



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie

MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. :

Présenté et soutenu par :
FELLOUSSA Raouia et AKKOUCHE Soumia

Le : jeudi 30 juin 2022

Thème L'effet probiotique des *Lactobacillus* vaginale

Jury :

Mme. BENGHERCHIE Fatiha	MCB	Université de Biskra	Président
M. BENKADDOUR Bachir	MCA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. DENDOUGA WASSILA	MCA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

Remerciements

Nous tenons à exprimer notre profonde reconnaissance à DIEU tout puissant, parce que c'est grâce à lui seul que nous avons eu le courage, la force et la patience pour avancer dans la vie et achever ce mémoire.

Nous tenons à remercier

En premier lieu, notre promoteur ***Benkaddour Bachir*** pour son bon encadrement, sa patience et ses conseils précieux, son aide et sa rigueur scientifique qui nous a illuminés pour l'élaboration de ce mémoire.

Tous les membres de jury qui ont bien voulu examiner notre travail.

Tous les enseignants et enseignantes de biologie à l'université el hadjeb pour leur patience et aide.

Tous ceux qui ont participé de loin ou de près dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

A mes très chers parents :

Tant de phrases et d'expressions, aussi éloquentes soient-elles, ne peuvent exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Vos conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite.

Votre patience sans fin, votre compréhension et vos encouragements sont pour moi le principal soutien que vous avez toujours su m'apporter. Ce travail aujourd'hui est le fruit des sacrifices que vous avez consentis pour ma formation. Je te dois qui je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour être une source de fierté pour toi.

A mon très cher père : Felloussa Said

A celui qui m'a appris que le monde est un combat, et que son arme est le savoir, à celui qui m'a tout épargné, à celui qui a recherché mon confort et ma réussite, à l'homme le plus grand et le plus cher de l'univers.

A ma très chère mère : Bouhamed Habiba

A celle qui m'a soutenu dans ses prières et ses supplications à celle qui est restée éveillée les nuits éclairant mon chemin à celle qui me partage mes joies et souffrances à la source de bonté et de tendresse Au plus beau sourire de ma vie à la plus merveilleuse femme dans l'existence.

A mon très cher frère et ma chère sœur.

A mes cher amis achwek, houda.

A mon binome soumia.

Felloussa Raouia.

Dédicaces

Mes sincères reconnaissances et gratitude à mon Dieu tout puissant pour tout ce qu'il m'a offert. Je ne pourrais jamais le remercier ainsi qu'il mérite.

Je dédie ce travail à tout ce qui m'est chers au coeur.

A mes très chers parents Nasser-eddine & Malika, qui ont toujours été avec moi, toutes les pages de ce mémoire ne suffisent pas pour les remercier ainsi qu'ils méritent, que Dieu leur accorde une longue vie.

A mon mari Abdelkader qui était toujours à mes côtés et qui m'a soutenue le long de mon parcours.

Mes très chers filles Khadidja et Lina, ainsi que mes chers fils Lokmane Abderrahim et Anes que dieu les protège tout au long de leur vie.

A mes très chers frères: Oussama, Zineb et leur petite famille ainsi que ma petite soeur Maroua, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A mon beau père Louanes que dieu le garde, mes beaux frères, mes belles soeurs et leur petite famille, et à toute la famille Ourradi.

A tous les membres de la famille : oncles, tantes, cousines et toute la famille Akkouche et Hammadi.

A mon binôme Raouia, avec laquelle ce travail a pu être accompli, ainsi qu'à toute sa famille.

A toutes mes camarades de microbiologie promotion 2022 ».

Soumia.

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Table des matières

Liste de tableaux.....I

Liste des figures II

Liste des abréviations..... III

Introduction 1

Partie 1: Synthèse bibliographique

Chapitre 1

1-1'écosystème vagina.....03

2- La microflore de Doderleïn03

3-Les facteurs favorisant de la flore vaginale..... 03

a) Facteurs physiologiques.....03

b) Facteurs pathologiques03

c) Facteurs thérapeutiques03

4-La microflore vaginale saine03

5-Le déséquilibre de la microflore vaginale04

a) Facteurs de déséquilibre 04

b) Mécanisme des infections04

c) La vaginose bactérienne04

d) La candidose vulvo-vaginale04

6- Action des lactobacilles vis-à-vis des germes pathogènes05

6-1- Inhibition de la croissance du pathogène.....05

a) Par production d'acide lactique05

b) Par production de peroxyde d'hydrogène H₂O₂05

c) Par production de bactériocines05

d) Par production de l'enzyme arginine désaminase05

Chapitre 2: Les lactobacilles vaginaux

1- Définition et données sur les lactobacilles vaginaux.....07

2- Caractères généraux07

2-1- Caractères morphologiques07

2-2- Caractères métaboliques et biochimique	07
3- Caractères physiologiques	08
3-1- Exigences nutritionnelles	08
4- Taxonomie et classification	08
Chapitre 3:	
Les probiotiques.....	09
1- Définition.....	09
2- Classification.....	09
3- L'application des probiotiques au niveau vaginal	09
4- L'efficacité des probiotiques dans le traitement et la prévention des infections vaginales	10
a) Probiotiques et vaginose bactérienne	10
b) Probiotiques et vulvo-vaginite candidosique	11
5- l'effet des probiotiques	11
Partie II : la partie expérimentale	
Chapitre 3. Matériels et méthodes	
1- Echantillonnage	12
2- Isolement	12
3- Identification.....	12
3-1- Identification moléculaire.....	12
4- Mise en évidence <i>in vitro</i> de propriétés probiotiques.....	13
a) Activité hémolytique	13
b) sensibilité aux antibiotiques et détermination de la CMI.....	13
c) Activité hydrolase des sels biliaires.....	13
5- Propriété fonctionnelle	13
a) Résistance aux conditions acides et aux sels biliaires	13
b) Tolérance aux lysozymes	14
c) Survie pendant le transit gastro-intestinal	14
d) Activité antagoniste contre les agents pathogènes	14
e) Capacités d'hydrophobicité.....	15
f) Capacités d'auto-agrégation et de co-agrégation	15
g) Production de peroxyde d'hydrogène	15
h) Formation du biofilm	15
i) Production d'exopolysaccharides	16

j) Test d'adhésion in vitro	16
k) Production d'acide lactique	16

Chapitre 4 .Résultats et discussion

1- Isolement et identification des lactobacilles vaginaux	17
2- Aspect sécuritaire	19
2-1- Activité hémolytique	19
2-2- Activité hydrolase des sels biliaires (BsH)	19
2-3- Tolérance aux sels biliaires	19
2-4- Sensibilité aux antibiotiques	22
2-5 Tolérance aux lysozymes	24
2-6 Survie pendant le transit gastro-intestinal	25
2-7- Activité antagoniste contre les agents pathogènes	27
2-8- Capacité d'hydrophobicité	28
2-9- Auto-agrégation	29
2- 10- La co-agrégation	31
2-11- Peroxyde d'hydrogène	31
2-12- Production d'acide lactique	32
2-13- Formation du biofilm	33
2-14- Production exopolysaccharides	34
2-15- Test d'adhésion in vitro	34
Conclusion	36
Bibliographie	38
Annexes	43
Résumé	

Liste des Tableaux

Tableau 1. Classification des probiotiques par genre et espèces.....	09
Tableau 2. Proposition de critères de sélection des probiotiques à application vaginale.....	10
Tableau 3. Analyse de nombre et pourcentage des souches <i>Lactobacillus</i> identifiées communs adoptée à partir 3 études réalisées par (Pino <i>et al.</i> , 2018 ; Aslim et Kilic, 2006 ; Al kassaa <i>et al.</i> , 2014).....	.18
Tableau 4. Les résultats de la tolérance aux sels biliaries.....	20
Tableau 5. Sensibilité aux antibiotiques mesurée par la méthode E-test.....	23
Tableau 6. Tolérance au lysozyme, exprimé en taux de survie (SR %) des souches de lactobacilles vaginales testées.....	24
Tableau 7. Survie (log ufc/mL) des souches de lactobacilles vaginaux pendant le transit gastro-intestinal in vitro.....	26
Tableau 8. Activité antimicrobienne contre les pathogènes gastro-intestinaux et urogénitaux.....	28
Tableau 9. Propriétés de surface du sous-ensemble de 10 souches de lactobacilles vaginaux.....	29
Tableau 10. Capacités de production de peroxyde d'hydrogène, de biofilm, d'exopolysaccharides, d'acide L- et D-lactique des souches de lactobacilles vaginaux testées.....	34

Liste des Figures

Figure 1 : Taux de survie des <i>Lactobacillus spp</i> Souches à pH 3 après 2 et 4 heures d'incubation (A) et à pH 2 après 2 et 4 heures d'incubation (B).....	20
Figure 2 : Adhésion (%) des lactobacilles à Caco-2 et aux cellules épithéliales vaginales VK2/E6E7.....	35

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr 16s : Acide Ribonucléique 16 Svedberg

AV : aerobic vaginitis

Bac : Bacillus

Bf : Bifidobacterium

BHI : brain heart infusion

BSH : Bile salt hydrolase

C : candida

°C : Degrés Celsius

CI: Densité cellulaire avant transit

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

DNTP : désoxyribonucléotide triphosphate quelconque.

DO : La densité optique

E: Escherichia

EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

En. faecalis : *Enterococcus faecalis*

EPS : Exopolysaccharide

Et : Enterococcus

FAO: Food and Agriculture Organization

G. vaginalis : *gardnerella vaginalis*

H : heur

HCL : Chlorure d'hydrogène

Hela : une lignée cellulaire cancéreuse utilisée en biologie cellulaire et en recherche médicale.

ISO : International Organization for Standardization,

KCl : Le chlorure de potassium

L: Lactobacilles

LAB : les bactéries lactiques

Lac : Lactococcus

Li. monocytogenes : *Listeria monocytogenes*

LSM : lymphocytes separation medium

Milieu MRS : Gélose de Man, Rogosa, Sharpe
MgCl : Le chlorure de magnésium
NaCl : Chlorure de Sodium
NaOH : L'hydroxyde de sodium
OD : la densité optique
ODc : Un critère de coupure de la densité optique
P. pentosaceus : *Pediococcus pentosaceus*
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pe: *Pediococcus*
pH : Potentiel Hydrogène
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
Sac : *saccharomyces*
SGJ: une exposition séquentielle au suc gastrique simulé
SIF: liquide intestinal simulé
S. pyogenes: *Streptococcus pyogenes*
S. pneumonia: *Streptococcus pneumoniae*
SR : Le taux de résistance
SR % : taux de survie
St : *Streptococcus*
T : Température
Taq : thermostable isolée à partir de *Thermus aquaticus*
TDCA : l'acide taurodésoxycholique
WHO : World Health Organization

Introduction

Introduction

La flore vaginale tient une place centrale dans la prévention des infections et l'équilibre physiologique de l'appareil urogénital féminin (Bergogne et Berezin, 2007 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

Chez une femme saine, la flore vaginale est un système bactérien dynamique et mouvant qui évolue en fonction des différents stades de la vie génitale. Ce système subit des variations suivant l'imprégnation hormonale (estrogènes), l'âge, la contraception, l'hygiène et l'activité sexuelle de la femme (Bergogne et Berezin, 2007 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).

La flore microbienne normale est principalement constituée de lactobacilles, appelés également bacilles de Döderlein, qui forment un biofilm sur la muqueuse. Les lactobacilles génitaux grâce à leurs propriétés antimicrobiennes assurent l'essentiel de la défense microbienne en inhibant la croissance, l'adhésion ou l'expansion d'autres micro-organismes.

