoyancheva *et al.*, 2014).

Tableau 4: Bactériocines de *Lactobacillus*

Classe	Sous-classe	Masse moléculaire	Caractéristiques	Exemples
Classe I	A B	≤5 kDa	Lantibiotiques	Nisine Marsacydine alamétycine
Classe II	IIa IIb IIc	≤10KDa	Pédiocine-like Deux peptides Dépendant de la sécrétion	Sakacine A, sakacine P Carno-bactériocine A Lactococcine A
Classe III		≥30KDa	Thermolabile, spécifique au lactobacille.	Lactococcine B
Classe IV		Grande protéine	Mélange de protéines	Leucocine S, mésentéroïne 52

Les bactériocines présentent une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives, ainsi que contre certains champignons (Dover *et al.*, 2008 ; Kaur *et al.*, 2013 ; Stoyancheva *et al.*, 2014). Les bactériocines tuent les agents pathogènes en bloquant la synthèse de l'ADN et des protéines (Dover *et al.*, 2008) et sont efficaces sur la plupart des agents pathogènes vaginaux, y compris *G.vaginalis*, *E.coli*, et *C.albicans* (Klaenhammer, 1993 ; Kaur *et al.*, 2013 ; Stoyancheva *et al.*, 2014). Les bactériocines ressemblent aux antibiotiques par leurs effets inhibiteurs ; cependant, ils diffèrent par leur synthèse, leur mécanisme d'action, leur toxicité et leurs mécanismes de résistance (Li *et al.*, 2005 ; Kaur *et al.*, 2013). Les micro-organismes résistants aux antibiotiques ne sont généralement pas résistants aux bactériocines (Li *et al.*, 2005), et la résistance aux bactériocines n'est pas déterminée génétiquement (Li *et al.*, 2005). De plus, les bactériocines sont plus efficaces à un pH vaginal 4,0-7,0 et diminuent fortement en dehors de cette intervalle (Li *et al.*, 2005 ; Dover *et al.*, 2008). Des études de toxicité ont montré que les peptides antimicrobiens produits par les lactobacilles vaginaux n'irritent pas l'épithélium vaginal, sont non hémolytiques et n'ont aucun effet sur la viabilité vaginale des lactobacilles (Li *et al.*, 2005 ; Dover *et al.*, 2008 ; Stoyancheva *et al.*, 2014), suggérant que les bactériocines produites par des espèces de *Lactobacillus* sont sans danger pour le traitement des infections vaginales (Kaur *et al.*, 2013 ; Stoyancheva *et al.*, 2014).

V/Propriétés probiotiques de *Lactobacillus salivarius*

Lactobacillus salivarius est un candidat probiotique prometteur fréquemment isolé des voies gastro-intestinales (GIT) humaines, porcines et aviaires, dont beaucoup sont des producteurs de bactériocines non modifiées des sous-classes IIa, IIb et IIc (O'Shea *et al.*, 2011). C'est un producteur de bactériocine et un organisme probiotique bien caractérisé (Dobson *et al.*, 2012).

Au cours des dernières années, *L.salivarius* a attiré l'attention en tant qu'espèce probiotique prometteuse. Des propriétés probiotiques ont été attribuées à de nombreuses espèces de *L. salivarius* telles que la capacité à moduler le microbiote intestinal, à produire des substances antimicrobiennes, à stimuler la réponse immunitaire protectrice, à inhiber l'activité enzymatique fécale, à produire des acides gras à chaîne courte permettant une acidification souhaitable de l'intestin, etc. Traditionnellement, la sélection des souches pour des applications *in vivo* a impliqué plusieurs tests de caractérisation *in vitro*, y compris des tests d'agrégation, de

coagrégation, d'hydrophobicité de la paroi cellulaire, de tolérance aux acides, de tolérance aux sels biliaires, d'adhésion aux lignées cellulaires épithéliales et d'activité antimicrobienne (Dobson *et al.*, 2012).

La production de bactériocines par les souches de *L. salivarius* isolées de différentes origines a été rapporté précédemment (Vera Pingitore *et al.*, 2009; O'Shea *et al.*, 2011; Busarcevic et Dalgalarondo, 2012). La salivaricine CRL 1328 de la sous classe IIB ; est une bactériocine thermostable produite par *L. salivarius* CRL 1328, une souche isolée du vagin humain. Cette bactériocine est active contre les bactéries potentiellement pathogènes urogénitales telles qu'*E.faecalis*, *E.faecium* et *N.gonorrhoeae* (Ocaña *et al.*, 1999).

VI/Propriétés probiotiques de *Lactobacillus reuteri*

Il existe certaines conditions préalables pour devenir des probiotiques potentiels : survivre dans des environnements à pH bas et enrichis en enzymes, adhérer à l'épithélium pour une interaction hôte-probiotique, une compétition avec des microorganismes pathogènes et, surtout, être sans danger. *L. reuteri* répond à toutes ces exigences. La **figure 12** résume les propriétés probiotiques supplémentaires de *L. reuteri* qui contribuent à ses divers effets bénéfiques sur la santé de l'hôte et la prévention et / ou traitement des maladies (Mu, 2018)

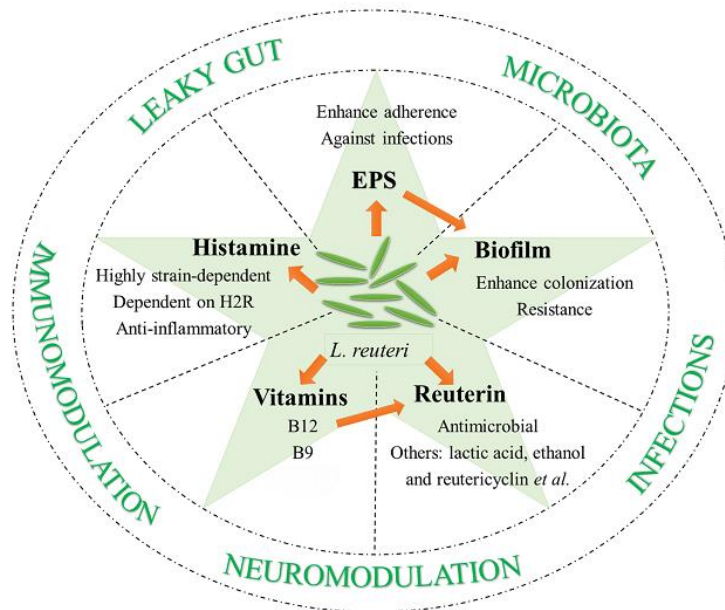


Figure 12: Propriétés probiotiques de *L.reuteri* (Mu, 2018)

Les effets antimicrobiens et immunomodulateurs des souches de *L. reuteri* sont liés à leur profil de production de métabolites. La plupart des souches de *L. reuteri* d'origine humaine sont capables de produire et d'excréter de la reutéline (**Jones et Versalovic, 2009 ; Mishra et al., 2012; Greifova et al., 2017**). Outre la reutéline, plusieurs autres substances antimicrobiennes, dont l'acide lactique, l'acide acétique, l'éthanol et la reutéricycline, ont été déterminées comme produits de certaines souches de *L. reuteri* (**Gopi et al., 2015 ; Yang Y. et al., 2015 ; Greifova et al., 2017**). De plus, ces dernières peuvent également produire une bactériocine active à la fois de manière bactéricide et bactériolytique contre les cellules sensibles. Cette bactériocine a été appelée reutéricine 6, avec une taille moléculaire apparente de 3800 Da telle que déterminée par des études SDS-PAGE (**Kawai et al., 2001**). La reutéricine 6 s'est avérée être une bactériocine cyclique de classe II qui a conservé son activité après chauffage à 100° C pendant 20 minutes (**Toba et al., 1991**).

De plus, certaines études suggèrent que *L. reuteri* pourrait également avoir des propriétés antifongiques, où *L. reuteri* antagonise, arrête la croissance et finit par tuer diverses espèces de *Candida* (**Jorgensen et al., 2017**).

Une étude réalisée par **Petricevic et al. (2008)**, a montré que seulement 14 jours d'administration orale de *L. reuteri* RC-14 pouvaient restaurer la flore vaginale normale chez les femmes ménopausées. Fait intéressant, l'abondance relative des lactobacilles est largement diminuée chez les patientes atteintes de vaginose bactérienne (**Macklaim et al., 2015**). Une autre étude réalisée par **Bisanz et al. (2014)**, suggère qu'un total de 4 semaines de consommation de capsules orales de deux souches de lactobacilles, y compris *L. reuteri* RC-14, a augmenté l'abondance relative des lactobacilles. Une augmentation similaire de lactobacilles a été observée lorsque *L. reuteri* RC-14 a été administré par voie vaginale avec une souche de *L. rhamnosus*. Cependant, chez les femmes enceintes, 8 semaines de traitement oral par *L. reuteri* RC-14 n'ont pas rétabli efficacement le microbiote vaginal normal (**Gille et al., 2016**).

Partie

Expérimentale

Partie expérimentale

➤ **L'origine des lactobacilles et des germes infectieux**

Les lactobacilles vaginaux (*L.salivarius* et *L.reuteri*) qu'on a voulu étudié, ont été isolé à partir des femmes saines et en âge de reproduction entre 18 et 45 ans. Le prélèvement des échantillons vaginaux a été effectué par une sage-femme de manière aseptique avec des écouvillons stériles, puis transportés directement au laboratoire d'analyse médicale, service de bactériologie à l'EPH Aïn-Tedeles, W.Mostaganem. L'identification a été faite par une étude phénotypique qui a été réalisée au laboratoire de recherche de microbiologie et biologie végétale de l'université de Mostaganem, et par une étude génotypique réalisée au niveau de laboratoire de Microbiologie dans la faculté de médecine vétérinaire à l'université de Mustafa Kamel, Antakya-Turquie (**Bechelaghem, 2017**). Ces isolats sont conservés à -80°C dans un milieu MRS- glycérol à 30%.

Concernant les germes infectieux, quatre germes ont été isolés à partir des femmes présentant différentes infections des voies génitales, collectés auprès de service bactériologie de l'EPH Aïn-Tedeles, W. Mostaganem. Ces isolats ont été identifiés phénotypiquement par Bechelaghem en 2013, et rapprochés aux espèces suivantes: *C. albicans*, *E.coli 1*, *Serratia fonticola* et *Staphylococcus* sp. Ces germes sont conservés à -20°C dans un BN-glycérol à 30%.

A cause des conditions défavorables dues à la pandémie causée par le Coronavirus Covid 19, qui a touché le monde entier on n'a pu travailler au sein de laboratoire. Donc, pour traiter notre sujet (l'effet des lactobacilles vaginaux sur des germes causant des infection génitales), nous présentons dans ce mémoire de fin d'études une synthèse des travaux scientifiques qui ont abordé presque le même sujet et qui expliquent mieux les protocoles expérimentaux convenables à l'étude de l'effet antimicrobien des *Lactobacillus* vaginaux et leur pouvoir de produire l'acide lactique et la bactériocine. Ces travaux scientifiques, ont comme rôle de présenter l'importance de ces lactobacilles ou leurs métabolites dans la prévention ou le traitement des troubles génitaux chez la femme.

Protocole expérimentale A (selon Pirje Hütt *et al.* (2016))

➤ Matériel et méthodes

I/ Les participants et prélèvement des échantillons

Des échantillons vaginaux ont été prélevés à partir des femmes volontaires participant à l'étude du microbiome de l'appareil reproducteur. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique de la recherche humaine de l'université de Tartu à l'Estonie. Un total de 70 femmes issues de couples infertiles (48 de partenaires d'hommes en bonne santé, 22 de partenaires d'hommes atteints de prostatite inflammatoire) et 64 femmes fertiles en bonne santé ont été inclus dans cette étude.

II/Souches bactériennes et levures

II.1/Souches de *Lactobacillus*

Tous les échantillons vaginaux ont été inoculés sur gélose MRS (**annexe**) et les boîtes ont été incubées à la fois en microaérobiose et en anaérobiose, à 37 ° C pendant 48 h. Des colonies distinctes ont été prélevées et repiquées pour obtenir des cultures pures. Les lactobacilles ont été préalablement identifiés au niveau du genre par l'étude morphologique des colonies, la coloration de Gram et le test de catalase. De plus, les lactobacilles ont été identifiés au niveau moléculaire par séquençage du fragment d'ADNr 16S.

II.2/Micro-organismes opportunistes

L'activité antagoniste des lactobacilles à potentiel probiotique a été évaluée par rapport aux bactéries cibles suivantes: souche pyélonéphritique anaérobie facultative d'*E.coli* ATCC 700336, souche cystitique d'*E. Coli* ATCC 700414, trois isolats cliniques d'*E. coli* (isolés chez des femmes atteintes de vaginose bactérienne), *C.albicans* ATCC 32032, *C.albicans* RTN 071, *C.glabrata* RTN 009, *G.vaginalis* ATCC 14018 (DSM 4944) et un isolat clinique de *G. vaginalis*.

Partie expérimentale

III/Détection de la production d'acide lactique

La production d'acide lactique a été estimée par chromatographie en phase gazeuse. L'analyse a été réalisée après culture de lactobacilles à 37° C dans un bouillon MRS modifié (**annexe**) pendant 48 h dans une chambre à gants anaérobie avec un mélange gazeux CO₂/H₂ / N₂: 5/5/90 %. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 6 000 g pendant 10 min.

Des échantillons méthylés d'acide lactique ont été préparés en ajoutant 0,4g de chlorure de sodium, 0,2 ml d'acide sulfurique à 50% et 2 ml de méthanol dans 1 ml de bouillon de culture préparée. Les tubes ont été chauffés à 60° C pendant 1h :30min ; 1 ml d'eau et 0,5 ml de chloroforme ont été ajoutés. La forme d'émulsion a été centrifugée à 3000 tr / min pendant 3 minutes.

1 µl de l'échantillon de chloroforme a été injecté dans la colonne GC. La station chimique HP pour le système GC (révision A.06) a été utilisé. Le chromatographe en phase gazeuse (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) était équipé d'un détecteur à ionisation de flamme d'hydrogène, d'un échantillonneur automatique (modèle 7683) et d'une colonne capillaire GC HP-INNOWax (Hewlett-Packard) de 15m x 0,25 mm , revêtu de polyéthylène glycol réticulé (épaisseur de couche 0,15 mm).

La température du détecteur était de 250°C et la température de l'injecteur de 200° C, respectivement. Le programme de température du four était un système à gradient; la température initiale était de 60° C pendant 1 min qui a été augmentée à 120 ° C à taux de 10° C / min et maintenue pendant 10 min.

L'acide lactique (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) a été utilisé comme standard. Les solutions mères méthylées avaient une concentration différente de chaque acide, à savoir 0,15, 0,3, 0,6, 1,2, 2,4, 3,6 et 4,8 mg /ml. Chaque solution standard a été injectée en double pour obtenir son temps de rétention et sa zone sous la courbe. Les zones de pics chromatographiques ont été intégrées avec un intégrateur réseau Hewlett-Packard.

IV/Détection de l'activité antagoniste :

IV.1/Activité antagoniste des lactobacilles contre les pathogènes urogénitales :

Pour détecter l'activité antibactérienne des lactobacilles sur les bactéries cibles suivantes : *E. coli* ATCC 700414, *E. coli* ATCC 700336 et trois souches d'*E. Coli* (isolées de femmes atteintes de vaginose bactérienne), une méthode de double gélose (spot-on-lawn method) a été utilisée. 1 µl d'une culture de nuit de chaque lactobacille sous forme de spot,

Partie expérimentale

ont été déposés en surface d'une boîte rempli par 20 ml de gélose MRS modifié contenant 0,2% de glucose et 1,2% d'agar et mise à l'incubation en anaérobiose à 37° C pendant 24 h. Une culture d'une nuit d'*E. Coli* (environ 8×10^8 cellules) a été mélangée avec 20ml de gélose nutritive molle (0,7%) et versée sur la boîte contenant la culture développée. Après incubation en anaérobiose à 37°C pendant 24 h, l'activité des lactobacilles contre les bactéries cibles a été déterminée par la mesure des zones d'inhibition.

IV.2/Activité antagoniste des lactobacilles contre *Candida* spp

Pour tester l'activité antifongique des lactobacilles sur les levures cibles suivantes: *C.albicans* ATCC 32032, *C.albicans* RTN 071 et *C.glabrata* RTN 009. Une technique de double gélose a été utilisée. Les isolats de *Lactobacillus* ont été inoculés dans un bouillon MRS (**annexe**) à 37°C pendant 24 h dans des conditions anaérobiques. Ensuite, les lactobacilles ont été cultivés au centre d'une boîte contenant la gélose MRS sous la forme d'une bande de 2 cm de large en utilisant un coton-tige stérile. Les boîtes ont été incubées dans des conditions anaérobiques à 37° C pendant 48 h. Une couche de MRS en surfusion a été versée sur la culture de lactobacille. Après solidification de la couche de gélose, une suspension de *C. albicans* ou *C. glabrata* (obtenue à partir d'une culture d'une nuit sur gélose Sabouraud (**annexe**), a été ajusté à une turbidité de 0,5 MacFarland en utilisant une solution saline stérile. Cette suspension a été étalée sur la surface de la gélose à l'aide d'un coton-tige stérile. Les boîtes étaient préincubé à 4° C pendant 4 h au réfrigérateur, puis incubé à 37° C pendant 24 h en conditions aérobiques, et laissé 24 h à température ambiante avant de lire les résultats. Après une croissance adéquate, les zones d'inhibition de *Candida. spp*, ont été évaluées en utilisant une mesure de ligne de stries de *Lactobacillus.spp* plus la zone d'inhibition divisée par 2.

Tous les tests concernant la détection de l'activité antimicrobienne ont été répétés trois fois dans trois expériences indépendantes.

VI.3/Activité antagoniste des lactobacilles contre les souches de *G. vaginalis*

La souche de référence de *G.vaginalis* ATCC 14018 et un isolat clinique de *G. vaginalis* ont été utilisés comme bactéries cibles.

Les surnageants de culture de souches de lactobacilles sélectionnées ont été préparés après culture de lactobacilles dans un bouillon MRS en anaérobiose à 37° C pendant 48 h.

Partie expérimentale

Ensuite, l'élimination des cellules par centrifugation à 6 000 g pendant 15 min a été effectuée. Le pH de chaque surnageant a été mesuré (Hanna Instruments HI 9024C, Singapour) et les surnageants ont été stérilisés en utilisant des filtres millipores de 0,20 µm. Les surnageants obtenus ont été examinés pour leur activité antibactérienne sur des plaques de microtitration à 96 puits.

Les souches de *G. vaginalis* ont été cultivées dans une gélose sélective *Gardnerella* avec 5% de sang humain (**annexe**) dans un environnement anaérobie à 37°C pendant 48 h.

Les colonies de *G. vaginalis* ont été mises en suspension dans une solution saline stérile pour atteindre une turbidité d'environ 0,5 MacFarland.

En outre, 20 µl des suspensions de *G. vaginalis*, 5% de sérum humain (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA) dans 150 µl de bouillon Schaedler (**annexe**) et 30 µl de surnageants ont été transféré sur une microplaque à 96 puits (a servi de puits de test). 20 µl de suspensions de *G. vaginalis* et 5% de sérum humain dans 180 µl du bouillon Schaedler transférés dans la microplaque ont servi de contrôle positif (puits de contrôle).

La croissance et l'inhibition de la croissance de *G. vaginalis* ont été déterminées en surveillant les changements de DO à 600 nm, mesurés avec un lecteur de microplaques à absorbance (Sunrise, Tecan, Autriche) après 0 et 48 h d'incubation. La lecture de l'absorbance due au milieu et à l'inoculum a été effectuée après 0 h d'incubation. Le pourcentage de réduction de la croissance des bactéries cibles dû au surnageant acellulaire a été calculé selon la formule suivante :

Pourcentage de réduction de la croissance= (Valeur de DO des puits de contrôle - Valeur de DO des puits de test) x100

Les expériences ont été répétées trois fois avec deux répliques. L'inhibition de la croissance de *G. vaginalis* en pourcentage a été classée comme élevée (>78,0%), intermédiaire (67,3 - 77,0%) ou faible (<67,2%).

V/Analyses statistiques

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant R-2.14.0 (A Language and Environment, www.r-project.org). Les données sur la production d'acide lactique et l'activité antagoniste de souches de lactobacilles à potentiel probiotique ont été analysées en utilisant (Student's t-test or Mann-Whitney rank sum test) avec la correction de Bonferroni pour plusieurs groupes. Les données ont été exprimées en moyenne ± écartype. La comparaison des dénombrements de *Lactobacillus* de différents groupes de sujets a été réalisée en utilisant le test χ^2 . Les différences étaient considérées comme significatives lorsque la valeur p était < 0,05.

➤ **Résultats et discussion**

Les résultats de Pirje Hütt *et al.* (2016) montrent qu'un total de 135 lactobacilles vaginaux ont été isolés à partir des femmes en âge de procréer. Toutes les souches de *Lactobacillus* vaginales isolées ont finalement été identifiées par séquençage du fragment d'ADNr 16S et appartenaient à trois espèces : *L.crispatus* (56%), *L.jensenii* (26%) et *L.gasseri* (18%). Il n'y avait pas de différence significative dans la distribution de ces trois espèces parmi les groupes de couples sains et infertiles (données non présentées).

Les résultats de la production de l'acide lactique indiquent que parmi les souches de *Lactobacillus* testées, les meilleurs producteurs d'acide lactique étaient *L. gasseri* (18,2±2,2 mg/ml) suivi de *L. crispatus* (15,6±2,8 mg/ml) et *L. jensenii* (11,6±2,6 mg/ml) ($p<0,0001$; $p<0,001$, respectivement) et aucune différence n'a été trouvée entre les groupes de donneurs.

Il est bien connu, que la production d'acide lactique par les lactobacilles entraîne une baisse du pH, ce qui est important pour prévenir la colonisation et la prolifération d'organismes pathogènes non indigènes dans le vagin

Les résultats de l'activité antagoniste de 56 souches de lactobacilles sélectionnées en fonction de leur production d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène contre les différents agents pathogènes en utilisant trois méthodes modifiées différentes, confirment que les souches de *L. crispatus* ont un grand effet antimicrobien sur les différentes souches d' *E.coli* (**tableau 5**), ainsi que sur les différentes souches de *Candida* (**figure 13**) par rapport à *L.gasseri* et *L. jensenii*. L'inhibition d'*E. Coli* et de *Candida* par les lactobacilles vaginaux a été rapportée dans plusieurs études antérieures.