L'équilibre écologique de la flore de Döderlein est parfois perturbé par l'utilisation de médicaments tels que les antibiotiques, les antifongiques ou les contraceptifs oraux. Des dispositifs à usage local peuvent également déséquilibrer la flore. Enfin, certains états peuvent être associés à un déséquilibre de la flore vaginale comme la grossesse ou une immuno-dépression. Cette perturbation de l'équilibre microbien de la flore vaginale favorise le développement de bactéries commensales ou l'infection par des pathogènes exogènes, la flore urogénitale est en effet remplacée par une flore pathogène : majoritairement *Gardnerella vaginalis* accompagnée de germes anaérobies pour la vaginose, *Candida albicans* pour les vaginites à levure et *Escherichia coli* pour les infections urinaires. En plus de ces désagréments, ces pathologies peuvent s'aggraver et engendrer des fausses couches, des infections de la partie haute de l'appareil génital ou augmenter le risque d'acquisition du virus du sida (Reid, 2001).

Ainsi, la flore vaginale est un élément de défense non négligeable contre les infections urinaires et vaginales touchant les femmes. Pour traiter ces pathologies, le recours aux antibiotiques et aux antifongiques est souvent de première intention. Néanmoins, ces traitements ne permettent pas toujours de retrouver une flore vaginale saine or cela permettrait d'éviter les récives. Ainsi depuis quelques années, l'intérêt s'est porté sur l'utilisation des probiotiques susceptibles de maintenir et de restaurer une flore vaginale normale.

Les lactobacilles vaginaux ont été découverts dans les années 1890 par Doderlein qui décrivit la flore vaginale comme homogène et constituée de bacilles Gram positif. Par la suite, dans les années 1900, Metchnikoff fut le précurseur de l'utilisation de lactobacilles dans le but

de restaurer la microflore intestinale via la consommation de laits fermentés. Puis, dans les années 1930, Molher et Brown furent les premiers à proposer un traitement des vaginites et de la vaginose par l'application d'une culture de bacilles de Doderleïn. L'idée de la bactériothérapie contre les infections vaginales est ainsi née, les lactobacilles du tractus vaginal sont essentiels pour se protéger contre les infections microbiennes.

Le rôle protecteur des lactobacilles vaginaux repose sur deux mécanismes principaux. Le premier mécanisme de protection est l'adhésion spécifique des lactobacilles au tissu vaginal, où la formation d'un biofilm peut inhiber l'adhésion des micro-organismes vaginaux pathogènes par plusieurs mécanismes (Borges *et al.*, 2014 ; Borges *et al.*, 2016 ; Boris *et al.*, 1998). Le deuxième mécanisme de protection est la production de substances antimicrobiennes (Verdenelli *et al.*, 2014).

Les probiotiques sont définis comme des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont administrés en quantité adéquate, confèrent un avantage pour la santé de l'hôte (Matthew *et al.*, 2006). Les probiotiques les plus étudiés appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*, qui ont été fréquemment associés à des effets bénéfiques sur la santé chez les humains et les animaux, (Soccol *et al.*, 2010 ; Di Gioia *et al.*, 2018). Les probiotiques améliorent les réponses du système immunitaire, la consistance des selles et la densité des lactobacilles vaginaux (Khalesi *et al.*, 2018 ; Singh *et al.*, 2017).

L'objectif principal de ce présent manuscrit est porté sur l'étude du potentiel probiotique des *Lactobacillus* vaginaux pour future utilisation dans le domaine alimentaire ou pharmaceutique.

Pour cela, une étude sous forme d'un article pris comme matériel et méthode (partie pratique) puis les résultats de cette étude sont analysés et comparé avec les résultats d'autres travaux en relation avec l'intitulé du manuscrit.

La rédaction de notre document se décline en 3 chapitres :

La première partie relative à l'étude bibliographique comprenant trois chapitres, le premier sur l'écosystème vaginale, le deuxième comporte des généralités sur les lactobacilles vaginaux, et le troisième sur des généralités sur les probiotiques.

La deuxième partie expérimentale concernant le matériel et les méthodes utilisés. En Outre, dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus et discussions. Enfin une conclusion résumant les différents résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

Partie 1
Partie Bibliographique

Chapitre 1 :

L'écosystème vaginal

1-L'écosystème vaginal :

C'est un système biologique constitué d'éléments « biotiques » (cellules vaginales et flore commensale) et « abiotiques » (sécrétions vaginales) présents dans un état d'interdépendance au sein d'un biotope, le vagin (Lefèvre , 2002). Le vagin est une zone sensible du corps de la femme et il représente un écosystème qui est parfaitement équilibré lorsque la femme est en bonne santé. Les éléments importants d'un écosystème sain sont : une muqueuse bien constituée et intacte assurant l'humidité et l'élasticité nécessaires, et une flore vaginale naturelle (Djamili, 2010).

2- La microflore de Doderleïn :

En 1892, le Professeur Albert Sigmund Gustav Doderleïn (1860 – 1941) décrit pour la première fois la flore vaginale : il la pensait homogène et constituée de bactéries à Gram positif. Depuis ces bacilles sont encore souvent appelés de son nom (bacille de Doderleïn), bien que les essais d'identification et de classification de Beijerinck en 1901 en aient fait des lactobacilles dont on a commencé à différencier les espèces en 1960, pour en déterminer presque définitivement la composition ces dernières années grâce à la biologie moléculaire (Rogosa et Sharpe. 1960). La microflore de Doderleïn est composée d'une à plusieurs espèces de lactobacilles. la composition de la microflore vaginale a été revue par identification génomique et les espèces les plus couramment rencontrées sont majoritairement *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. Iners* et puis *L. vaginalis*, *L. ruminis*, *L. oris* et *L. reuteri* (Antonio *et al.*, 1999 ; Falsen *et al.*, 1999 ; Song *et al.*, 1999 ; Vallor *et al.*, 2001 ; Tarnberg *et al.*, 2002).

3-Les facteurs favorisant de la flore vaginale :

- a) **Facteurs physiologiques** : Grossesse, cycle menstruel et le stress.
- b) **Facteurs pathologiques** : Maladies endocriniennes, le sida et les troubles nutritionnels.
- c) **Facteurs thérapeutiques** : Antibiotiques et les contraceptifs oraux.

4-La microflore vaginale saine :

La flore vaginale saine est composée de 5 à 6 espèces de micro-organismes avec un état d'équilibre entre les germes pathogènes et non pathogènes, ces derniers sont composés essentiellement de germes saprophytes (qui vivent sur un hôte sans entraîner de maladie) et en particulier les bacilles de Doderlein qui représentent environ 95 % de la flore vaginale globale, les sécrétions vaginales sont constituées de 10^8 à 10^9 germes/ml (Abbara, 2012).

5-Le déséquilibre de la microflore vaginale :

a) Facteurs de déséquilibre :

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

Les causes de déséquilibre sont multiples (Barbes et Boris, 2009) :

- 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.

b) 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 (Rousseau, 2004). Neamoin, le pH est supérieur à 4,5 dans les cas infectieux de vaginose bactérienne, de vaginite parasitaire ou de vaginite à lactobacilles. En titre d'exemple, un pH vaginale élevé dans la gamme de pH 5,0 à pH 6,5 suggère un diagnostic de pathogènes bactériens (Caillouette *et al.*, 2005) alors dans le cas où le pH est inférieur à 4 suggère un diagnostic de vaginite à levure (Lepargneur et Rousseau, 2002).

c) La vaginose bactérienne :

La vaginose bactérienne est une infection très fréquente chez les femmes en âge de procréer, traduisant un déséquilibre profond de l'écosystème vaginal. En dehors de la grossesse, C'est une pathologie bénigne, mais qui peut avoir un retentissement psychologique important chez les femmes pour qui la vaginose bactérienne devient une pathologie chronique et récidivante.

d) La candidose vulvo-vaginale :

La candidose vulvo-vaginale est une pathologie infectieuse due à une levure du genre *Candida*, affectant un grand nombre de femmes en âge de procréer. Cette pathologie peut

devenir chronique, on parle alors de candidose vulvo-vaginale récidivante, caractérisée par la survenue de plus de quatre épisodes infectieux par an. On distingue deux types de candidoses :

- la candidose vulvo-vaginale récidivante primaire, idiopathique, sans aucun facteur prédisposant.
- la candidose vulvo-vaginale récidivante secondaire, où l'on retrouve un ou plusieurs facteurs prédisposant (Amouri *et al.*, 2010).

6- Action des lactobacilles vis-à-vis des germes pathogènes :

Les lactobacilles occupent un rôle primordial dans la protection de l'écosystème vaginal. Ils constituent une première ligne de défense contre des micro-organismes responsables d'infections diverses (Lepargneur et Rousseau 2002).

6-1- Inhibition de la croissance du pathogène :

a) Par production d'acide lactique :

La principale molécule responsable de l'acidification du vagin est l'acide lactique. Elle est synthétisée via la fermentation lactique du glycogène présent dans le fluide vaginal par les lactobacilles (produisant les formes D- et/ou L- lactate) et par l'épithélium (produisant seulement la forme L -lactate).

b) Par production de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ :

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) semble être une caractéristique de grande importance des lactobacilles vaginaux. En effet, 96 % des femmes saines ont une flore à lactobacilles producteurs de peroxyde d'hydrogène contre 3,5 % des femmes atteintes de vaginose bactérienne (Eschenbach *et al.*, 1989). L'action de la molécule de peroxyde d'hydrogène est améliorée par la présence de myéloperoxidase et d'halogénures, qui sont très abondants au niveau de la muqueuse utérine et dans le fluide vaginal (Martín & Suárez, 2010). Le peroxyde d'hydrogène produit par les lactobacilles a donc la capacité de tuer de façon non spécifique d'autres bactéries, particulièrement celles qui ne possèdent pas le système catalase-peroxydase (Lepargneur & Rousseau, 2002).

c) Par production de bactériocines :

Certains lactobacilles produisent des bactériocines appelées des bactériocines-like. Ce sont des substances protéiques qui possèdent une activité bactéricide et plus largement microbicide avec un spectre d'action plus ou moins large.

d) Par production de l'enzyme arginine désaminase :

La production d'arginine désaminase par une flore saine constituée de lactobacilles est

un autre mécanisme de défense très intéressant qui perturbe l'activité des bactéries pathogènes. Elle empêche l'action de l'arginine décarboxylase et donc la décarboxylation des acides aminés (Lepargneur et Rousseau, 2002).

Chapitre 2: Les lactobacilles vaginaux

1-Définition et données sur les lactobacilles vaginaux:

Le *Lactobacillus acidophilus vaginalis* ou bacille de Doderlein est l'un des principales espèces probiotique qui est présente naturellement (isolés ou associés) dans la flore vaginale. Quelques centaines de millions de ces germes par millilitre constituent un biofilm protecteur sur la muqueuse vaginale et sont garants de l'équilibre local (Lachlak, 2006). Elles portent le nom du gynécologue allemand Albert Doderlein qui l'a découverte en 1892. Les lactobacilles les plus fréquemment retrouvés dans les vagins de femmes normales sont respectivement *L. crispatus* (48,3 %), *L. jensenii* (25,3 %), *L. gasseri* (23,5 %), *L. iners* (20,5 %). En raison des variations naturelles, toutes les femmes ne sont pas sensibles aux mêmes lactobacilles. De très nombreuses autres espèces de lactobacilles peuvent être retrouvées avec une fréquence plus basse : *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. fermentum* (Bouhbot, 2007).

2- Caractères généraux :

Les lactobacilles vaginaux sont très hétérogènes au plan de leur morphologie, de leur métabolisme et de leur phylogénie. Cette hétérogénéité est reflétée par les valeurs de G + C (%) qui varient de 32 à 55% (Madigan et Martinko, 2007).

2-1- Caractères morphologiques :

Les souches de lactobacilles sont des bactéries à Gram positif. Généralement les cellules se présentent sous la forme de bacilles longs et fins (parfois incurvés) d'autres plus courts et courbés, leur dimensions est de 0,5-1,2µm /1-10µm. Les lactobacilles sont non sporulés, généralement immobiles (pour les souches mobiles, la ciliature est péritriche). Isolé, parfois groupé en paire ou en chaîne (Prescott *et al.*, 2001). La taille du génome des *Lactobacillus* est comprise entre 1,9 - 3,3 Mb (Madigan et Martinko, 2007).