Partie expérimentale

Tableau 5 : Activité antimicrobienne des isolats de lactobacilles vaginaux contre les souches urogénitales d'*E. Coli* déterminée par la méthode de double gélose (zones d'inhibition en mm, exprimées en moyenne±écartype).

Espèces	<i>E.coli</i> RTN038 ^a	<i>E.coli</i> RTN047 ^a	<i>E.coli</i> RTN100 ^a	<i>E.coli</i> ATCC 700414 ^b	<i>E.coli</i> ATCC 700336 ^b
<i>L. crispatus</i>	8,62±1,25*	10,70±1,21	9,36 ±1.67**	10,14±1,00***	10,42±1,28
<i>L. gasseri</i>	7,89±1,10	10,07±1,22	8,74±2,74	9,92±1,52	9,63±1,24
<i>L. jensenii</i>	6,47±2,23*	9,67±1,75	6,90±3,18**	8,58±2,66***	8,82±3,15

^a Trois souches d'*E. coli* ont été précédemment isolées chez des femmes atteintes de vaginose bactérienne; ^b souches de références: souche pyélonéphrite d'*E. coli* ATCC 700336 et souche cystitique de *E. coli* ATCC 700414. *p=0,0002; **p=0,003; ***p=0,006.

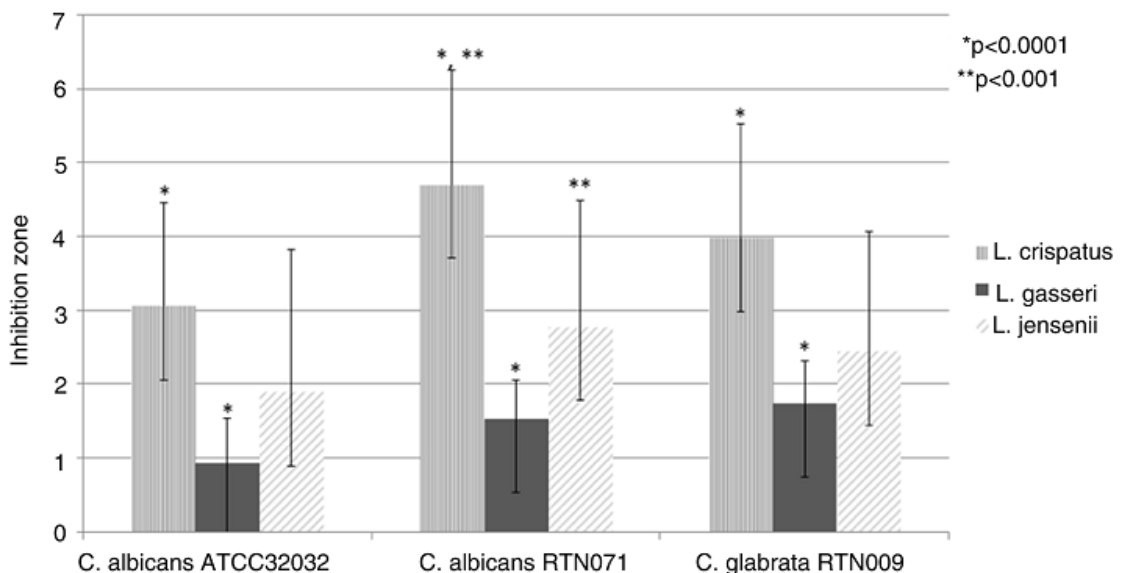


Figure 13: Activité anti-*Candida* des lactobacilles vaginaux (56 souches de *Lactobacillus*). Des différences significatives dans l'inhibition de *Candida*. spp entre *Lactobacillus*. spp: * $p < 0,0001$, ** $p < 0,001$.

Concernant les résultats de l'activité antagoniste des lactobacilles contre *G. vaginalis*, Pirje Hütt *et al* ont constaté que les souches des trois espèces de lactobacilles avaient une activité antagoniste assez similaire contre les deux souches différentes de *G. vaginalis* (données non présentées).

Protocole expérimentale B (selon Gaspar *et al.* (2018))

➤ Matériel et méthodes

I/ Les souches microbiennes

Les souches bactériennes et fongiques utilisées dans cette étude, y compris la souche étudiée (*Lactobacillus acidophilus* KS400), la souche indicatrice de bioactivité (*Lactobacillus delbrueckii* ATCC9649) et les pathogènes urogénitaux sélectionnés pour évaluer l'activité antimicrobienne des protéines sont présentées dans le **tableau 6**. Les souches bactériennes et fongiques ont été mis en suspension dans des milieux adéquats additionnés de 25% de glycérol pour être conservés à - 80 ° C, jusqu'à leurs utilisations.

Tableau 6 : Souches bactériennes et fongiques utilisées dans cette étude

Microorganismes	Source	Conditions de croissance (milieu, température et atmosphère)
<i>L.acidophilus</i> KS400	Medinova	MRSB, 37 °C, 10% CO ₂
<i>L. delbrueckii</i> ATCC9649	Collection ATCC	MRSB, 37 °C, 10% CO ₂
<i>G.vaginalis</i> 586876	Clinique	NYCIIB (annexe), 37 °C, 10% CO ₂
<i>G.vaginalis</i> 563765	Clinique	NYCIIB, 37 °C, 10% CO ₂
<i>G.vaginalis</i> 568799	Clinique	NYCIIB, 37 °C, 10% CO ₂
<i>S. aureus</i> ATCC6538	Collection	TSB (annexe), 37 °C, aérobique
<i>S.agalactiae</i> 181324	Clinique	BHIB (annexe), 37 °C, aérobique
<i>S. agalactiae</i> 179954	Clinique	BHIB, 37 °C, aérobique
<i>P.aeruginosa</i> ATCC15442	Collection	TSB, 37 °C, aérobique
<i>E.coli</i> ATCC8739	Collection	TSB, 37 °C, aérobique
<i>C.albicans</i> ATCC10231	Collection	BHIB, 37 °C, aérobique

Lorsque le milieu gélosé est nécessaire (par exemple, pour le maintien des micro-organismes), l'agar bactériologique a été ajouté au milieu liquide à la concentration finale de 20 g/l. La gélose MRS molle a été préparée avec 7,5 g/l d'agar bactériologique.

Partie expérimentale

II/Détection de bactériocine

LaKS400 a été cultivée dans 10 ml de bouillon MRS à pH 6,5 à 37° C pendant 24 h en présence de 10% de CO₂. Après incubation, la culture cellulaire a été chauffée à 70° C pendant 30 min pour assurer l'inhibition de l'activité protéase, puis refroidie à température ambiante et centrifugée (4500 tr/min pendant 15min à 4°C) avec une centrifugeuse de paillasse (Heraeus megafuge 8R centrifuge, Thermo-fisher Scientific, EUA).

Afin d'éliminer l'effet antimicrobien des acides organiques, le pH des surnageants a été ajusté à 6,5 avec une solution de NaOH (10 M). L'activité inhibitrice du peroxyde d'hydrogène a été éliminée par l'addition de 5 mg/ml de catalase de foie de bovin (Sigma-Aldrich, EUA) suivie d'une filtration à travers l'acétate de cellulose de 0,2 µm (Fisher-Scientific, UK).

Afin de détecter la production de bactériocine, une méthode modifiée de l'antagoniste des puits de diffusion a été réalisée. Pour cela, 20 ml de gélose MRS molle ont été inoculés avec 200 µl du microorganisme indicateur (*L.delbrueckii* ATCC9649) pendant une nuit . Des puits de 4 mm de diamètre ont été perforés dans des boîtes de gélose et remplis de 100 µl de surnageants de culture acellulaires. Une solution saline de tampon phosphate (PBS) (**annexe**) a été utilisée comme témoin négatif. Les boîtes ont été maintenues à température ambiante pendant 3 h pour permettre la diffusion de la bactériocine, suivie d'une incubation à 37° C en présence de 10% de CO₂, pendant 24 à 48 h. L'activité bactériocine a été déterminée par observation macroscopique d'une zone d'inhibition claire sur la gélose.

III/Production de bactériocine

Pour étudier la cinétique de production de bactériocine, 500 ml de bouillon MRS à pH 6,5 ont été inoculés avec la souche *LaKS400* (1% v/v) et incubés à 37° C en présence d'azote gazeux sans agitation. A chaque heure pendant la fermentation, la densité des cellules bactériennes et le pH du milieu de culture ont été mesurés. L'évaluation de l'activité antimicrobienne contre la souche indicatrice (*L.delbrueckii* ATCC9649) a été effectuée toutes les 2 h, comme décrit ci-dessus :

Pour la production de bactériocine, 10 ml d'une culture de 20 h de *LaKS400* a été inoculée (1% v/v) dans 1L de bouillon MRS. La fermentation en Batch a été réalisée à 37°C, sans agitation, en présence d'azote pendant 24 h. Cette procédure assure une interruption de la croissance bactérienne avant la phase stationnaire. Ainsi, on évite que les protéases libérées dans le milieu extracellulaire dégradent la bactériocine.

Partie expérimentale

IV/Préparation d'extraits de bactériocine

Des extraits de bactériocine ont été préparés comme suit : 1 L de milieu de culture issu de la fermentation des cellules de *LaKS400* a été ajusté à pH 6,5 avec une solution de NaOH 1M suivi d'une agitation à température ambiante pendant 30 min, afin de permettre l'adsorption de la bactériocine sur les cellules productrices. Ensuite, la culture a été chauffée à 70° C pendant 30 minutes. Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugeuse à 4500 tr/min pendant 15 min à 4° C, puis ont été lavées deux fois avec du phosphate de sodium 5 mM (pH 6,5) et récoltées par centrifugation dans les mêmes conditions. Ensuite, les cellules bactériennes ont été remises en suspension dans 50 ml de NaCl 100 mM à pH 2,0 (ajusté avec de l'acide phosphorique à 5%) et mélangées avec un agitateur magnétique pendant 1 h à 4° C. La suspension cellulaire a ensuite été centrifugée à 4500 tr/min pendant 15 minutes à 4° C et le surnageant sans cellules a été ajusté à pH 6,5 avec une solution de NaOH 1 M. L'extrait de bactériocine obtenu a été filtré à travers un acétate de cellulose de 0,2 µm.

V/Électrophorèse

Comme l'électrophorèse des protéines 1D (séparation en une dimension) permet de séparer les biomolécules en fonction de leur taille et de leur structure, l'extrait de bactériocine qui présentait une bioactivité contre la souche indicatrice a été soumis à une électrophorèse en Tricine-SDS-PAGE sur un appareil Bio-Rad Mini Protean 3 Cell (Bio-rad, États-Unis).

4% de polyacrylamide ont été utilisés dans le gel d'empilement et 16% de polyacrylamide dans le gel de séparation ; Cette procédure a été réalisée deux fois. Un échantillon de 25 µl de bactériocine a été mélangé avec 25 µl de tampon double concentré (Tris base 100 mM, glycine 100 mM, SDS4%, urée 8 M, bleu de bromophénol 0,01%) et chauffé pendant 5 min à 100°C. NZYColour Protein Marker II (NZYTech, Portugal), a été utilisé comme marqueur de poids moléculaire, avec des tailles allant de 11 à 245 kDa. L'électrophorèse a été effectuée à 35 mA constants pour le gel d'empilement et à 50 mA pour le gel de résolution. Afin d'identifier la position de la bactériocine active, la moitié du gel a été fixée avec du méthanol et de l'acide acétique et lavée trois fois avec 250 ml d'eau Milli-Q pendant 30 minutes au maximum. Le gel a ensuite été placé dans une boîte de Pétri stérile et recouvert de gélose MRS molle avec 1% de *L.delbrueckii* ATCC 9649. La bactériocine active a été détectée par observation macroscopique d'un halo d'inhibition, après incubation à 37° C, pendant 48 h en présence de CO₂ à 10%.