2-2- Caractères métaboliques et biochimique :

Les lactobacilles possèdent un métabolisme fermentatif et présentent des exigences nutritionnelles complexes (Madigan et Martinko, 2007). La production d'acide lactique issue du métabolisme fermentaire représente au moins 50% des produits de fermentation. En outre, elles ne liquéfient pas la gélatine, ne produisent pas l'indole ni l'hydrogène sulfureux. Le manganèse joue un rôle important pour les bactéries lactiques en les protégeant de la toxicité de l'oxygène de même, elles produisent des quantités abondantes d'acide lactique par fermentation de substances hydrocarbonées.

3- Caractères physiologiques :

Les lactobacilles sont des microorganismes micro-aérophiles ou anaérobies. La croissance sur des milieux solides est généralement stimulée par une réduction de la tension en oxygène et par l'adjonction de 5 à 10 % de dioxyde de carbone (Prescott *et al.*, 2001). Quelques espèces ne cultivent qu'en anaérobiose lors de l'isolement. La température optimale de croissance est généralement comprise entre 30 et 40°C (Madigan et Martinko, 2007), certaines souches de lactobacilles dites « thermophiles » restent viables à 55 °C (Tailliez, 2004). Ces bactéries résistent très bien aux conditions acides et peuvent se développer au pH proche de 4.

3-1- Exigences nutritionnelles :

Les lactobacilles sont en principe incapable d'effectuer la synthèse des acides aminés, et doivent par conséquent faire appel à des sources exogènes pour assurer leur métabolisme ce qui explique leur polyauxotrophie (Leveau et Bouix, 1993). *Lactobacillus* est caractérisé par son exigence aux multiples vitamines, bien plus que l'homme. Les vitamines les plus communément indispensables aux microorganismes sont la thiamine (B1), la biotine et la pyrodoxine (B6) (Madigan et Martinko, 2007).

4- Taxonomie et classification:

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variantes au sein d'une même espèce. Selon le Bergy's manuel, les lactobacilles sont classés comme suit :

Domaine : bactéria, embranchement : Firmicutes, classe : Bacilli, Ordre : Lactobacillales, famille : Lactobacillales, genre : *Lactobacillus*, espèces : *L. crispatus*, *L. vaginalis*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* (Whitman *et al.*, 2009).

Chapitre 3

Les probiotiques

1- Définition :

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

2-Classification :

Les probiotiques sont constitués de bactéries ou de levures (Tableau 1) (Faure *et al.*, 2013) et naturellement présents chez l'homme, notamment au niveau de la flore digestive. Une souche probiotique est classée par genre puis par espèce et possède une désignation alphanumérique. Il existe une nomenclature spécifique reconnue.

Tableau 1: Classification des probiotiques par genre et espèces.

Genre	Espèce
<i>Lactobacillus</i>	<i>L.rhamnosus, L.acidophilu, L.casei, L.bulgaricus, L.gasseri, L.reuteri, L.plantarum, L.sporogenes.</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bf. Longum, Bf. Breve, Bf. Infantis, Bf. Bifidum, Bf. Adolescentis.</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lac. Lactis, Lac. cremoris</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>St. Thermophilus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Et. Faecium</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pe. Acidilactici</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bac. Cereuse, Bac. Subtilis, Bac. Pumilus, Bac. Clausi, Bac. Megateruim, Bac. laterosporus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Sac. Cerevisae, Sac. Boulardii</i>

3-L'application des probiotiques au niveau vaginal :

L'application des probiotiques au niveau vaginal est une voie en pleine expansion. L'écosystème vaginal est moins complexe que l'écosystème intestinal. En effet, seul un groupe de bactéries composé de lactobacilles et constituant la flore de Doderlein domine à 95% : il joue un rôle essentiel dans la protection de la muqueuse vis-à-vis des pathogènes. Dans les années 1930, Mohler et Brown furent les premiers à proposer un traitement

des vaginites et de la vaginose avec une culture de bacilles de Doderleïn.

Tableau 2 : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application vaginale.

Critères De Sécurité	<ul style="list-style-type: none"> • souche isolée du vagin d'une femme saine. • historique de non pathogénicité. • pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques. • pas de dégradation excessive du mucus.
Critères fonctionnels	<ul style="list-style-type: none"> • adhésion aux cellules vaginales et persistance dans le vagin. • production de substances antimicrobiennes (notamment peroxyde d'hydrogène) et antagonisme vis-à-vis des pathogènes (notamment compétition d'adhésion). • effets sur la santé documentés.
Critères technologiques	<ul style="list-style-type: none"> • stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. • conservation des propriétés probiotiques après production. • relargage rapide des souches en dehors de la matrice après introduction dans le vagin.

4-L'efficacité des probiotiques dans le traitement et la prévention des infections vaginales :

a) Probiotiques et vaginose bactérienne :

Gardnerella vaginalis, présent majoritairement dans la vaginose bactérienne, est sensible aux acides organiques et/ou au peroxyde d'hydrogène sécrété par les lactobacilles de la flore vaginale. Ainsi la seule mesure consiste à rééquilibrer la flore, ce qui suggère que les probiotiques ont un intérêt (Faure *et al.*, 2013). Les souches probiotiques de *L. fermentum* et de *L. rhamnosi* ont été utilisées avec des résultats médiocres dans l'infection vaginale, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'elles ne sont pas normalement présentes dans le vagin. Les antibiotiques prescrits lors d'une vaginose bactérienne n'ont qu'une action ponctuelle sur le

microbiote vaginal et ne peuvent pas toujours résoudre la dysbiose présente au cours de l'infection. La présence de *L. crispatus* est inversement corrélée à la présence des micro-organismes responsables de la vaginose bactérienne.

b) Probiotiques et vulvo-vaginite candidosique :

Candida albicans est inhibé par le peroxyde d'hydrogène produit par les lactobacilles. La recolonisation vaginale par l'utilisation de *L. acidophilus* permettrait de restaurer le pH vaginal et d'activer la croissance normale de la flore bactérienne. Dans la prévention des récurrences, l'utilisation des probiotiques est discutée. Des études *in vitro* ont montré que les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de *C. albicans* et/ou son adhérence à l'épithélium vaginal. Les résultats de certains essais cliniques supportent l'efficacité de certaines souches de lactobacilles telles que *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GR-1 et *L. fermentum* RC-14 administrés soit oralement, soit par voie vaginale. Ces derniers permettraient une colonisation du vagin et la prévention de la colonisation et de l'infection par *C. albicans* (Faure *et al.*, 2013).

5-L'effet bénéfiques des probiotiques :

Les principaux effets bénéfiques sont:

- Prévention et traitement des diarrhées.
- Atténuation de l'intolérance au lactose.
- Prévention des allergies atopiques.
- Diminution du risque de réapparition des infections urinaires.
- Prévention et retardement de l'apparition de certains cancers.
- Prévention et thérapie des vaginoses bactériennes.
- Réduction du taux de cholestérol et prévention de certaines maladies cardio-vasculaires.
- Modulation et stimulation de la fonction immunitaire.
- Prévention et traitement de l'infection par *Helicobacter pylori*.

Chapitre 4

Matériels et méthodes

La partie matériel et méthodes est inspiré à partir de l'article de : « detection of vaginal lactobacilli as probiotic candidates », Puis les résultats obtenu (recueillis) sont discuté avec d'autres travaux menées par d'autres recherches en relation avec la thématique du manuscrit du mémoire.

1 - échantillonnage :

30 candidates âgées de 18-36 ont été incluses dans cette étude. Les candidates ayant les menstruels réguliers et une cytologie vaginale normale et ne présentant aucune maladies ou sous traitement a but lucratif.

2- isolement :

L'isolement des souches est fait à partir des échantillons de pertes vaginales selon (Handwerger *et al.*, 1994). La gélose MRS et BHI en plaque additionné de 0.05% CYS sont utilisé pour l'isolement des souches. Après incubation à 37 °C pendant 24 à 48 h, des colonies sont sélectionnées au hasard et purifiées trois fois.

Toutes les colonies sont testé pour la présence de la catalase et examiner sous microscope après coloration de GRAM avant d'être stocker à -80 ° C dans une culture liquide contenant 20% de glycérol.

3- Identification:

Les souches ont été sujets à d'autres test d'identification à savoir, le test de mobilité, La production de gaz à partir du glucose, la croissance à différentes temperatures (15, 45 et 50 °C) et la tolérance à différentes concentration en sel (bouillon MRS avec 2, 4 et 6.5 % de NaCl) .

Les souches ont été également examinées pour leur capacité de fermenter les hydrate de carbones en utilisant l'API 50 CHL.

3-1 - L'identification moléculaire:

Les souches sont identifiées génotypiquement à l'échelle de l'espèce par l'analyse partielle du gène (ADNr 16s) codant ARNr 16s. L'ADN génomique des souches est extrait selon la technique décrite par (Pino *e tal.*, 2018). La concentration et la pureté de l'ADN ont été déterminées à l'aide du NanoDrop 2000. L'intégrité et la taille de l'ADN ont été vérifiées par électrophorèse sur gel d'agarose à 1,0 % contenant le colorant de gel d'acide Nucléique GelRed. Les isolats de Lactobacillus ont été identifiés au niveau du genre en utilisant les paires d'amorces LbLMA1-rev et R16-1 selon (Dubernet *et al.*, 2002). Les isolats présentant des produits d'amplification ont été soumis à une PCR spécifique à l'espèce, en utilisant les paires d'amorces et les conditions citées dans le tableau (4, 6, 7).

Les réactions PCR ont été réalisées dans un volume finale de 50 µL, contenant 25 ng

d'ADN matrice, 2,5 U d'ADN polymérase Taq, Tris-HCl 10 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de chaque dNTP et 10 pmol de chaque amorce. Les produits de PCR ont été résolus par électrophorèse en utilisant un gel d'agarose à 1,0 % dans du tampon TBE 1X (89 mM Tris-borate, 89 mM acide borique, EDTA 2 mM; pH 8,0) et visualisé après coloration avec Gel Red Nucleic Acid Stain.

4- Mise en évidence *in vitro* de propriétés probiotiques :

a) Activité hémolytique :

les souches de *Lactobacillus*, cultivées dans un bouillon MRS pendant 18 à 24 h à 37 °C, sont ensemencées par des stries sur des plaques de gélose au sang contenant du sang de mouton et incubées dans des conditions anaérobies à 37° C pendant 24 à 48h .

L'activité hémolytique a été détectée visuellement et distinguée comme β-hémolyse, α-hémolyse ou γ-hémolyse en basant sur l'apparition d'un halo clair, halo vert ou absence de zones autour des colonies respectivement. *S. pyogenes* ATCC 19615 et *S. pneumoniae* ATCC 6303 sont utilisées comme témoin positif.

b) Sensibilité aux antibiotiques et détermination de la CMI:

Les souches sont considérées résistantes ou sensibles à un antibiotique selon les concentrations critiques (breakpoints) proposées par l'EFSA. En outre, la résistance à l'égard (contre, envers) de 4 autres antibiotiques (metronidazole, nitrofurantoin, norfloxacine, triméthoprim/sulfaméthoxazole,) non inclus dans la liste d'EFSA a été déterminée selon (Stsepetova *et al.*, 2017) .

La CMI a été déterminée par la méthode des E-test en utilisant le milieu LSM agar selon les recommandations décrites dans la norme ISO 10932/IDF 223.

c) Activité hydrolase des sels biliaires :

L'activité BSH a été déterminée en suivant la méthode décrite précédemment par (Caggia *et al.*, 2014) .

L'apparition d'un précipité autour des colonies est estimée comme signe positif. En basant sur la confluence (quantité du précipité), chaque souche est considérée comme élevée(+++), intermédiaire(++) , faible(+) ou aucune. La souche *L. acidophilus* DRU est utilisée comme contrôle positive.

5- Propriétés fonctionnelles :

a) Résistance aux conditions acides et aux sels biliaires :

La résistance des *Lactobacillus* envers l'acidité a été estimée sur MRS ajusté à pH 2 et

3. MRS 6.2 est utilisé comme contrôle. Les souches sont subcultivées 2 fois dans Le bouillon MRS, puis une suspension bactérienne est inculée dans les bouillons acidifiés. L'estimation des comptes viables ont été faites immédiatement après l'inoculation (0h) et après 2h et 4h d'incubation à 37° C.

Le taux de résistance (SR) des souches est déterminé en basant sur le nombre des cellules finales et initiales compté sur MRS agar après 48h d'incubation.

b) Tolérance aux lysozymes :

L'évaluation de La tolérance des souches sélectionnées au lysozyme c'était par (Caggia *et al.*, 2015 ; Pinto *et al.*, 2006). Ont a prélevé des aliquotes à 0, 30 et 120 min, ont été opportunément diluées et les bactéries viables (cfu/mL) ont été dénombrées par étalement sur gélose MRS. Une suspension bactérienne dans une solution d'électrolyte stérile sans lysozyme a été utilisée comme témoin.

c) Survie pendant le transit gastro-intestinal :

La capacité des lactobacilles à survivre pendant le transit gastro-intestinal (GI) a été déterminée in vitro sur du suc gastrique simulé (SGJ) et sur du liquide intestinal simulé (SIF), comme décrit par (Pithva *et al.*, 2014) avec de légères modifications.

En détails, SGJ (0,3 % pepsine, 0,5 % NaCl, ajusté à pH 2 en ajoutant 1 M HCl) et SIF (0,1 % pancréatine, 0,5 % sel biliaire, 0,5 % NaCl, 0,4 % phénol, ajusté à pH 8 en ajoutant 1 M NaOH) ont été préparés immédiatement avant utilisation et stérilisés à l'aide d'un filtre en acétate de cellulose de 0,22 µm (filtres Minisart, Sartorius, Goettingen, Allemagne). Tous les produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

Les cellules bactériennes, issues de cultures d'une nuit, ont été récoltées par centrifugation et remises en suspension dans une solution de tampon phosphate (PBS), pour obtenir une suspension bactérienne à 10⁹ cellules/mL.

La suspension cellulaire obtenue a été mélangée avec du SGJ et incubée pendant 2 h à 37 ° C, dans des conditions microaérophiles sous agitation (200 tr/min). Les cellules, culottées par centrifugation, ont été remises en suspension dans du SIF et incubées à 37°C pendant 3 h.

Les cellules traitées SGJ et SGJ-SIF ont été diluées en série, et étalé sur gélose MRS pour la détermination de la viabilité cellulaire.

d) Activité antagoniste contre les agents pathogènes :

Les lactobacilles ont été testés pour l'activité antagoniste en utilisant les souches *E. coli* ATCC 700414, *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 6538, *L. monocytogenes* DSM 12464, *G. vaginalis* ATCC 14018, *C. albicans* ATCC 10231, *C. krusei* ATCC 14243, *C.*

glabrata ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. lusitaniae* ATCC 200951 et *C. tropicalis* ATCC 13803 comme bactéries cibles. Le dosage a été réalisé par le spot test sur gélose.

Après 48 h d'incubation, l'apparition de zones d'inhibition autour des taches de lactobacilles a été détectée visuellement et, sur la base des diamètres, les résultats ont été exprimés par : (-) pas de zone d'inhibition ; (+) zone d'inhibition < 10 mm ; (++) zone d'inhibition entre 11 et 20 mm ; (+++) zone d'inhibition >20 mm.

e) Capacités d'hydrophobicité :

L'hydrophobicité est déterminée selon la méthode décrite par (Caggia *et al.*, 2015). Des souches de lactobacilles vaginaux ont été soumises à un test d'hydrophobicité de la surface cellulaire (H%) qui est mesuré par la différence entre la densité optique initial et final.

f) Capacités d'auto-agrégation et de co-agrégation :

La technique décrite par (Solieri *et al.*, 2014) a été appliquée pour l'étude de la capacité d'auto-agrégation (Auto-A%) et de co-agrégation (Co%) de nos souches lactobacilles. Certains lactobacilles pourraient se co-agréger à des pathogènes tels que *Candida albicans*, *C. glabrata*, *E. coli* ou *G. vaginalis* empêchant l'expansion de ces souches pathogènes.

g) Production de peroxyde d'hydrogène :

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) semble être une caractéristique de grande importance des lactobacilles vaginaux. La mise en évidence de la présence d H₂O₂ a été évaluée pour les souches de lactobacilles qui ont été cultivées sur gélose MRS agar (contenant 0,25 mg/mL de 3,3- 5,5 tétraméthylbenzidine et 0,01 mg/mL de HRP peroxydase de raifort), en anaérobiose, pendant 72h. Les plaques d'agar ont été exposées à l'air et la production d'H₂O₂ est évaluée en basant sur le temps nécessaire pour l'apparition d'une coloration bleue.

Les souches testées sont classées comme suit ; faible (score 1, temps > 20 min), moyenne (score 2, t entre 10-20 min) et élevée (score 3, temps < 10 min). Un Score de 0 a été attribué pour les souches n'ayant produits aucune coloration. *L. acidophilus* ATCC 4356 est utilisée comme témoin positif. (Pino *et al.*, 2018).

h) Formation de biofilm :

Les Lactobacilles vaginales présentent la première étape de la formation des biofilms sur les parois du vagin, ce qui empêche La croissance et la prolifération des microorganismes

pathogènes. La capacité des souches vaginales à développer un biofilm a été démontrée selon (Ibarreche *et al.*, 2014).

La densité optique (DO) a été mesurée à 570 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (iMark Microplate Reader, Biorad). Le milieu MRS dépourvu d'inoculum a été inclus comme contrôle négatif. Un critère de coupure de la DO (OD_c) a été considéré sur la base de trois écarts-types au-dessus de la valeur moyenne de la DO enregistrée pour le contrôle négatif. Les souches ont été considérées comme non productrices de biofilm ($OD \leq OD_c$) ; producteurs faibles ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$) modérés ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) solides ($4 \times OD_c < OD \leq 8 \times OD_c$) et de très forts producteurs de biofilms ($8 \times OD_c < OD$) (Santos *et al.*, 2016).

i) Production d'exopolysaccharides :

Les EPS sont connues pour leurs actions bénéfiques aux lactobacilles. Elles les protègent contre la phagocytose et les bactériophages, les toxines et les bactériocines. La production d'EPS est estimée quantitativement par la méthode dite phénol/acide sulfurique selon (Torino *et al.*, 2001). La quantité d'exopolysaccharide total (exprimée en mg/L) a été estimée en utilisant le glucose (50 à 500 mg/L) comme étalon. (Dubois *et al.*, 1956).

j) Test d'adhésion in vitro :

Les souches de lactobacilles ont été étudiées pour leur capacité d'adhésion en utilisant à la fois des cellules épithéliales vaginales humaines normales (VK2/E6E7 ATCC-CRL-2616) et des cellules épithéliales Caco-2 (ATCC HTB-37) selon (Petrova *et al.*, 2018). Les lignées cellulaires Caco2 ou VK2/E6E7 différenciées ont été lavées deux fois avec du PBS 1x préchauffées, puis incubées pendant 1 h avec 1,5 ml de 10⁷ cellules bactériennes, après incubation à 37°C pendant 1 h, les cultures de cellules épithéliales ont été lavées deux fois avec du PBS préchauffé. Par la suite, 100 µl de trypsine-EDTA (1x) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 10 min à 37°C.

Enfin, 900 µl de PBS ont été ajoutés, mélangés et des dilutions en série ont été étalées. Les plaques ont été incubées à 37°C pendant 72h.

Le taux d'adhérence a été calculé en comparant le nombre de cellules adhérentes au nombre de cellule original ajouté à la suspension bactérienne (10⁷ UFC/ml).

k) Production d'acide lactique :

La concentration et le type d'acide lactique produit par les souches de lactobacilles ont été déterminés sur le surnageant de culture sans cellules à l'aide du kit L (+) et D (-) lactate déshydrogénase (Megazyme International Ireland Ltd., Co. Wicklow, Ireland), conformément aux instructions du fabricant.

Les dosages étaient spécifiques à la fois pour l'acide D-lactique et l'acide L-lactique.

Chapitre 5

Résultats et discussion

1- Isolement et identification des lactobacilles vaginaux :

Dans cette étude, les échantillons ont été prélevés à partir de l'écosystème vaginal de trente (30) candidates en bonne santé. Trois cents (300) échantillons ont été isolés. 261 souches d'entre eux ont été attribuées au genre *Lactobacillus* qui étaient sélectionnées et examinées par des tests *in vitro* pour évaluer leurs propriétés probiotiques. L'identification phénotypique et génotypique des souches a montré que 261 souches appartiennent au genre *Lactobacillus*. La PCR spécifique pour l'identification à l'échelle de l'espèce a révélé que les souches isolées appartiennent à 8 espèces, qui sont comme suit (à savoir) : *L. crispatus* (4 souches), *L. gasseri* (6 souches), *L. helveticus* (8 souches), *L. rhamnosus* (3 souches), *L. salivarius* (5 souches).

Selon des études précédentes, l'identification de souches appartenant au genre *Lactobacillus*, à travers les outils d'identification a montré que les souches principales isolées à partir du vagin appartiennent à l'espèce *L. gasseri*, *L. salivarius* et *L. crispatus*. Ces espèces sont largement reconnues comme indicateurs d'un microbiote vaginal sain (Hütt *et al.*, 2016 ; Zhou *et al.*, 2007).

(Ravel *et al.*, 2011 ; Wiggert *et al.*, 2014), ont reporté que l'espèce *L. iners* est parmi les *Lactobacillus* qui prédomine le microbiote vaginal, cependant l'identification en utilisant les outils culture-dépendante n'ont révélé aucune souche appartenant à cette à cette espèce. Cela pourrait être dû à ses exigences nutritionnelles strictes et à sa très faible tolérance à l'oxygène. Ces résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenu par (Parolin *et al.*, 2015) où aucune souche de l'espèce *L. iners* n'a été isolée.

Le type de communauté vaginale dominé par *L. iners* semble être moins stable que les autres types de communauté et est plus associé à la dysbiose vaginale, puisque elle possède des variantes clonales qui, dans certains cas, favorisent un vagin sain et, dans d'autres cas, sont associées à la dysbiose et une maladie (Petrova *et al.*, 2017 ; Macklaim *et al.*, 2013). En outre, bien que les différences entre les groupes ethniques ne soient toujours pas claires, *L. iners* a été le plus souvent détectée chez les femmes africaines et afro-américaines noires que chez les femmes caucasiennes ou asiatiques (Ravel *et al.*, 2011 ; Mitchell *et al.*, 2012).

Dans une étude précédente de (Aslim et Kilic, 2006) ont identifié 58 souches de *Lactobacillus* à partir du vagin de 10 femmes en bonne santé. Parmi les souches identifiées *L. gasseri* (21%) a marqué le score le plus élevé (21%) suivi par *L. vaginalis* (16%), *L. acidophilus* (16%) et *L. delbrueckii* spp *lactis* (14%). *L. crispatus* (14%). Les autres souches ont enregistré un faible score, à savoir *L. jensenii* (3%), *L. cellobiosus* (3%), *L. curvatus* (2

%), *L. plantarum* (5%), *L. salivarius* (3%), *L. brevis* (2%), *L. oris* (2%).

Une autre étude menée par (Al kassaa *et al.*, 2014), 10 espèces de lactobacillus ont été identifiées à partir de 135 échantillons vaginaux. *L. acidophilus* était l'espèce dominante avec un score de 49%. Soit 26 souches. Les 7 souches de *L. plantarum* et *L. brevis* ont marqué une présence de 13 % chacune, les 6 souches de *L. crispatus* (11 %), les 4 souches de *L. fermentum* (8%), les 3 souches de *L. jensenii* (6 %).

En comparant les résultats obtenus par l'article pris comme notre partie expérimentale et (Aslim et Kilic, 2006 ; Al kassaa *et al.*, 2014), l'espèce *L. gasserie*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. jensenii*, *L. crispatus* a été marquée une présence partagée entre les trois travaux.