Partie expérimentale

L'autre moitié du gel a été observée et photographiée dans Bio-Rad ChemiDoc MP en mode sans colorant. De plus, l'influence du β -mercaptoéthanol sur l'activité antimicrobienne de la bactériocine a été testée afin de vérifier si la protéine active avait des ponts disulfures. En fait, le β -mercaptoéthanol est décrit comme étant responsable de la perte de l'activité antimicrobienne de la bactériocine

VI/L'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne de la bactériocine a été évaluée selon la méthode de microdilution. Pour le faire, les puits d'une microplaque ont été remplis avec 100 μ l d'extrait de bactériocine préparé comme décrit précédemment et 100 μ l de suspension d'agent pathogène en milieu de culture (contenant 1×10^5 cellules évaluées par densité optique). Des contrôles négatifs ont été réalisés correspondant à l'extrait de bactériocine en milieu de culture stérile (2 puits pour chaque type de milieu de culture utilisé pour soutenir la croissance des pathogènes); les contrôles positifs correspondant à 100 μ l de suspension d'agent pathogène et 100 μ l de PBS remplaçant l'extrait de bactériocine. La microplaque a été incubée dans des conditions de croissance optimales pour les pathogènes inscrits. Après incubation, la présence ou l'absence de croissance de pathogène dans chaque puits a été comparée à la croissance obtenue dans le contrôle positif. Pour cet essai, les microorganismes pathogènes inscrits ont été décrits dans le **tableau 6**.

➤ Résultats et discussion

Selon le travail de **Gaspar et al. (2018)** les résultats de la détection de la bactériocine produite par *LaKS400* montrent que l'activité antimicrobienne de cette bactériocine, obtenue à partir du milieu de culture filtré après neutralisation des acides organiques et du peroxyde d'hydrogène, a montré une zone d'inhibition claire par rapport au contrôle négatif (PBS) (aucune inhibition observée), en utilisant *L.delbrueckii* ATCC9649 comme organisme indicateur (**figure 14**).

Partie expérimentale

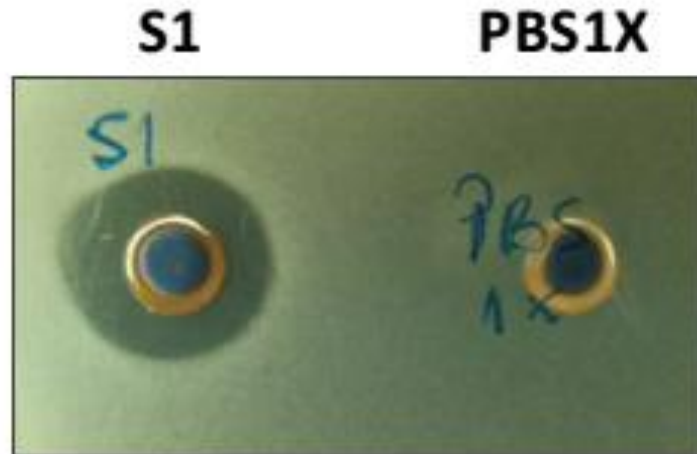


Figure 14: Activité antimicrobienne de la bactériocine produite par *LaKS400* contre *L.delbrueckii* ATCC9649. **S1** - milieu de culture à partir du milieu de *LaKS400*; **PBS 1X** - contrôle négatif correspondant à une solution de tampon phosphate saline $\times 1$

Les acides organiques produits par *Lactobacillus* (consécutifs à la fermentation des glucides) induisent une diminution du pH du milieu. L'approche de fermentation en batch confirme une diminution du pH résultant de l'accumulation d'acide organique dans le milieu extracellulaire (**figure 15**). Après 36 h de fermentation *LaKS400*, le pH était de 4,3. Dans cette étude, l'effet antimicrobien des acides organiques a été neutralisé par l'ajout d'une solution de base, afin d'éliminer son influence possible dans l'évaluation antimicrobienne de la bactériocine.

De plus, il est considéré que lors de la fermentation discontinue, une certaine quantité de peroxyde d'hydrogène aurait pu être produite, ils ont donc procédé à sa catalyse en ajoutant de la catalase au milieu une fois la fermentation terminée.

Ainsi, l'activité relative de la bactériocine a été déterminée par rapport à l'échantillon qui présentait la bioactivité la plus élevée (au temps 30 h). Les profils de fermentation discontinue de *LaKS400* ont indiqué que la production de bactériocine était plus évidente et clairement augmentée pendant la phase de croissance exponentielle, suivie d'une réduction pendant la phase stationnaire, comme le montre la **figure 15a** (barres grises). Cependant, après 32 h de fermentation, une perte de l'activité antimicrobienne de la bactériocine a été observée (**figure 15**), par diminution du halo d'inhibition.

Partie expérimentale

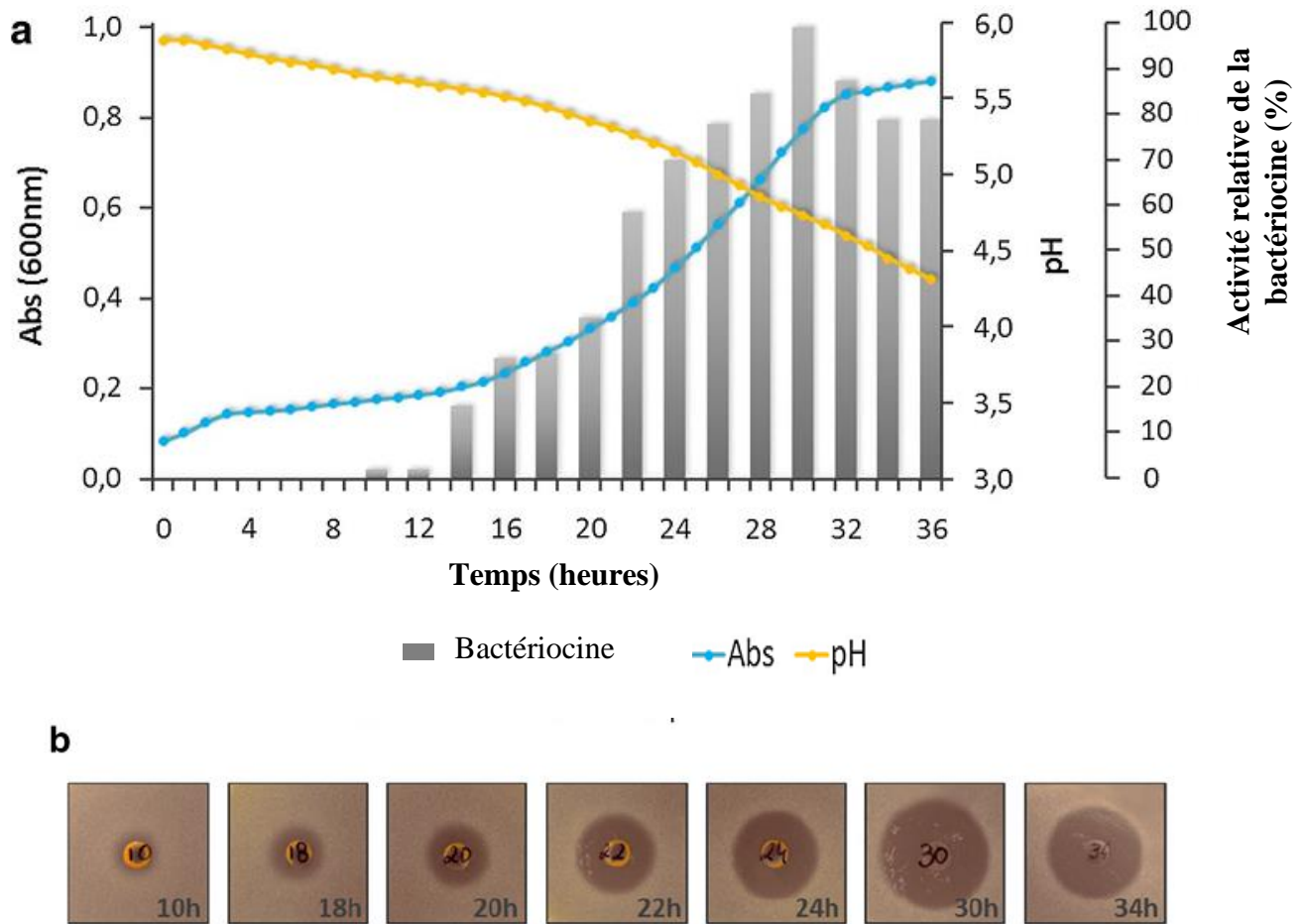


Figure 15: **a** Fermentation discontinue de la souche *La KS400* dans MRSB à pH non contrôlé (valeur initiale de 6,5) à 37° C. **b** Activité antimicrobienne de la souche *La KS400* pendant la fermentation; l'activité a été testée contre *L.delbrueckii* ATCC9649 et les boîtes ont été incubées à 37° C; 10% de CO₂.

Pour savoir le poids moléculaire de la bactériocine produite, les protéines ont été séparées et un test de bioactivité a été effectué avec la souche indicatrice (*L.delbrueckii* ATCC9649) directement sur gel électrophorèse (**Figure 16b**), afin d'identifier la protéine active. L'extraction des protéines sur gel de tricine-SDS-PAGE a entraîné une seule zone d'inhibition de la croissance lorsque le gel a été recouvert de la souche indicatrice (**figure 16**). L'ajout de β -mercaptoéthanol n'a pas influencé l'activité antimicrobienne de la bactériocine (+ β sur la **figure 16**). La protéine présentant une activité antimicrobienne dans le gel d'électrophorèse correspondait à une bande avec un poids moléculaire estimé d'environ 7,5 kDa, étant donné que la bioactivité et la bande de bactériocine ont été observées en dessous de la protéine marqueur de 11 kD.