Tableau 3 : Analyse de nombre et pourcentage des souches Lactobacillus identifiées communs adoptée à partir de 3 études réalisées par (Pino *et al.*, 2018 ; Aslim et Kilic, 2006 ; Al kassaa *et al.*, 2014).

Les espèces	Nombre de souches	Pourcentage des souches (%)	Référence des trois travaux
<i>L. gasserie</i>	6	28 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	12	21 %	Aslim et Kilic, 2006
	0	0 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. salivarius</i>	5	20 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	2	3 %	Aslim et Kilic, 2006
	0	0 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. plantarum</i>	0	0 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	3	5 %	Aslim et Kilic, 2006
	7	13 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. acidophilus</i>	0	0 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	9	16 %	Aslim et Kilic, 2006
	27	11 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. brevis</i>	0	0 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	1	2 %	Aslim et Kilic, 2006
	7	13 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. jensenii</i>	0	0 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	2	3 %	Aslim et Kilic, 2006
	3	6 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014
<i>L. crispatus</i>	4	18 %	Pino <i>et al.</i> , 2018
	8	14 %	Aslim et Kilic, 2006
	6	11 %	Al kassaa <i>et al.</i> , 2014

2- L'aspect sécuritaire :

2-1 - Activité hémolytique :

Les Lactobacilles possèdent une longue histoire comme des souches ayant l'aspect GRAS, et sont qualifiés comme des probiotiques, toutefois, l'étude des caractères de l'innocuité des souches doivent d'abord être abordées (Sanders *et al.*, 2010). De plus, pour éviter le transfert de résistance aux bactéries endogènes, les probiotiques ne doivent pas porter de résistance (Salminen *et al.*, 2000). Nos résultats ont démontré qu'aucune souche ne possède une activité hémolytique, par conséquent les souches testées semblaient être sans danger. L'absence de l'activité hémolytique est considérée comme un pré-requis de sécurité pour la sélection d'une souche probiotique (FAO/WHO, 2002).

L'étude de Kumherova *et al.*, (2020) a montré qu'aucune souche n'a présenté d'hémolyse (lyse complète des érythrocytes) sur gélose au sang avec du sang de mouton défibriné. Souches *L. gasseri* (71 B, 71 C) a montré une hémolyse (décomposition partielle de l'hémoglobine). Aucune hémolyse n'a été détectée pour les autres lactobacilles testés.

2-2- Activité hydrolase des sels biliaires (BsH) :

La présence de sels biliaires et d'enzymes pancréatiques constitue un autre obstacle à la survie des bactéries ingérées pendant la digestion. Les résultats de l'activité BSH ont révélés que quatre souches de *L. crispatus* (J36, U9, AB11 et AC7), trois *L. gasseri* (A14, S21, Z9) ; une *L. helveticus* (P7) et une *L. salivarius* (N30) ont montré la capacité d'hydrolyser le sel de sodium de l'acide taurodésoxycholique (TDCA). Les BSH sont généralement des enzymes intracellulaires, insensibles à l'oxygène qui catalysent l'hydrolyse des sels biliaires. Un certain nombre de BSH ont été identifiés et caractérisés chez des bactéries probiotiques, la capacité des souches probiotiques à produire des BSH a été souvent considérée comme critère de sélection des souches probiotiques (Shehata, *et al.*, 2016).

Cependant, les autres travaux portés sur des lactobacillus d'origine vaginales n'ont pas testé leurs souches vis-à-vis cette activité.

2-3- Tolérance aux sels biliaires :

La tolérance aux sels biliaires est un facteur important qui contribue à la survie des probiotiques. (Leahy, *et al.*, 2005).

Deux cent vingt-six (226) souches de Lactobacillus, sélectionnées comme ci-dessous, ont été criblées pour leur tolérance à l'acide. À partir d'un nombre initial de cellules viables (cellules témoins) allant de $9,0 \times 10^9$ à $9,5 \times 10^9$ ufc / ml, des taux de survie $\geq 80\%$ ont été observés à pH 3,0 et pH 2,0 (Fig. 1 A, B).

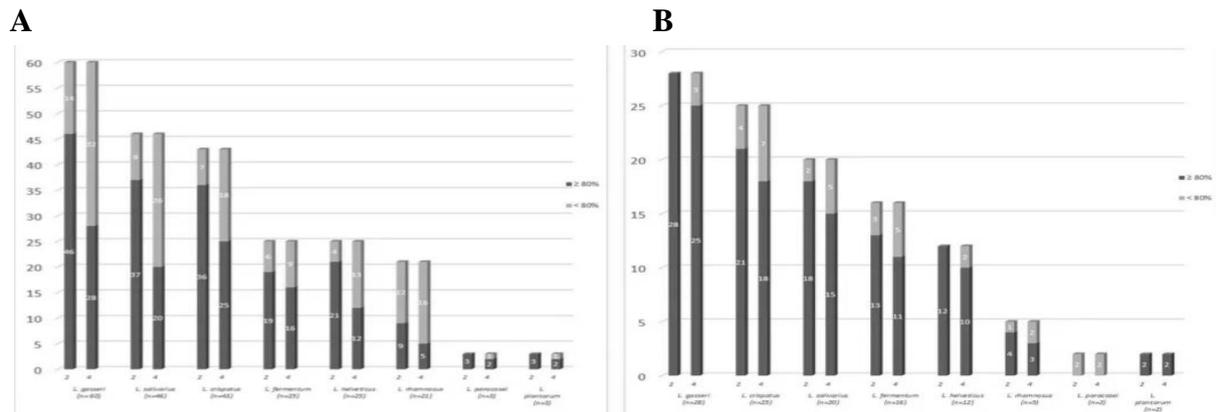


Figure 1 : Taux de survie des Lactobacillus spp Souches à pH 3 après 2 et 4 heures d'incubation (A) et à pH 2 après 2 et 4 heures d'incubation (B).

Le tableau 4 : Les résultats de la tolérance aux sels biliaries.

		Les sels biliaries			
Espèces	Souches	0.5 %		1.0 %	
		SR% 2h	SR% 4h	SR% 2h	SR% 4h
<i>L. gasseri</i> (n=25)	A4	96	80	94	81
	A7	95	86	94	80
	A8	94	82	92	80
	A9	95	83	92	82
	A14	88	81	88	82
	A18	88	80	91	80
	B3	93	81	89	77
	B5	89	83	88	77
	F5	96	86	92	82
	G12	91	83	88	78
	H7	91	84	89	80
	K2	90	86	89	86
	K7	97	83	95	81
	M9	95	82	91	81
	P5	91	82	90	83
	S21	90	80	89	80
	T13	90	84	89	81
	U3	93	82	91	80
	U5	93	81	91	80
	W14	91	84	89	82
W18	91	83	90	82	
Y13	92	84	91	82	

	Z9	92	83	91	81
	AB18	92	80	89	77
	AC3	89	81	89	80
<i>L. crispatus</i> (n=18)	C9	98	89	89	84
	D18	94	83	91	85
	D27	93	80	87	83
	E3	88	81	84	82
	G8	81	80	83	82
	J16	85	80	71	53
	J31	95	89	89	87
	J36	96	91	84	81
	N3	98	92	97	91
	P10	90	79	73	59
	S18	87	85	92	88
	T4	86	82	90	87
	U9	86	81	88	87
	V26	88	82	89	88
	Y11	86	83	88	83
	AB11	85	80	84	83
	AC7	82	80	84	82
	AC8	81	80	74	73
C21	91	82	88	80	
<i>L. salivarius</i> (n=15)	D20	91	83	88	80
	G18	91	84	89	82
	H23	92	83	91	82
	J23	94	81	92	80
	L21	93	80	91	77
	M23	91	82	91	81
	N11	91	86	78	75
	N30	90	82	90	80
	O29	91	80	90	80
	P35	91	80	89	80
	T14	90	82	90	82
	Y21	90	82	77	70
	Z15	91	80	88	80
AD12	91	80	90	80	
<i>L. fermentum</i> (n=11)	E11	98	80	96	80
	E18	95	86	95	84
	O13	88	82	88	83
	O16	94	86	87	82
	W4	86	80	73	65
	W17	84	80	68	67
	X10	80	80	66	57
	X13	80	80	68	67
	AB2	96	87	89	84
	AC5	90	81	80	73
	AD1	91	85	78	68
<i>L. helveticus</i> (n=	C5	95	85	93	83

10)	G7	95	83	89	80
	G13	94	88	90	82
	P7	88	84	87	83
	P12	88	81	85	81
	S7	91	80	88	81
	T5	90	81	88	80
	U13	92	86	89	83
	Z3	91	86	90	85
	Z4	93	84	91	82
<i>L. rhamnosus</i> (n=3)	E21	93	82	90	80
	L3	95	84	91	81
	L23	91	85	92	85
<i>L. plantarum</i> (n=2)	C11	80	69	69	64
	V7	84	70	71	66

En général, une concentration en sels biliaires de 0,5 % (p/v) n'a eu aucun effet sur la plupart de nos souches testées, à l'exception des souches *L. crispatus* P10 et *L. plantarum* C11 et V7, où les taux de survie étaient de 79,69 et 70% respectivement. Toutefois, en présence de 1,0 % (p/v) en sels biliaires, 86% et 79% des souches ont montré une tolérance à la bile après 2 et 4 h, respectivement.

Shazadi *et al.*, (2021) ont utilisés différentes espèces et souches pour cette activité que ceux utilisé par (Pino *et al.*, 2018). Les résultats obtenues dans ce travail ont montré qu'en présence d'une forte concentration (2%) de sels biliaires dans l'espèce *L. reuteri* (MT180537) a présenté une maximum valeur de croissance (91,7%). et Aucune différence n'a été observée par rapport à la croissance de *L. acidophilus* ATCC 4356.

2-4- Sensibilité aux antibiotiques :

La sensibilité ou la résistance aux antibiotiques des bactéries est un critère qui contribue d'une part pour leur sélection et d'autre part pour leur classification.

Dans la présente étude, 261 lactobacilles isolés du microbiote vaginal de femmes en bonne santé, La résistance phénotypique à plusieurs antibiotiques a été réalisée conformément aux normes et directives internationales (EFSA, 2012). Les souches étaient considérées comme résistantes lorsqu'elles présentaient une valeur de CMI supérieure aux seuils de CMI établis par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, 2008).

Selon les résultats obtenus une sensibilité variable aux antimicrobiens a été obtenue, à l'exception des souches *L.plantarum* et *L.paracasei*, qui étaient sensibles à tous les antibiotiques. De plus, une sensibilité élevée a été enregistrée pour la tétracycline, l'érythromycine et la vancomycine, indiquant une variabilité dépendante de l'espèce et de la souche (tableau 5).

Tableau 5. Sensibilité aux antibiotiques mesurée par la méthode E-test.

Species	%	TC	EM	VA	MZ ^a	NX ^a	TS ^b
<i>L. gasseri</i> (n = 72)	R	2	5	5	4	6	2
	S	70	67	67	68	66	70
<i>L. salivarius</i> (n = 52)	R	2	4	nr	12	3	4
	S	50	48	nr	40	49	48
<i>L. crispatus</i> (n = 47)	R	2	1	1	2	10	2
	S	45	46	46	45	37	45
<i>L. helveticus</i> (n = 33)	R	5	3	nr	7	1	1
	S	28	30	nr	26	32	32
<i>L. fermentum</i> (n = 26)	R	1	0	nr	2	1	10
	S	25	26	nr	24	25	16
<i>L. rhamnosus</i> (n = 25)	R	3	1	nr	0	0	0
	S	22	24	nr	25	25	25
<i>L. paracasei</i> (n = 3)	R	0	0	nr	0	0	0
	S	3	3	nr	3	3	3
<i>L. plantarum</i> (n = 3)	R	0	0	nr	0	0	0
	S	3	3	nr	3	3	3
% of resistance (R)		5.7	5.4	5.0	10.3	8.0	7.3
% of susceptibility (S)		94.3	94.6	95.0	89.7	92.0	92.7

Les résultats sont en accord avec des travaux antérieurs pour une large gamme d'antibiotiques, bien que différents milieux nutritifs, conditions d'incubation et/ou méthodes de test de sensibilité aient été utilisés (Danielsen *et al.*, 2003 ; Temmerman *et al.*, 2003). Ces résultats ont confirmé que la majorité des souches était sensible à la plupart des antibiotiques testés, même si un profil dépendant des souches a été révélé (Stsepetova *et al.*, 2017 ; Danielsen *et al.*, 2003).