Partie expérimentale

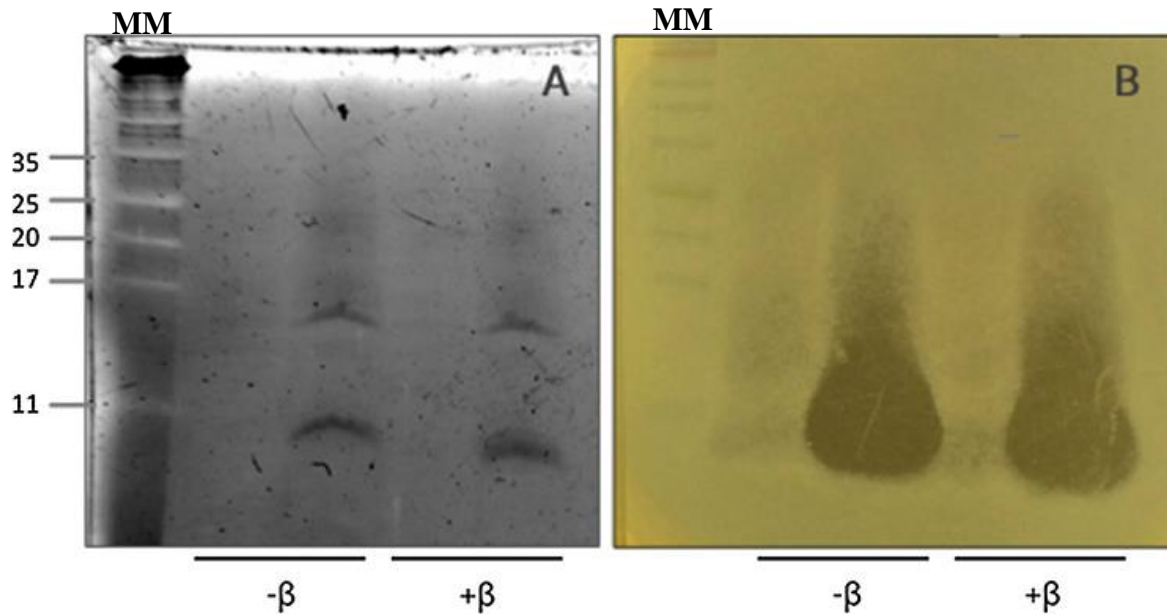


Figure 16 : La détection directe de l'activité antimicrobienne de la bactériocine de *La KS400*
 (A) Tricine-SDS-PAGE a été observée dans ChemiDoc™
 Système MP (Biorad) utilisant la fonction sans colorant pour les gels protéiques: étalons de protéines de masse moléculaire (MM); - β / + β absence et présence de β-mercaptoéthanol (B) Zone d'inhibition de la croissance correspondant à la position de la protéine antimicrobienne (bactériocine)

Les résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait de bactériocine produite par *LaKS400* contre la souche indicatrice, les bactéries pathogènes (y compris la collecte et les isolats cliniques) et *C.albicans* ATCC10231 indiqués dans le **tableau 7**, montrent que l'extrait de bactériocine inhibait la croissance de la souche indicatrice *L.delbrueckii* ATCC9649, *G.vaginalis*, *S.agalactiae* et *P.aeruginosa*. Aucun effet antimicrobien n'a été observé contre les souches d'*E.coli*, de *S.aureus* et de *C.albicans*.

Tableau 7: Spectre d'inhibition de la bactériocine antimicrobienne produite par *LaKS400* contre la souche indicatrice et les microorganismes pathogènes.

Microorganismes	Inhibition	Microorganismes	Inhibition
<i>L. delbrueckii</i> ATCC9649	+	<i>S.agalactiae</i> 181324	+
<i>G.vaginalis</i> 586876	+	<i>S.agalactiae</i> 179954	+
<i>G.vaginalis</i> 563765	+	<i>P.aeruginosa</i> ATCC15442	+
<i>G. vaginalis</i> 568799	+	<i>E. coli</i> ATCC8739	-
<i>S.aureus</i> ATCC6538	-	<i>C.albicans</i> ATCC10231	-

Protocole expérimentale C (selon Er *et al.* (2019))

➤ **Matériel et méthodes**

I/Isolement des bactéries

Dans cette étude, des échantillons vaginaux ont été prélevés à partir de 30 femmes saines préménopausées entre 20 à 40 ans. Il a également été pris en considération que ces femmes n'ont pas utilisé d'antibiotiques avant les 2 derniers mois.

Afin d'isoler les bactéries, les échantillons vaginaux ont été inoculés dans la gélose MRS et incubé pendant 48 heures à 37 ° C à 5% de CO₂. Après incubation, la coloration de Gram et le test de catalase ont été réalisés. L'isolat bactérien a été stocké dans 25% de glycérol, à -80 °C. Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique des recherches cliniques non interventionnelles de l'Université d'Istanbul Medipol.

II/Identification génotypique des bactéries avec l'analyse de la séquence d'ARNr 16s

L'analyse de la séquence de l'ARNr 16s a été effectuée par identification génotypique de l'isolat bactérien. L'ADN génomique de l'isolat a été purifié à l'aide du kit de purification d'ADN génomique Gene JET (Thermo Fischer Scientific).

L'ADN génomique obtenu a été utilisé comme ADN matrice et la réaction de PCR a été effectuée pour le locus du gène de l'ARNr 16s. 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3 'et 1492R 5'TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3 ' des amorces universelles ont été utilisées.

Le mélange réactionnel de la PCR inclut : 2,5 µl de tampon 10X (+ KCl-MgCl₂), 2,5 µl de MgCl₂ (25 mM), 2,5 µl de mélange dNTP (2,5 mM), 2,5 µl d'amorce 27F (2,5 mM), 2,5 µl d'amorce 1492R (2,5 mM), 0,25 µl de la Taq polymérase (5 u/µl), 11,75 µl de ddH₂O exempte de nucléase et 1 µL d'ADN matrice.

Les produits de PCR obtenus à partir de la réaction ont été introduits dans un gel d'agarose à 1%. Les amorces 1492R et 907R (5'-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3 ') ont été utilisées pour l'analyse de séquence de près de 1400 pb. L'analyse de séquence de l'isolat a été réalisée par MedSanTek Laboratory Supplies Trade & Industry Ltd.

Partie expérimentale

III/ Production d'acide lactique

Les isolats de lactobacilles ont été inoculés dans le bouillon MRS à 37° C pendant 48 heures à 5% CO₂. Après l'incubation, 1 ml d'une culture jeune de lactobacille a été transférée dans un ballon propre et remplie par 100 ml d'H₂O stérile. 2 à 3 gouttes de phénolphtaléine ont été ajoutées et titrées avec une solution de NaOH 0,1 M. Le volume de NaOH utilisé pour titrer a été enregistré.

L'acide produit par les lactobacilles a été calculé en pourcentage d'acidité titrable, selon la formule ci-dessous. Ce test a été répété deux fois.

$$\text{Acidité \%} : \text{Volume de NaOH utilisé (ml)} \times 0.9/\text{ml}$$

➤ **Résultats et discussion :**

Selon le travail réalisé par **Er et al. (2019)**, L'étude phénotypique des bactéries isolées à partir des échantillons vaginaux effectuée par coloration de Gram et test de catalase a abouti à des résultats qui montrent que tous les isolats sont à coloration de Gram positive et à catalase négatives qui semblent être des lactobacilles. Après l'identification génotypique par l'analyse de la séquence d'ARNr 16s les résultats suggèrent que l'isolat était *Lactobacillus crispatus* avec une similitude de 99%.

A la suite du test de production d'acide lactique, après inoculation de *L. crispatus* dans le milieu de bouillon MRS à 37° C pendant 48 heures à 5% CO₂, le taux de production d'acide lactique de *L. crispatus* qui a été calculé en pourcentage d'acidité titrable était de 2,275%. L'homéostasie vaginale est maintenue en produisant de l'acide lactique dans le vagin L'acide lactique des lactobacilles vaginaux maintient un faible pH (inférieur à 4,5) vaginal ce qui peut inhiber la croissance des agents pathogènes.

Conclusion

Conclusion

De nos jours, l'utilisation des probiotiques pour traiter les infections vaginales est en pleine expansion. Les espèces de lactobacilles présents dans le vagin varient qualitativement et quantitativement au cours de la vie de la femme. Chez les patientes présentant un déficit en lactobacilles, la colonisation par des souches probiotiques permet de restaurer la flore vaginale et de retrouver une protection contre les micro-organismes pathogènes. Ainsi, l'apport de probiotiques à l'écosystème vaginal est un moyen efficace de rétablir l'équilibre de la microflore, notamment en post-antibiothérapie, et de lutter contre la récurrence des infections vaginales. Cependant, une nouvelle problématique se pose : la flore artificielle, créée par l'apport de probiotiques vaginaux, peut-elle avoir un effet néfaste sur la santé à long terme ? **(Marion, 2018).**

Pour résoudre ce problème, l'utilisation de l'acide lactique, qui peut être considéré comme un métabolite « postbiotique » avec des propriétés antimicrobiennes et immunomodulatrices favorables, présente une approche alternative qui contourne les défis réglementaires et de stabilité de colonisation présentés par les probiotiques. L'acide lactique peut représenter une stratégie pour restaurer la fonction du microbiote vaginal indépendamment des préoccupations entourant l'introduction de probiotiques qui peuvent être étrangers et présenter d'autres effets indésirables pour les femmes **(Tachedjian et al., 2017).**

Les bactériocines à leurs tours, ont attiré l'attention en tant que substituts potentiels aux antibiotiques pour guérir et / ou prévenir les infections bactériennes. À l'heure actuelle, il n'y a aucune publication concernant l'utilisation approuvée des bactériocines pour le traitement de ces infections. Ce domaine d'enquête prometteur a été ignoré par les chercheurs qui se concentrent beaucoup plus sur l'étude des probiotiques que sur l'isolement, la purification et le test des bactériocines.

Dans cette étude, trois protocoles expérimentaux ont été exposés, dont les objectifs s'articulent autour des points suivants : isoler puis identifier des lactobacilles vaginaux à partir des femmes saines et en âge de reproduction ; tester l'effet de ces bactéries sur des germes causant des infections génitales et enfin détecter leur production de l'acide lactique et de bactériocine.

Conclusion

D'après les travaux de **Er et al. (2019)** les résultats de l'identification génotypique des isolats de lactobacilles vaginaux par l'analyse de la séquence d'ARNr 16s montrent que tous les isolats appartiennent à l'espèce *Lactobacillus crispatus* avec une similitude de 99%. **Pirje Hütt et al. (2016)** confirment que toutes les souches de *Lactobacillus* vaginales isolées qui ont été identifiées par séquençage du fragment d'ADNr 16S, appartenaient à trois espèces : *L.crispatus* (56%), *L.jensenii* (26%) et *L.gasseri* (18%). Alors d'après les travaux de **Pirje Hütt et al. (2016)** et **Er et al. (2019)** on peut conclure que les espèces des lactobacilles vaginaux varient entre les femmes de types ethniques différents.

Dans le travail présenté par **Pirje Hütt et al. (2016)** les résultats de l'activité antimicrobienne de 56 souches de lactobacilles sélectionnées indiquent que les souches de *L. crispatus* ont un effet antimicrobien significatif sur les différentes souches d' *E.coli* , ainsi que sur différentes souches de *Candida* par rapport à *L. gasseri* et *L. jensenii*. En outre, en ce qui concerne l'activité antagoniste des lactobacilles contre *G. vaginalis*, les souches des trois espèces de lactobacilles ont exactement la même activité antibactérienne contre les deux souches différentes de *G. vaginalis*. Donc, on peut noter que les lactobacilles vaginaux ont un effet antimicrobien sur la majorité des germes causant des infections génitales chez la femme.

Ainsi, selon le travail de **Pirje Hütt et al. (2016)**, les résultats de la production de l'acide lactique montrent que parmi les souches de *Lactobacillus* testées, les meilleurs producteurs d'acide lactique étaient *L. gasseri* (18,2±2,2 mg/ml) suivi de *L. crispatus* (15,6±2,8 mg/ml) et *L. jensenii* (11,6±2,6 mg/ml) et d'après **Er et al. (2019)**, le pourcentage de l'acide lactique produit par *L.crispatus* était 2.275% . Autre remarque a été signalée par **Gaspar et al. (2018)** que les acides organiques produits par *Lactobacillus* (consécutifs à la fermentation des glucides) induisent une diminution du pH du milieu. L'approche de fermentation en batch confirme une diminution du pH résultant de l'accumulation d'acide organique dans le milieu extracellulaire. Ce qu'on peut conclure que tous les lactobacilles vaginaux ils ont la capacité de produire l'acide lactique avec une quantité qui se varie d'une espèce à une autre.

Conclusion

Gaspar et al. (2018) ont mentionnés que l'extrait de bactériocine de la souche LaKS400 a une activité antimicrobienne contre la souche indicatrice (*L.delbrueckii*), *G.vaginalis*, *S.agalactiae* et *P.aeruginosa*. Aucun effet antimicrobien n'a été observé contre les souches d'*E.coli*, de *S.aureus* et de *C. albicans*. A partir de ce travail, on peut conclure que les lactobacilles vaginaux peuvent produire des bactériocines qui ont un effet antimicrobien remarquable sur les agents pathogènes les plus répons dans les infections vaginales.

Selon la littérature, des travaux réalisés par **Ocaña et al. (1999)** et **Vera Pingitore et al. (2009)** ont montré que la souche *L. salivarius* CRL 1328 isolée du vagin humain produire une bactériocine thermostable salivaricine CRL 1328 de la sous classe IIb. Cette bactériocine est active contre les bactéries potentiellement pathogènes urogénitales telles qu'*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* et *Neisseria gonorrhoeae*. Ainsi **Toba et al. (1991)** et **Kawai et al. (2001)** ont confirmé que la souche *L.reuteri* LA6 d'origine humain mais non vaginal peuvent également produire une bactériocine active à la fois de manière bactéricide et bactériolytique contre les cellules sensibles. Cette bactériocine a été appelée reutéricine 6, s'est avérée être une bactériocine cyclique de classe II.

Le potentiel probiotique de *L. salivarius* et *L.reuteri* d'origine vaginale n'a pas encore été pleinement exploité, mais les découvertes à ce jour ont démontré que ces deux espèces pourraient être des candidats fiable pour une utilisation comme nouveaux probiotiques. D'autres études peuvent être menées pour améliorer la production de bactériocine, l'isolement, la purification et élucider son éventuel mécanisme d'action. Des études sont aussi nécessaires pour délimiter les activités de l'acide lactique protoné par rapport à l'anion lactate, ainsi que les propriétés spécifiques des isomères de l'acide D et L-lactique, sur les cellules épithéliales et immunitaires pertinentes dans le tractus génital inférieur pour la sélection de la souche probiotique la plus optimale.

Références
bibliographiques

- **Aguilar-Uscanga, B. R., Solís-Pacheco, J. R., Plascencia L., Aguilar-Uscanga, M.G., García, H. S. and Lacroix, M. (2013).** Effect of culture medium on bacteriocin production by *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus reuteri* ATCC 53608. International peer-reviewed scientific online journal, 2 (6): 2462-2468.
- **Al Baghdadi, O., Ewies, A.A.A. (2009),** Topical estrogen therapy in the management of postmenopausal vaginal atrophy: An up-to-date overview. *Climacteric*, 12 (2): 91-105.
- **Al Mosaid, A., Sullivan, D. J. and Coleman, D. C. (2003) -** Differentiation of *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* on Pal's agar. *J. Clin. Microbiol*, 41:4787-4789.
- **Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., Helander, I.M. (2000).** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol*, 66: 2001-5.
- **Amabebe, E. and Anumba DOC. (2018).** The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front. Med*, 5:181.
- **Amouri, I., Abbes, S., Sellami, H., Makni, F., Sellami, A., Ayadi, A. (2010).** La candidose vulvovaginale : revue. *J Mycol Médicale J Med Myco*, 15-108.
- **Andersch, B., Forssman, L., Lincoln, K., Torstensson, P. (1986).** Treatment of bacterial vaginosis with an acid cream: a comparison between the effect of lactate-gel and metronidazole. *Gynecol Obstet Invest*, 21:19-25.
- **Andersch, B., Lindell, D., Dahlen, I., Brandberg, A. (1990).** Bacterial vaginosis and the effect of intermittent prophylactic treatment with an acid lactate gel. *Gynecol Obstet Invest*, 30:114-9.
- **Anonyme 1. (2013).** Gouvernement du Canada A de la santé publique du C. Pertes vaginales (vaginose bactérienne, candidose vulvo-vaginale, trichomonose) - Section 4 - Prise en charge et traitement de syndromes spécifiques - Lignes directrices canadiennes sur les infections transmissibles sexuellement – Agence de la santé publique du Canada..
- **Anonyme 2. (2001).** **FAO/WHO** Report Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria.
- **Aroutcheva A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J.A., et al. (2001).** Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*, 185:375 -9.

- **Bahamondes, M.V., Portugal, P.M., Brolazo, E.M., Simoes, J.A., Bahamondes, L.** (2011). Use of a lactic acid plus lactoserum intimate liquid soap for external hygiene in the prevention of bacterial vaginosis recurrence after metronidazole oral treatment. *Rev Assoc Med Bras*, 57:415.
- **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.
- **Barrett, E., Hayes, M., O'Connor, P., Gardiner, G., Fitzgerald, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., Hill, C.,** (2007). Salivaricin P, one of a family of two-component anti-listerial bacteriocins produced by intestinal isolates of *Lactobacillus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 3719 -3723.
- **Bechelaghem N,** (2017). Etude des *Lactobacillus* vaginaux : Identification, effets protecteurs, facteurs de déséquilibre et moyens de régénéscence, thèse du doctorat Université de Abdelhamid Ibn Badis-Mostaganem-Algérie ; 84p.
- **Bechelaghem,N., Djibaoui, R., Ettalhi, M., Arabi, A.,** (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
- **Berrebi, A. and Ayoubi, J.** (1999). Le déséquilibre de la flore vaginale. *Genesis : Gynecologie obstétrique – Endocrinologie*, 44:1-4.
- **Bisanz, J. E., Seney, S., McMillan, A., Vongsa, R., Koenig, D., Wong, L., et al.** (2014). A systems biology approach investigating the effect of probiotics on the vaginal microbiome and host responses in a double blind, placebo-controlled clinical trial of post-menopausal women. *PLoS One*, 9 (8): e104511.
- **Bodaszewska-Lubas, M., Brzywczy-Wloch, M., Gosiewski, T., Heczko PB.** (2012). Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins-pilot study. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 66:787-794.
- **Bohbot, J.M., Lepargneur, J.P** (2012)., La vaginose en (2011) : encore beaucoup d'interrogations. *Gynécologie Obstétrique Fertil*, 6-31.
- **Bongaerts, G. P., J. J. Tolboom., A. H. Naber., W. J. Sperl., R. S. Severijnen., J. A. Bakkeren, and J. L. Willems.** (1997). Role of bacteria in the pathogenesis of short bowel syndrome-associated Dlactic acidemia. *Microb. Pathog*, 22:285-293.
- **Borges, S., Silva, J., Teixeira P.** (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet*, 289:479-89.

- **Boris, S., Barbes, C.** (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect*, 2:543-6.
- **Bouchard, D.S., Seridan, B., Saraoui, T., Rault, L., Germon, P., GonzalezMoreno, C., Nader-Macías, F.M., Baud, D., François, P., Chuat, V., Chain, F., Langella, P., Nicoli, J., Le Loir, Y., Even S.** (2015). Lactic acid bacteria isolated from bovine mammary microbiota: potential allies against bovine mastitis. *PLoS One*, 10(12): 0144831.
- **Brin, M.** (1965). The synthesis and metabolism of lactic acid isomers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **119**:942-954.
- **Busarcevic, M., Dalgalarondo, M.** (2012). Purification and genetic characterisation of the novel bacteriocin LS2 produced by the human oral strain *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40:127-134.
- **Busarcevic, M., Kojic, M., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertle, T., Topisirovic, L.** (2008) Purification of bacteriocin LS1 produced by human oral isolate *Lactobacillus salivarius* BGHO1. *Oral Microbiol. Immunol*, 23:254 -258.
- **Chander, J.** (2009). -Candidiasis. *In: A text book of Medical Mycology*, Mehta Publishers
- **Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., et al.** (2017). The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat. Commun*, 8, 875.
- **Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P.** (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 777-788.
- **Cribby, S., Michelle, T., Gregor, R.** (2008). Vaginal Microbiota and the Use of Probiotics. *Hindawi Publishing Corporation*, 10- 9.
- **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 TropDis*, 4(1) : 18-24.
- **Datcu, R., Gesink, D., Mulvad, G., Montgomery-Andersen, R., Rink, E., Koch, A., Ahrens, P., Jensen, J.S.** (2013). Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. *BMC Infect Dis*, 13:480.
- **De Gregorio, P.R., Juarez Tomas, M.S., Leccese Terraf, M.C., Nader-Macias, M.E.** (2014). In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. *J Med Micro-biol*, 63:685 - 96.

Références bibliographiques

- **De Gregorio, P.R., Juárez Tomás ,M.S., Nader-Macías, M.E. (2016).** Immunomodulation of *Lactobacillus reuteri* CRL1324 on Group B Streptococcus Vaginal Colonization in a Murine Experimental Model. *Am J Reprod Immunol*, 75(1):23-35.
- **Decena, D.C., Co, J.T., Manalastas, J.r. R.M., Palaypayon, E.P., Padolina, C.S., Sison, J.M., et al. (2006).** Metronidazole with Lactacyd vaginal gel in bacterial vaginosis. *J Obstet Gynaecol Res*;32:243 -51.
- **Dei, M., Di Maggio, F., Di Paolo, G., Bruni, V. (2010).** Vulvovaginitis in childhood. *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 24: 129-137.
- **Delorme, J., A. Robert., Mycologie médicale. Decarie, Parasitologie – Mycologie. (1997).**
- **Di Paola, M., Sani, C., Clemente, A.M., Iossa, A., Perissi, E., Castronovo, G., Tanturli, M., Rivero, D., Cozzolino, F., Cavalieri, D., et al. (2017).** Characterization of cervico-vaginal microbiota in women developing persistent high-risk Human Papillomavirus infection. *Sci. Rep*, 7, 10200.
- **Dobson, A., Cotter, P., Ross, P., Hill, C., (2012).** Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 16.
- **Döderlein, A. (1894).** Das Scheidensekret und seine Bedeutung fiir Puerperalheber. *ZbL. Bald*, 11:699.
- **Donders, G.G. (2007).** Definition and classification of abnormal vaginal flora. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol*, 21: 355-373
- **Donders, G.G., Bellen, G., Grinceviciene, S., Ruban, K., Vieira-Baptista, P. (2017).** Aerobic vaginitis: No longer a stranger. *Res. Microbiol*, 168:845-858.
- **Donders, G.G., Vereecken, A., Bosmans, E., DeKeersmaecker, A., Salembier, G., Spitz, B. (2002).** Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: Aerobic vaginitis. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol*, 109 : 34-43.
- **Dover, S.E., Aroutcheva, A.A., Faro, S., Chikindas, M.L. (2008).** Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *Int J Probiotics Prebiotics*, 3:219-230.
- **Drell, T., Lillsaar, T., Tummeleht, L., Simm, J., Aaspollu, A., Vain, E., Saarma, I., Salumets, A., Donders, G.G., Metsis, M. (2013).** Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian women. *PLoS One*, 8:543-79.