En outre, les résultats de Handwerger *et al.*, (1994). Montrent que la plupart des espèces de lactobacilles sont intrinsèquement résistantes à la vancomycine, ce qui est attribué à la synthèse de précurseurs de peptidoglycanes modifiés de la paroi cellulaire. Ce type de résistance ne représente pas une préoccupation pour un probiotique, car il est différent du mécanisme inductible et transférable observé chez d'autres bactéries, comme les entérocoques (Villoslada *et al.*, 2007). Les résultats ont révélés que seules quelques souches (6 sur 119), appartenant aux espèces *L. crispatus* et *L. gasseri*, présentaient la résistance à la vancomycine, confirmant la forte sensibilité à cet antibiotique du groupe *L. acidophilus* (EFSA 2008). De même, selon d'autres rapports (Danielsen *et al.*, 2003 ; Delgado *et al.*, 2005), un niveau élevé de résistance à la norfloxacine, au métronidazole et au triméthoprime - sulfaméthoxazole a également été révélé.

2-5- Tolérance aux lysozymes :

Le tableau 6 montre les résultats de résistance des souches à l'égard de lysozyme. 13 souches appartenant aux espèces *L. helveticus*, *L. rhamnosus* et *L. salivarius* ont montré une résistance vis-à-vis le lysozyme avec un taux de survie ≥ 90 % après 30 et 120 min d'exposition (tableau 6, 43 souches ont montré une adaptations au lysozyme où des scores de survie entre 82- 84 % ont été enregistrés et un taux de survie < 82 % a été enregistré par 10 souches, appartenant aux espèces *L. gasseri*, *L. fermentum* et *L. salivarius* à l'égard du lysozyme.

L'analyse des articles en relation avec la thématique n'ont pas testé la résistance des souches vis à vis le lysozyme.

Tableau 6 : Tolérance au lysozyme, exprimé en taux de survie (SR %) des souches de lactobacilles vaginales testées

Espèces	Souches	Tolérance aux lysozymes	
		SR% 30 min	SR% 120 min
<i>L. gasseri</i> (n=21)	A4	76	58
	A7	73	58
	A8	69	59
	A9	84	85
	A14	86	88
	A18	84	87
	F5	82	85
	H7	73	59
	K2	85	87
	K7	73	61
	M9	84	86
	P5	85	86
	S21	84	86
	T13	83	85
	U3	72	59
	U5	84	85
	W14	84	85
	W18	83	84
	Y13	84	86
	Z9	83	84
	AC3	83	85
<i>L. crispatus</i> (n=15)	C9	84	85
	D18	84	86
	D27	83	88
	E3	83	84
	G8	83	84

	J31	84	86
	J36	84	85
	N3	83	84
	S18	84	85
	T4	83	85
	U9	84	86
	V26	84	86
	Y11	83	85
	AB11	83	84
	AC7	84	85
<i>L. salivarius</i> (n=12)	C21	84	85
	D20	94	91
	G18	84	85
	H23	84	86
	J23	68	60
	M23	84	86
	N30	95	92
	O29	97	92
	P35	84	85
	T14	84	85
	Z15	96	93
	AD12	84	87
<i>L. helveticus</i> (n=10)	C5	84	85
	G7	83	86
	G13	84	85
	P7	98	95
	P12	96	95
	S7	96	91
	T5	84	87
	U13	99	96
	Z3	96	97
	Z4	96	93
<i>L. fermentum</i> (n=5)	E11	64	73
	E18	83	84
	O13	67	61
	O16	73	66
	AB2	81	83
<i>L. rhamnosus</i> (n=3)	E21	93	90
	L3	95	92
	L23	95	93

2-6- Survie pendant le transit gastro-intestinal

Selon le tableau 7, Parmi les souches testées le taux de survie de la souche E21(99 %) est plus élevée que la souche L3 (90.65%) de l'espèce *L. rhamnosus* , bien que le taux de survie des deux souches P7 (99.56 %) P12 (99.67 %) de l'espèce *L. helveticus* est plus élevé que les autres souches S7 (88.14 %) et U13 (90.29 %) alors que le plus faible taux de survie

était 87.53 % pour la souche N30 de l'espèce *L. Salivarius* pendant le passage à travers les conditions gastro-intestinal in vitro. Les 56 souches adaptatives et résistantes au lysozyme ont été sélectionnées afin d'évaluer leur résistance lors du passage dans le tractus gastro-intestinal. Au total, 26 souches sur 56 ont montré la capacité de survivre pendant le transit gastro-intestinal, tandis que 30 souches ont montré une forte réduction après exposition au suc gastrique, enregistrement d'une valeur de densité cellulaire d'environ 5 log ufc/ml, qui a été maintenue pendant la digestion pancréatique (tableau 7).

Tableau 7 : Survie (log ufc/mL) des souches de lactobacilles vaginaux pendant le transit gastro-intestinal in vitro.

Espèces	Souche	CI	SGJ	SIF
<i>L. crispatus</i> (n=15)	C9	9.13±0.08	5.30±0.02	5.70±0.02
	D18	9.08±0.03	4.96±0.06	4.84±0.02
	D27	9.15±0.05	6.02±0.03	5.76±0.06
	E3	9.11±0.06	5.02±0.02	4.21±0.02
	G8	9.08±0.02	4.98±0.05	4.16±0.03
	J31	9.30±0.02	8.26±0.08	8.15±0.06
	J36	9.11±0.05	8.02±0.02	8.00±0.03
	N3	9.12±0.03	5.14±0.06	4.63±0.05
	S18	9.18±0.06	5.31±0.02	5.03±0.08
	T4	9.24±0.08	5.16±0.02	4.36±0.03
	U9	9.16±0.05	9.01±0.03	5.86±0.06
	V26	9.11±0.02	4.28±0.04	4.14±0.02
	Y11	9.13±0.03	4.05±0.02	3.83±0.02
	AB11	9.12±0.02	8.20±0.06	8.08±0.03
	AC7	9.21±0.03	8.11±0.02	8.03±0.02
<i>L. gasseri</i> (n=15)	A9	9.12±0.03	8.25±0.02	8.03±0.02
	A14	9.06±0.06	8.15±0.04	7.95±0.03
	A18	9.13±0.08	8.21±0.03	8.12±0.02
	F5	9.18±0.02	8.24±0.02	8.21±0.04
	K2	9.18±0.04	5.02±0.02	4.56±0.06
	M9	9.10±0.03	4.34±0.02	4.46±0.02
	P5	9.09±0.04	4.21±0.08	4.13±0.04
	S21	9.03±0.06	5.07±0.06	5.15±0.02
	T13	9.02±0.03	5.10±0.02	4.60±0.04
	U5	9.00±0.02	4.80±0.02	4.28±0.08
	W14	9.24±0.04	8.21±0.02	8.10±0.02
	W18	9.09±0.08	7.98±0.02	7.90±0.04
	Y13	9.11±0.04	5.01±0.03	4.67±0.07
	Z9	9.08±0.06	5.10±0.07	4.94±0.07
	AC3	9.13±0.08	5.04±0.07	4.69±0.04
<i>L. salivarius</i> (n=11)	C21	9.18±0.06	5.06±0.07	4.12±0.08
	D20	9.13±0.06	5.02±0.04	4.83±0.03

	G18	9.04±0.08	5.01±0.04	4.70±0.02
	H23	9.18±0.07	8.20±0.06	8.15±0.02
	M23	9.09±0.03	8.01±0.08	7.93±0.06
	N30	9.14±0.04	8.00±0.05	7.96±0.04
	O29	9.06±0.06	4.87±0.02	4.51±0.04
	P35	9.13±0.08	4.68±0.02	4.05±0.06
	T14	9.06±0.04	4.88±0.06	3.12±0.04
	Z15	9.17±0.03	9.03±0.06	8.91±0.03
	AD12	9.12±0.03	9.04±0.08	8.93±0.06
<i>L. helveticus</i> (n=10)	C5	9.05±0.07	8.11±0.03	8.04±0.03
	G7	9.04±0.03	5.02±0.04	4.96±0.06
	G13	9.17±0.07	4.98±0.07	4.33±0.07
	P7	9.07±0.06	9.03±0.04	8.96±0.07
	P12	9.15±0.03	9.12±0.08	8.91±0.07
	S7	9.11±0.08	8.03±0.07	7.94±0.08
	T5	9.07±0.07	8.21±0.06	8.07±0.07
	U13	9.06±0.06	8.18±0.07	8.09±0.04
	Z3	9.14±0.03	8.54±0.08	8.31±0.03
	Z4	9.18±0.04	8.07±0.04	7.91±0.07
<i>L. rhamnosus</i> (n=3)	E21	9.16±0.06	9.07±0.06	8.94±0.06
	L3	9.09±0.07	8.24±0.07	8.10±0.03
	L23	9.14±0.03	7.96±0.07	7.84±0.04
<i>L. fermentum</i> (n=2)	E18	9.01±0.02	4.28±0.02	3.96±0.02
	AB2	9.05±0.02	4.23±0.06	4.11±0.08

2-7- Activité antagoniste contre les agents pathogènes :

Comme montre le tableau 8, l'activité antagoniste des 26 souches de lactobacilles vaginaux, contre les agents pathogènes gastro-intestinaux et urogénitaux était souche dépendante. Dans l'ensemble, les souches appartenant aux espèces *L. helveticus*, *L. rhamnosus* et *L. salivarius* ont présenté une activité antagoniste plus élevée (zone d'inhibition supérieure à 10 mm) contre les agents pathogènes testés par rapport aux souches appartenant à l'espèce *L. gasseri* et *L. crispatus*. En particulier, aucune zone d'inhibition contre la plupart des agents pathogènes testés n'a été enregistrée par cette dernière espèce. Il est intéressant de souligner que seules 3 souches (F5, W18, E21) ont été capables d'inhiber *C. parapsilosis* et qu'aucune n'a présenté d'activité antagoniste vis-à-vis *C. lusitaniae* (Tableau 8).

Tableau 8 : Activité antimicrobienne contre les pathogènes gastro-intestinaux et urogénitaux.

Species	Strain	E. coli ATCC 25922	E. coli ATCC 700414	S. aureus ATCC 6538	L. monocytogenes DSM 12464	G. vaginalis ATCC 14018	C. albicans ATCC10231	C. krusei ATCC 14243	C. glabrata ATCC 90030	C. parapsilosis ATCC 90018	C. tropicalis ATCC 13803
<i>L. crispatus</i> (n = 4)	J31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	J36	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	AB11	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	AC7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. gasseri</i> (n = 6)	A9, A14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	A18	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	F5	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+
	W14	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	W18	+	+	+	+	+	-	-	-	++	-
<i>L. helveticus</i> (n = 8)	C5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	P7	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	-	++
	P12	++++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	-	++
	S7	+++	+++	++	++	++	++	++	++	-	++
	T5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	U13	++	++	++	+++	++	+++	+++	-	-	-
	Z3, Z4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E21	+++	+++	++	++	+++	++	++	++	+	++
<i>L. rhamnosus</i> (n = 3)	L3	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	-	-	-
	L23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H23, M23, Z15, AD12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. salivarius</i> (n = 5)	N30	++	++	++	+++	+++	++	+++	-	-	-

Légende : pas de zone d'inhibition, (+) zone d'inhibition <10 mm ; (+ +) zone d'inhibition 11–20 mm ; (+ ++) zone d'inhibition >20mm.