- **Eade, C.R.,** Diaz, C., Wood, MP., et al. (2012) Identification and characterization of bacterial vaginosis-associated pathogens using a comprehensive cervical-vaginal epithelial coculture assay. *PLoS One*, 7: 501-06.
- **Er. Sevda.,** Ümit .Can. Erim., Fatma. Koç3., Merih. Kıvanç. (2019). Identifying probiotic characteristics of *Lactobacillus crispatus* isolated from the vagina. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55: e17507
- **Eschenbach, D. A.** (1993). Bacterial vaginosis and anaerobes in obstetric-gynecologic infection. *Clin. Infect. Dis.* 16 Suppl 4:S282-S287.
- **Eschenbach, D. A.,** D. L. Patton., T. M. Hooton., A. S. Meier., A. Stapleton., J. Aura., and K. Agnew. (2001). Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. *J. Infect. Dis*, 183:913-918.
- **Eschenbach, D. A.,** S. S. Thwin., D. L. Patton., T. M.Hooton., A. E. Stapleton., K. Agnew., C. Winter., A. Meier., and W. E. Stamm. (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin. Infect. Dis*, 30: 901-907.
- **Falagas. M.,** Betsi, G.I., Athanasiou, S. (2007). Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect*, 13: 657-64.
- **Felis, G. E.,** and F. Dellaglio. (2007). Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. *Curr. Iss. Intest. Microbiol*, 8:44-61.
- **Forney, L.J.,** Gajer, P., Williams, C.J., Schneider, G.M., Koenig, S.K., McCulle, S.L., Karlebach, S., Brotman, R.M., Davis, C.C., Ault, K., et al. (2010). Comparison of self-collected and physician-col-lected vaginal swabs for microbiome analysis. *J Clin Microbiol*, 48:1741-1748.
- **Forsum, U.,** E. Holst., P. G. Larsson., A. Vasquez., T. Jakobsson., and I. Mattsby Baltzer. (2005). Bacterial vaginosis - a microbiological and immunological enigma. *A. P. M. I. S.* 113:81-90.
- **Gaspar. C.,** Donders. G.G., Palmeira-de-Oliveira.R., Queiroz. J.A., Tomaz. C., Martinez-de-Oliveira.J ; and Palmeira-de-Oliveira. A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. *AMB Expr*, 8:153.
- **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: 614.

Références bibliographiques

- **Gille, C., Boer, B., Marschal, M., Urschitz, M. S., Heinecke, V., Hund, V., et al.** (2016). Effect of probiotics on vaginal health in pregnancy. EFFPRO, a randomized controlled trial. *Am. J. Obstet. Gynecol*, 215: 6081-6087.
- **Goncalves, B., Ferreira, C., Alves, C.T., Henriques, M., Azeredo, J., Silva, S.** (2016). Vulvovaginal candidiasis: epidemiology, microbiology and risk factors. *Crit Rev Microbiol*, 42:905 - 27.
- **Gong, Z., Luna, Y., Yu, P., Fan, H.** (2014). Lactobacilli inactivate Chlamydia trachomatis through lactic acid but not H₂O₂. *PLoS One*, 9:107758.
- **Gopi, G. R., Ganesh, N., Pandiaraj, S., Sowmiya, B., Brajesh, R. G., and Ramalingam, S.** (2015). A study on enhanced expression of 3-hydroxypropionic acid pathway genes and impact on its production in *Lactobacillus reuteri*. *Food Technol. Biotechnol*, 53: 331-336.
- **Greifova, G., Majekova, H., Greif, G., Body, P., Greifova, M., and Dubnickova, M.** (2017). Analysis of antimicrobial and immunomodulatory substances produced by heterofermentative *Lactobacillus reuteri*. *Folia Microbiol*, 62 :515-524.
- **Gudiña, E.J., Rocha, V., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R.** (2010). Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* A20. *Lett Appl Microbiol*, 50:419-424.
- **Hammes, W. P., and R. F. Vogel.** (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria*. Wood, B.J. and W. H. Holzapfel (Eds). Chapman & Hall, London, pp. 19-54.
- **Haya, J., Africa, G., Carlos, L.M., Maher, B., Lara, H.** (2014). Importance of lactic acid in maintaining vaginal health: à review of vaginitis and vaginosis etiopathogenic bases and a proposal for a new treatment. *Open Journal of Obstetrics and Gynecology*,4:787-799.
- **Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E.** (2014). Expert consensus document: the International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastro Enterol Hepatol*, 11:506-514.
- **Hou, C., Zeng, X., Yang, F., Liu, H., and Qiao, S.** (2015). Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol*, 6:14.

Références bibliographiques

- **Indrio, F., Riezzo, G., Raimondi, F., Bisceglia, M., Cavallo, L., and Francavilla, R.**(2008). The effects of probiotics on feeding tolerance, bowel habits, and gastrointestinal motility in preterm newborns. *J. Pediatr*,152 :801-806.
- **Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E. A.** (1976). Review of Medical Microbiology. 20th ed.: Lange medical publication, 545p.
- **Jespers, V., Menten, J., Smet, H., Poradosu, S., Abdellati, S., Verhelst, R., Hardy, L., Buve, A., Crucitti, T.** (2012). Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*, 12:83.
- **Jones, S.E., and Versalovic, J.** (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiol*, 9:35.
- **Joo, H.M., Hyun, Y.J., Myoung, K.S., Ahn, Y.T., Lee, J.H., Huh, C.S., Han, M.J., Kim, D.H.** (2011). *Lactobacillus johnsonii* HY7042 ameliorates *Gardnerella vaginalis*-induced vaginosis by killing *Gardnerella vaginalis* and inhibiting NF-κB activation. *Int Immunopharmacol*, 11:1758-1765.
- **Jorgensen, M. R., Kragelund, C., Jensen, P. O., Keller, M. K., and Twetman, S.** (2017). Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species *in vitro*. *J. Oral Microbiol*, 9:1274582.
- **Juarez Tomas, M.S., Saralegui Duhart, C.I., De Gregorio, P.R., Vera Pingitore, E., Nader-Macias, M.E.** (2011).Urogenital pathogen inhibition and compatibility between vaginal *Lactobacillus* strains to be considered as probiotic candidates. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 159:399-406.
- **Kaambo, E., Africa, C., Chambuso, R., Passmore, J.-A.S.** (2018). Vaginal Microbiomes Associated With Aerobic Vaginitis and Bacterial Vaginosis. *Front. Public Health* ,6, 78.
- **Kaur, B., Balgir, P.P., Mittu, B., Kumar, B., Garg, N.** (2013). Biomedical applications of fermenticin HV6b isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *Biomed Res Int*, 168438.
- **Kawai, Y., Ishii, Y., Uemura, K., Kitazawa, H., Saito, T. and Itoh, T.** (2001). *Lactobacillus reuteri* LA6 and *Lactobacillus gasseri* LA39 isolated from faeces of the same human infant produce identical cyclic bacteriocin. *Food Microbiol*, 18 :407-415.

- **Klaenhammer, T.R.** (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12:39-85.
- **Klebanoff, S.J., Coombs, R.W.** (1991). Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in hetero-sexual transmission. *J Exp Med*, 174:289-92.
- **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*, 164:94 -100.
- **Kling, D.E., Cavicchio, A.J., Sollinger, C.A., Madoff, L.C., Schnitzer, J.J., Kinane TB.** (2009). Lactic acid is a potential virulence factor for group B *Streptococcus*. *Microb Pathog*, 46:43- 52.
- **Leccese Terraf, M.C., Juárez Tomás, M.S., Nader-Macías, M.E., Silva, C.** (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *J Appl Microbiol*, 113:1517-1529.
- **Lee, J.E., Lee, S., Lee, H., Song, Y.M., Lee, K., Han, M.J., Sung, J., Ko, G.** (2013). Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PLoS One*, 8:63514.
- **Lepargneur, J. and Rousseau, V.** (2002). Rôle protecteur de la flore de Doderleïn. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 31:485-494.
- **Lepargneur, J.P.** (2016). *Lactobacillus crispatus*, biomarqueur de l'écosystème vaginal sain. *Ann Biol Clin*, 74(4) : 421-7.
- **Leyva-Gómez, G., María, L., Del. Prado-Audelo., Silvestre. Ortega-Peña., Néstor. Mendoza-Muñoz., Zaida. Urbán-Morlán., Maykel. González-Torres., Manuel. González-Del. Carmen., Gabriela. Figueroa-González., Octavio, D. Reyes-Hernández and Hernán, Cortés.** (2019). Modifications in Vaginal Microbiota and Their Influence on Drug Release: Challenges and Opportunities. *Journal pharmaceuticals*, 11, 217.
- **Li, J., Aroutcheva, A.A., Faro, S., Chikindas, M.L.** (2005). Mode of action of lactocin 160, a bacteriocin from vaginal *Lactobacillus rhamnosus*. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 13:135-140.
- **Macklaim, J.M., Fernandes, A.D., Di Bella, J.M., Hammond, J.A., Reid, G., Gloor, G.B.** (2013). Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*, 1:12.

Références bibliographiques

- **Macklaim, J. M.,** Clemente, J. C., Knight, R., Gloor, G. B., and Reid, G. (2015). Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy. *Microb. Ecol. Health Dis*, 26:27799.
- **MacPhee, R.A.,** Hummelen, R., Bisanz, J.E., Miller, W.L., Reid, G. (2010). Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis. *Expert Opin Pharmacother*;11:2985-95.
- **Madhivanan, P.,** Raphael, E., Rumphs, A., Krupp, K., Ravi, K., Srinivas, V., Arun, A., Reingold, A.L., Klausner, J.D., Riley, L.W. (2014). Characterization of culturable vaginal *Lactobacillus* species among women with and without bacterial vaginosis from the United States and India: a cross-sectional study. *J Med Microbiol*, 63:931-935.
- **Maggi, L.,** Mastromarino, P., Macchia, S., Brigidi, P., Pirovano, F., Matteuzi, 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.
- **Maisey, H.C.,** Doran, K.S., Nizet, V. (2008). Recent advances in understanding the molecular basis of group B *Streptococcus* virulence. *Expert Rev Mol Med*; 10: e27.
- **Marie, M.,** (2018) - Intérêt des probiotiques dans la prise en charge des infections vaginales à l'officine ; thèse de doctorat ; Université de Caen Normandie France ; 109p.
- **Martín, D.H.,** Zozaya, M., Lillis, R., Miller, J., Ferris, M.J. (2012). The microbiota of the human genitourinary tract: trying to see the forest through the trees. *Trans Am Clin Climatol Assoc*, 123:242-256.
- **Martín, R.,** Soberón, N., Vanechoutte, M., Flórez, A.B., Vázquez, F., Suárez, J.E. (2008). Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates. *Int Microbiol*, 11:261-266.
- **Martín, R.,** Suárez, J.E. (2010). Biosynthesis and degradation of H₂O₂ by vaginal lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 76:400-405.
- **McCabe, K.,** M. D. Mann., and M. D. Bowie. (1998). D-lactate production and [14C] succinic acid uptake by adherent and nonadherent *Escherichia coli*. *Infect. Immun*, 66:907-911.
- **Menard, J.P.** (2011). Antibacterial treatment of bacterial vaginosis: Current and emerging therapies. *International Journal of Women's Health*, 3: 295-305.