En revanche, toutes les lactobacilles vaginaux étudiées par Hutt *et al.*, (2016) ont montré une activité antagoniste vis-à-vis les souches pathogènes testées. L'inhibition les plus élevées ont été détectées contre *E.coli* RTN0147 (10mm) et *Candida spp* à savoir *Candida albicans* RTN07 (4.7 mm) et *Candida glabrata* RTN009 (4 mm). Les souches de *L. crispatus* ont montré des anti-*E. coli* significativement plus élevés Par rapport à *L. jensenii*, tandis que les souches de *L. gasseri* exprimaient une activité anti-*Candida* significativement inférieure à celle de *L. crispatus* et *L. jensenii*. L'inhibition d'*E.coli* et de *Candida spp* Par des lactobacilles vaginaux a été rapporté dans plusieurs études (Gil *et al.*, 2010 ; Stoyancheva *et al.*, 2014) .

Par la suite, 31 souches de lactobacilles les plus prometteuses ont été sélectionnées sur 56 souches. De nouvelles expériences ont démontrés que les souches des trois espèces de lactobacilles avaient des activités antagonistes contre deux *G. vaginalis* différents souches.

2-8- Capacités d'hydrophobicité :

Les résultats d'hydrophobicité, d'auto-agrégation et de co-agrégation détectés pour les lactobacilles vaginaux sont rapportés dans le tableau 9. L'hydrophobicité de la surface cellulaire des 10 souches sélectionnées variait de 41 à 86 %, à l'exception des souches F5 et W18, qui présentaient une valeur de 18% et 11%, respectivement. Les souches *L. rhamnosus* E21 et L3 ainsi que *L. helveticus* P7 et *L. salivarius* N30 ont montré l'hydrophobicité la plus

élevée (> 70 %) (Tableau 9).

Les résultats de (Shazadi *et al.*, 2021) indique quelles espèces de *L. reuteri* (MT180537) et *L. brevis* (MW362790) ont présenté une forte hydrophobicité de 75,55 % et 77,25 %, respectivement. L'hydrophobicité la plus faible a été observée pour *L. pontis* (MW362838).

Dans une étude de Kumherova *et al.*, (2020), des taux d'hydrophobicité allant de 19,1 – 69,1 % chez lactobacillus d'origine vaginales. L'hydrophobicité la plus élevée a été présentée par la souche 68A de l'espèce *L. rhamnosus* et le pourcentage le plus bas a été marqué par la souche 51E de l'espèce *L. jensenii*. Dans cette étude, aucune corrélation entre l'auto-agrégation et l'hydrophobicité n'a été observée.

Tableau 9 : Propriétés de surface du sous-ensemble de 10 souches de lactobacilles vaginaux.

Species	Strains	H%	Auto-A%	CoA%			
				<i>E. coli</i> 555	<i>G. vaginalis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>
<i>L. gasseri</i>	F5	18.12 ± 0.07 ^b	12.23 ± 0.09 ^c	14.18 ± 0.12 ^c	15.23 ± 0.14 ^b	24.33 ± 0.14 ^c	6.13 ± 0.18 ^a
	W14	41.08 ± 0.13 ^c	7.05 ± 0.20 ^b	12.23 ± 0.18 ^b	18.21 ± 0.17 ^c	11.21 ± 0.16 ^b	8.06 ± 0.11 ^b
	W18	11.15 ± 0.07 ^a	6.21 ± 0.09 ^a	6.35 ± 0.04 ^a	14.38 ± 0.11 ^a	9.37 ± 0.09 ^a	12.54 ± 0.21 ^c
<i>L. helveticus</i>	P7	73.21 ± 0.09 ^g	71.24 ± 0.06 ⁱ	59.25 ± 0.11 ^g	58.23 ± 0.28 ^e	67.34 ± 0.12 ^h	71.28 ± 0.23 ⁱ
	S7	46.30 ± 0.16 ^e	57.43 ± 0.16 ^f	51.25 ± 0.09 ^d	60.31 ± 0.21 ^f	52.28 ± 0.19 ^d	54.67 ± 0.17 ^d
	P12	48.26 ± 0.04 ^f	74.33 ± 0.07 ^j	68.22 ± 0.10 ^j	72.37 ± 0.11 ⁱ	58.23 ± 0.17 ^e	63.47 ± 0.21 ^g
	U13	42.34 ± 0.09 ^d	51.15 ± 0.10 ^d	54.25 ± 0.12 ^f	67.29 ± 0.18 ^h	52.43 ± 0.12 ^d	55.28 ± 0.28 ^e
<i>L. rhamnosus</i>	E21	82.12 ± 0.09 ^j	61.26 ± 0.04 ^g	60.31 ± 0.07 ^h	66.27 ± 0.15 ^g	63.27 ± 0.15 ^g	68.27 ± 0.09 ^h
	L3	86.18 ± 0.10 ^j	55.27 ± 0.09 ^e	53.28 ± 0.16 ^e	57.23 ± 0.16 ^d	72.28 ± 0.18 ⁱ	58.23 ± 0.11 ^f
<i>L. salivarius</i>	N30	76.23 ± 0.10 ^h	66.32 ± 0.16 ^h	71.51 ± 0.11 ⁱ	71.28 ± 0.14 ⁱ	61.38 ± 0.11 ^f	75.34 ± 0.26 ^j

Légende : H% : Hydrophobicité, Auto-A% : agrégation automatique, CoA% : co-agrégation.

Les résultats sont exprimés en valeur moyenne et standard déviation de trois expériences distinctes. Différentes lettres (a–j) dans la même colonne indiquent une différence par le test ANOVA à un facteur, suivi du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$).

2-9- Auto-agrégation :

L'auto-agrégation est l'une des capacités souhaitées des souches probiotiques car elle aide à prévenir la colonisation des agents pathogènes et à réduire les risques d'infection

Nos résultats variaient de 51 % à 74 %, seules les souches F5, W14 et W18 ont montré une valeur supérieure à 13 %. Le pourcentage le plus élevé a été enregistré par la souche P12 74.33 % de l'espèce *L. helveticus* suivie par la souche P7 71.24 %.

L'étude porté par shazadi *et al.*, (2021), les lactobacillus vaginaux ont exprimé des taux d'auto agrégations varie de 69,42 à 82,25 %. Ces résultats sont relativement supérieurs à

ceux obtenus par notre enquête. Parmi les souches testées cinq souches, *L. reuteri* (MT180537) et *P. pentosaceus* (MT176555) ont montré une auto agrégation supérieure à 80% après 4 h d'incubation. Après 4h d'incubation Les valeurs d'auto-agrégation étaient directement proportionnelles au temps d'incubation. *L. reuteri* (MT180537) et *P. pentosaceus* (MT176555) ont présenté des valeurs d'auto-agrégation élevées (80%) tandis que *L. brevis* (MW362790) a montré une faible capacité d'auto-agrégation de 69,42%, on peut supposer que *L. reuteri* (MT180537) et *P. pentosaceus* une qui peut aider à prévenir la colonisation d'agents pathogènes (Ferreira *et al.*, 2011).

Compte tenu des résultats de l'auto-agrégation, ces conclusions sont conformes à (Dlamini *et al.*, 2019) qui ont rapportés une capacité d'auto-agrégation élevée (70 %) par *L. reuteri* VB4 après 4 h d'incubation à 37 °C.

2-10- La co-agrégation :

La co-agrégation est une propriété importante des lactobacilles, car elle peut créer un microenvironnement autour des pathogènes avec une forte concentration de substances inhibitrices, empêchant les pathogènes d'adhérer à l'épithélium intestinal ou vaginal (Mastromarino *et al.*, 2002) . À cet égard, les souches susmentionnées ont montré une activité antagoniste contre la majorité des agents pathogènes, y compris *Candida spp* conformément à une étude précédente de (Parolin *et al.*, 2015 ; Dover *et al.*, 2008).

Dans l'ensemble, une large gamme de variations dans la co-agrégation avec des agents pathogènes a été détectée sept souches (P7, S7, P12, U13, E21, L3 et N30) ont présentés une co-agrégation élevée avec des valeurs supérieures à 50 % (tableau 9).

Tandis que, les études de (Shazadi *et al.*, 2021), ont révélés que toutes les souches de LAB ont une forte co-agrégation allant de 50,43 à 58,08 % après 4 h d'incubation. *En. faecalis* est considéré comme l'un des agents pathogènes dominants avec une prévalence de 32,26 % suivi de *E. coli* (8 à 25 %) chez les patients AV (Sangeetha *et al.*, 2015 ; Daoood *et al.*, 2020) Ce fait ils a conduit à sélectionner *En. faecalis* (MW051601) comme souche indicatrice dans ce test . *L. reuteri* *L. reuteri* (MT180537) a montré la co-agrégation la plus élevée (58,08 %) avec *En. faecalis* (MW051601). Conformément aux découvertes actuelles, (Dlamini *et al.*, 2019) ont rapporté une capacité de co-agrégation (56 %) de *L. reuteri* VB4 avec *En. faecalis* ATCC 29 212 après 4 h d'incubation à 37 °C.

D'autre part, dans l'étude de (Mastromarino *et al.*, 2002) Le test de co-agrégation fournit une mesure de l'interaction entre différents micro-organismes. Des expériences de co-agrégation ont montré que la capacité des lactobacilles de se lier à un agent pathogène varie selon la souche de Lactobacillus et l'agent pathogène impliqué (*Candida albicans*,

Gardnerella vaginalis).

(Mastromarino *et al.*, 2002) ont constaté que la souche FV2 de l'espèce *L. salivarius* a pu co-agrégier très efficacement (score 3) avec les deux agents pathogènes à un point qu'aucun lactobacille isolé n'a été observé. En revanche, la souche FV3 de l'espèce *L. salivarius* a montré une activité de co-agrégation plus faible avec *C. albicans* (score 1) et *G. vaginalis* (score 2) avec agrégats de petites dimensions et un grand nombre de lactobacilles non adhérents. Parmi les différentes souches de l'espèce *L. gasseri*, les souches MB 331 et MB 334 n'ont montré aucune interaction avec les agents pathogènes, alors que les souches MB 333 et MB 335 ont montré une bonne capacité de co-agrégation. Donc Les deux espèces *L. salivarius* FV2 et Les souches de *L. gasseri* MB 335 ont également été capables de se coagréger très efficacement avec *G. vaginalis* et *C. albicans*. La co-agrégation pourrait être un facteur important dans l'établissement et le maintien d'une flore urogénitale saine en raison de la production d'un microenvironnement autour de l'agent pathogène où la concentration de substances inhibitrices produites par les lactobacilles est exacerbée.

2-11- Peroxyde d'hydrogène :

Le peroxyde d'hydrogène est une substance antimicrobienne produite par certaines souches de lactobacilles vaginaux. Le peroxyde d'hydrogène a un effet protecteur contre les micro-organismes catalase-négatifs tels que *G. vaginalis*, responsables de la vaginose bactérienne (Digiulio *et al.*, 2015 ; Bouridane *et al.*, 2016). Les souches productrices de peroxyde d'hydrogène sont responsables de maintien de l'équilibre microbien et leur absence est associée avec le développement de la vaginose bactérienne (Borges *et al.*, 2014 ; Amin *et al.*, 2011).

Les résultats de la production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) sont rapportés dans le tableau 10. L'analyse qualitative a démontré que toutes les 10 souches sélectionnées produisaient du H₂O₂. En particulier, les souches *L. helveticus* P7 et *L. rhamnosus* E21 et L3 ont présenté une production élevée de H₂O₂, tandis que les souches *L. salivarius* (N30) et *L. helveticus* (S7, P12, U13) ont enregistré une production modérée de H₂O₂. Toutes les souches de *L. gasseri* présentaient une faible capacité à produire du H₂O₂. Ces résultats se concordent avec des résultats d'études menées par d'autres auteurs.

Dans l'étude de Hutt *et al.*, (2016), parmi 135 lactobacillus vaginaux 108 ont été trouvés capables de produire le peroxyde d'hydrogène. Ce dernier a été trouvé secrété par la majorité des souches appartenant à l'espèce *L. crispatus* et *L. jensenii* et par la moitié des souches appartenant à l'espèce *L. gasseri*. De même, Eschenbach *et al.*, 1989 ont signalé une production importante de peroxyde par les souches membres de l'espèce *L. crispatus*, *L.*

jensenii et *L. gasseri*.