- **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*, 196:1458-70.
- **Mirmonsef, P.**, Gilbert, D., Veazey, R.S., Wang, J., Kendrick, S.R., Spear, G.T. (2012). A comparison of lower genital tract glycogen and lactic acid levels in women and macaques: implications for HIV and SIV susceptibility. *AIDS Res Hum Retrovir*, 28:76-81.
- **Mishra, S. K.**, Malik, R. K., Manju, G., Pandey, N., Singroha, G., Behare, P., et al. (2012). Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus reuteri* BPL-36 strain isolated from human infant fecal sample. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 4:54-161.
- **Mu, Q.**, Tavella, V.J and Luo, X.M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in Human Health and Diseases. *Front. Microbiol*, 9:757.
- **Nader-Macías, M.E.F.**, Silva de Ruiz, C., Ocaña, V.S., Juárez Tomás, M.S. (2008). Advances in the knowledge and clinical applications of lactic acid bacteria as probiotics in the urogenital tract. *Curr Women's Health Rev*, 4:240-257.
- **Nugent, R.P.**, Krohn, M.A., Hillier, S.L. (1991). Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*, 297-301.
- **O'Hanlon, D.E.**, Lanier, B.R., Moench, T.R., Cone, R.A. (2010). Cervicovaginal fluid and semen block the microbicidal activity of hydrogen peroxide produced by vaginal lactobacilli. *BMC Infect Dis*, 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*; 8:80074.
- **O'Shea, E.F.**, O'Connor, P.M., Raftis, E.J., O'Toole, P.W., Stanton, C., Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C., (2011). Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Bacteriology* 193, 6973-6982.
- **Ocaña, V.S.**, Pesce de Ruiz Holgado, A.A., Nader-Macias, M.E. (1999). Selection of vaginal H₂O₂-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. *Curr Microbiol*, 38:279-84.

- **Ocaña**, V.S., Pesce de Ruiz Holgado, A., Nader-Macias, M.E. (1999) Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5631-5635.
- **Oelschlaeger**, T.A. (2010). Mechanisms of probiotic actions-a review. *Int J Med Microbiol*, 300:57-62.
- **Ojala**, T., Kankainen, M., Castro, J., Cerca, N., Edelman, S., Westerlund- Wikstrom B, et al. (2014). Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. *BMC Genom*, 15:1070.
- **Petricevic**, L., Unger, F. M., Viernstein, H., and Kiss, H. (2008). Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol*, 141 :54-57.
- **Pirje Hütt.**, Eleri Lapp., Jelena Stsepetova., Imbi Smidt., Heleri Taelma., Natalja Borovkova., Helen Oopkaup., Ave Ahelik., Tiiu, Roop., Dagmar Hoidmets., Külli Samuel., Andres Salumets., and Reet Mandar (2016). Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microbial Ecology in Health & Disease*, 27:30484
- **Priestley**, C. J., B. M. Jones, J. Dhar, and L. Goodwin. (1997). What is normal vaginal flora? *Genitourin. Med*, 73:23-28.
- **Pybus**, V., and Onderdonk, A. (1999). Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes and Infection*, 1:285-292.
- **Quentin**, R. (2006). *Ecologie bactérienne vaginale : Nature, exploration et prise en charge des déséquilibres* In collège national des gynécologues et obstétriciens français. . Extrait des Mises à jour en Gynécologie et obstétrique Tome XXX.
- **Ran**, G., Mladenovi, V. (2012). Microbiological aspects of vulvovaginitis in prepubertal girls. *Eur. J. Pediatr*, 171: 1203-1208.
- **Ravel**, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G.M., Koenig, S.S., McCulle, S.L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C.O., et al. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1:4680-4687.
- **Redondo-Lopez**, V., R. L. Cook., and J. D. Sobel. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis*, 12:856-872.

Références bibliographiques

- **Santos**, C.M., Pires, M.C, Leao, T.L., Hernandez, Z.P., Rodriguez, M.L., Martins, A.K., et al. (2016). Selection of *Lactobacillus* strains as potential pro-biotics for vaginitis treatment. *Microbiology*, 162:1195-207.
- **Schwebke**, J. R., C. M. Richey, and H. L. Weiss. (1999). Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *J. Infect. Dis*, 180:1632-1636.
- **Selle**, K., Klaenhammer, T.R. (2013). Genomic and phenotypic evidence for probiotic influences of *Lactobacillus gasseri* on human health. *FEMS Microbiol Rev*, 37:915-35.
- **Senok**, A.C., Verstraelen, H., Temmerman, M., Botta, G.A. (2009). Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev*; 4:CD006289.
- **Skarin**, A., and J. Sylwan. (1986). Vaginal lactobacilli inhibiting growth of *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* and other bacterial species cultured from vaginal content of women with bacterial vaginosis. *Acta. Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.B*, 94:399-403.
- **Smith**, B.C, McAndrew, T., Chen, Z., Harari, A., Barris, D.M., Viswanathan, S., Rodriguez, A.C, Castle, P., Herrero, R., Schiffman, M., Burk, R.D. (2012). The cervical microbiome over 7 years and a comparison of methodologies for its characterization. *PLoS One*, 7:40425.
- **Smith**, S. M., R. H. Eng., J. M. Campos., and H. Chmel. (1989). D-lactic acid measurements in the diagnosis of bacterial infections. *J. Clin. Microbiol*, 27:385-388.
- **Sobel**, J.D. (2007). Vulvovaginal candidosis, *The Lancet*, 369: 1961-1971.
- **Spear**, G.T., French, A.L., Gilbert, D., Zariffard, M.R., Mirmonsef, P., Sullivan, T., et al. (2014). Human amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid process glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. *J Infect Dis*, 210: 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. *Plos One*, 10: 0132646.
- **Spiegel**, C. A., R. Amsel., D. Eschenbach., F. Schoenkecht., and K. K. Holmes. (1980). Anaerobic bacteria in nonspecific vaginitis. *N. Engl. J. Med*, 303:601-607.
- **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.

Références bibliographiques

- **Spinler, J. K.,** Taweechotipatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., and Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14 : 166-171.
- **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*, 5:10197.
- **Stone, A.** (2002). Microbicides: a new approach to preventing HIV and other sexually transmitted infections. *Nature Rev*, 1:977-985.
- **Stoyancheva, G.,** Marzotto, M., Dellaglio, F., Torriani, S. (2014). Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol*, 196:645-653.
- **Strahinic, I.,** Busarcevic, M., Pavlica, D., Milasin, J., Golic, N., Topisirovic, L. (2007). Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. *Oral Microbiol. Immunol*, 22:111-117.
- **Tachedjian, G.,** Aldunate, M., Bradshaw, C.S., Cone, R.A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology* 168 782-792.
- **Tempera, G.,** Abbadessa, G., Bonfiglio, G., Cammarata, E., Cianci, A., Corsello, S., Raimondi, A., Ettore, G., Nicolosi, D., Furneri, P.M. (2006). Topical Kanamycin: An Effective Therapeutic Option in Aerobic Vaginitis Topical. *J. Chemotherapy*, 18 :409-414.
- **Toba, T.,** SAMANT, SK., YOSHIOKA, E., ITOH, T. 1991. Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett Appl Microbiol*, 13: 281-286.
- **Vera Pingitore, E.,** Hébert, E.M., Nader-Macías, M.E., Sesma, F., (2009). Characterization of salivaricin CRL 1328, a two-peptide bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 isolated from the human vagina. *Research in Microbiology*, 160: 401- 408.
- **Wilks, M.,** and S. Tabaqchali. (1987). Quantitative bacteriology of the vaginal flora during the menstrual cycle. *J. Med. Microbiol.* 24:241-245.
- **Yamamoto, T.,** Zhou, X., Williams, C.J., Hochwalt, A., Forney, L.J. (2009). Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women. *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, 22, 11-18.

Références bibliographiques

- **Yang, Y., Zhao, X., Le, M. H., Zijlstra, R. T., and Ganzle, M. G.** (2015). Reutericyclin producing *Lactobacillus reuteri* modulates development of fecal microbiota in weanling pigs. *Front. Microbiol*, 6:762.
- **Zhou, X., Hansmann MA., Davis, C.C., Suzuki, H., Brown, C.J., Schutte, U., Pierson J.D., Forney, L.J.** (2010). The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 58:169-181.

Annexe

Composition des milieux et tampon utilisés.

Milieux liquides

MRS Bouillon (MRSB)

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

Bouillon MRS, modifié

Dextrose	20 g
Protéose peptone	10g
Extrait de levure	5g
L'acétate de sodium	5g
Alcool 2-phényléthylique.....	3g
Citrate d'ammonium	2g
Phosphate dipotassique.....	2g
Sulfate de magnésium	0,1g
Sulfate de manganèse	0,05g
Vert de bromocrésol.....	0,04g
Cycloheximide	0,004g
Eau distillée.....	1000 ml

pH=4,3 ± 0,2

Bouillon Schaedler (Oxoid)

Bouillon de tryptone soja	10g
Peptone spéciale.....	5g
Extrait de levure.....	5g
Glucose	5g
Chlorure de sodium	4g
Cystéine HCl	0,4g
Tampon Tris.....	0,75g
Haemin.....	0,01g
Vitamine K1.....	0,002g
Agar.....	13,5g
Sang de mouton défibriné	50 ml
Eau distillée.....	1000 ml

pH= 7.6 ± 0.2

Bouillon nutritif (BN)

Peptone.....	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Eau distillée.....	1000ml

pH=7,3±0,2

Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

Digestion pancréatique de gélatine	14,5 g
Infusion cœur cerveau (matières solides)	6 g
Digestion peptique de tissu animal	6g
Dextrose	3 g
Chlorure de sodium	5g
Phosphate disodique	2,5 g
Supplément de Fildes	50 ml
Eau distillée.....	1000ml

pH =7,4 ± 0,2

Tryptic Soy Broth (TSB)

Tryptone (digestion pancréatique de caséine).....	17 g
Soytone (digestion peptique de farine de soja	3g
Glucose (dextrose)	2,5g
Chlorure de sodium.....	5g
Phosphate d'hydrogène dipotassique	2,5g
Eau distillée.....	1000ml

pH 7,3 ± 0,2.

Bouillon NYCIII:

HEPES (CellGro)	2,4 g
Protéose Peptone n ° 3	15 g
Extrait de levure.....	3,8 g
NaCl.....	5 g
Glucose	5 g
Eau.....	900 ml

pH de 6,7.

Milieux semi-solides

Sabouraud

Peptone	10g
Glucose.....	20g
Agar.....	7,5g
Eau distillée.....	1000 ml

pH=5,7± 0,2.

Gélose nutritive

Peptone.....	6g
Extrait de viande	1g
Extrait de levure	2g
NaCl	5g
Agar	7g
Eau distillée.....	1000 ml

pH=7,3±0,2

Milieux solides

Gélose MRS

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

Gardnerella Selective Agar with 5% Human Blood

Digestion pancréatique de caséine	12 g
Chlorure de sodium.....	5g
Digestion peptique de tissu animal.....	5g
Peptone de protéose	10g
Colistine	0,01g
Extrait de levure	3g
Acide nalidixique	0,01g
Extrait de bœuf	3g
Amphotéricine B.....	0,004g
Amidon de maïs	1g
Sang humain défibriné.....	5 %
Agar.....	13,5g

pH =7,3 ± 0,2.

Composition du tampon

Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)

La composition du PBS (1X) est le chlorure de sodium 137 mM, le phosphate 10 mM, le chlorure de potassium 2,7 mM; Le pH est de 7,4.