Dans rapport précédent , (Klebanoff *et al.*, 1991) a déclaré que le vagin des femmes en bonne santé contient des lactobacilles capables de produire des quantités significativement plus élevées de peroxyde d'hydrogène par rapport aux lactobacilles isolées à partir de femmes infertiles et que les lactobacilles isolées des femmes souffrant d'une vaginose sont incapable de produire le peroxyde.

Kumherova *et al.*, (2020) ont également reporté la production de peroxyde par 71 % des lactobacilles d'origines vaginales étudiées et en particulier les souches de *L. crispatus*, *L. gasseri* et *L. jensenii*. La production était divisée en deux groupes, faible production d'H₂O₂) et forte production de H₂O₂ (bleu. Des changements de couleur des colonies ont été détectés pour toutes les souches de *L. crispatus*, *L. gasseri* et *L. jensenii*. Rabe et Hillier, 2003 à utilisé la spectrophotométrie afin de déterminer le taux de peroxyde produit par les lactobacilles vaginale étudiées. La plus forte concentration d'H₂O₂ a été détectée pour *L. jensenii* 58C (6,32 ± 0,60 mg/l) et La plus faible concentration d' H₂O₂ a été détectée pour la souche *L. rhamnosus* 72A (0,33 ± 0,05 mg/l).

2-12- Production d'acide lactique :

L'acide lactique est un autre composé antimicrobien puissant produit par les bactéries lactiques. La production de l'acide lactique par les lactobacilles entraîne une baisse du pH qui est important pour prévenir la colonisation et la prolifération d'organismes pathogènes non indigènes dans le vagin. L'acide lactique est l'un des métabolites produits par les souches LAB, qui empêche la croissance des pathogènes et aide à la colonisation des espèces de *Lactobacillaceae* dans des niches écologiques (Aroutcheva *et al.*, 2001; Aldunate *et al.*, 2015 ; Özogul *et al.*, 2018). La production d'acide lactique a été détectée dans des études antérieures parmi les isolats de lactobacilles vaginaux (Gil *et al.*, 2010). Le tableau 10 montre la concentration des acides lactiques (L et D) produits par les 10 lactobacilles vaginaux, allant de 2,09 mmol/l à 8,94 mmol/l et de 4,74 mmol/l à 13,11 mmol/l, pour L- lactique et D -acides lactiques respectivement , on peut conclure que l'espèce *L. salivarius* était le meilleur lactobacille producteur d'acide lactique suivie par *L. gasseri*, *L. crispatus* et *L. jensenii*.

Shazadi *et al.*, (2021) proposent dans leurs étude que l'acide lactique présente une activité antagoniste en perturbant la perméabilité membranaire des agents pathogènes et en augmentant ainsi les effets destructeurs des composés antagonistes (Atassi *et al.*,2010). Dans cette étude, deux souches, *L. reuteri* (MT180537) et *L. brevis* (MW362790) ont produit respectivement 7,84 et 28,57 mg/mL d'acide lactique. En outre Yüksekdağ *et al.*, (2004) ont rapporté que la souche *Lactococcus cremoris* Z20S à produit un maximum d'acide lactique

(9,9 mg/mL) . La différence dans les résultats pourrait être associée à la spécificité d'espèce des bactéries.

En évaluant la concentration d'acide lactique produite par lactobacilles vaginaux, (Kumherova *et al.*, 2020) ont détecté que quantité produite est souches dépendante. Le meilleur producteur d'acide lactique était la souche *L. rhamnosus* 72A ($11,6 \pm 0,2$ g/l), suivie par les souches *L. crispatus* 2A et *L. crispatus* 69E ($10,4 \pm 0,0$ g/l pour eux deux) alors que la plus faible concentration d'acide lactique était détectée pour la souche *L. crispatus* 51A ($4,6 \pm 0,1$ g/l).

2-13- Formation de biofilm :

La formation de biofilm en colonisant l'épithélium et en construisant ainsi une barrière physique contre les agents pathogènes est une caractéristique importante des probiotiques.

Dans notre étude tous les lactobacilles ont été capables de produire un biofilm, à l'exception des souches *L. gasseri* W14 et W18 (tableau 10).

L'étude de Shazadi *et al.*, (2021) montre que tous les souches ont possédé la capacité de formation de biofilm. *L. reuteri* (MT180537) et *L. brevis*(MW362790) étaient de puissants producteurs de biofilm, tandis que d'autres souches étaient considérées en tant que producteurs moyens de biofilm. Parmi les 43 souches sélectionnées, *L. reuteri* (MT180537) et *L. brevis* (MW362790) étaient de puissants producteurs de biofilm ($DO > 0,3$), confirmant leur capacité à tolérer des conditions environnementales difficiles et une colonisation réussie (SalasJara *et al.*, 2016). Das Purkayastha *et al.*, (2020) ont également signalé que *L. reuteri* K99 et *L. reuteri* K97 ont la capacité de produire des biofilms. De même, (Fuochi *et al.*, 2018) ont déclaré que *L. gasseri* et *L. fermentum* sont d'excellents producteurs de biofilm sur la base de l'indice de biofilm ($OD > 0,30$).

Tableau 10 : Capacités de production de peroxyde d'hydrogène, de biofilm, d'exopolysaccharides, d'acide L- et D-lactique des souches de lactobacilles vaginaux testées.

Species	Strains	H2O2*	Biofilm**	EPS (mg/l)	L-lactic acid (mmol/l)	D-lactic acid (mmol/l)
<i>L. gasseri</i>	F5	1	Moderate	153 ± 1.2 ^c	2.28 ± 0.13 ^a	5.12 ± 0.14 ^a
	W14	1	NB	104 ± 1.6 ^a	2.13 ± 0.09 ^a	4.74 ± 0.14 ^a
	W18	1	NB	138 ± 2.1 ^b	2.09 ± 0.17 ^a	6.65 ± 0.14 ^b
<i>L. helveticus</i>	P7	3	Very strong	196 ± 2.1 ^d	6.91 ± 0.17 ^c	13.11 ± 0.22 ^c
	S7	2	Moderate	191 ± 2.4 ^d	5.74 ± 0.14 ^b	12.81 ± 0.09 ^c
	P12	2	Very strong	236 ± 0.5 ^e	7.03 ± 0.12 ^c	13.04 ± 0.20 ^c
	U13	2	Moderate	202 ± 1.2 ^d	5.64 ± 0.31 ^b	12.72 ± 0.17 ^c
<i>L. rhamnosus</i>	E21	3	Moderate	212 ± 1.2 ^c	5.67 ± 0.29 ^b	12.91 ± 0.14 ^c
	L3	3	Moderate	228 ± 1.6 ^f	7.71 ± 0.21 ^d	12.88 ± 0.18 ^c
<i>L. salivarius</i>	N30	2	Strong	268 ± 2.9 ^h	8.94 ± 0.13 ^e	12.94 ± 0.11 ^c
<i>L. acidophilus</i>	ATCC 4356	3	nt	nt	7.78 ± 0.12 ^d	12.76 ± 0.15 ^c

Légende : Les souches ont été notées

1 (faible producteur, durée > 20 min), 2 (producteur moyen, durée 10-20 min) et 3 (producteur élevé, durée < 10 min). Les souches ont été classées comme non productrices de biofilm (NB) ($OD \leq OD_c$), Faibles producteurs de biofilm ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), Producteurs de biofilm modérés (2 producteurs de biofilm modérés $OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$). Forts producteurs de biofilm ($4 \times OD_c < OD \leq 8 \times OD_c$). Très forts producteurs de biofilm ($8 \times OD_c < OD$). (a-h) Différentes lettres dans la même colonne indiquent des différences significatives par le test ANOVA à un facteur, suivi du test post-hoc de Tukey ($p < 0,05$). Nt : non testé.

2-14- Exopolysaccharides :

Notre étude montre que toutes les souches étaient capables de produire des EPS avec des valeurs allant de 104 mg/L à 268 mg/L ; *L. salivarius* N30 (268 mg/L) et *L. helveticus* P12 (236 mg/L) ont produit la plus grande quantité d'EPS. L'analyse des articles en relation avec la thématique n'ont pas testé la production d'EPS par les lactobacilles vaginaux. Cependant. Il est à signaler que la production d'EPS çà considère comme une bonne propriété pour sélectionner une souche probiotique.

2-15- Test d'adhésion in vitro :

La capacité d'adhésion des 10 souches de Lactobacillus sélectionnées aux cellules Caco-2 et aux cellules VK2/E6E7 sont présentées sur la Fig.2. Dans l'ensemble de notre étude, la capacité d'adhésion était dépendante de la souche. Les souches *L. helveticus* P7 et *L. rhamnosus* E21 et L3 ont présenté la capacité de liaison la plus élevée aux cellules Caco-2 et

VK/E6E7.

Conformément à l'étude de Hutt *et al.*, (2016) où toutes les 10 souches de *L. crispatus* ont exprimé une bonne capacité d'adhésion aux cellules HeLa avec un pourcentage allant de 78.5 jusqu'à 92.1%. Ils ont confirmé alors que les lactobacilles vaginaux offrent en général une protection contre différentes maladies, notamment contre les infections urinaires récurrentes, vaginose bactérienne par la capacité d'adhérer et de concourir pour les sites d'adhésion dans l'épithélium vaginal (Borges *et al.*, 2014). Étant donné que cette propriété bénéfiques est très spécifique à la souche, plusieurs espèces et souches doivent être examinées lorsque de nouveaux probiotiques sont développés.

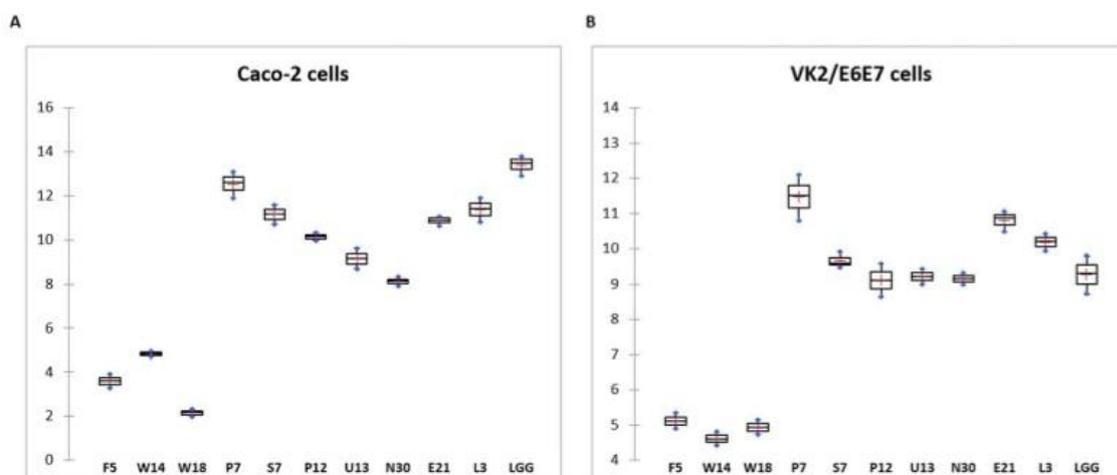


Figure 2 : Adhésion (%) des lactobacilles à Caco-2 et aux cellules épithéliales vaginales VK2/E6E7.

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 d'une 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.

Le microbiote vaginal des femmes en bonne santé est dominé par les lactobacilles, qui exercent d'importants effets bénéfiques sur la Santé de l'hôte.

L'objectif principal de l'étude de (Pino *et al.*, 2018) était d'étudier les propriétés probiotiques des lactobacilles isolés d'un écosystème vaginal sain afin de sélectionner des souches de lactobacilles prometteuses à utiliser à la fois comme compléments alimentaires probiotiques et comme aliment.

Dans l'étude Pino *et al.*, (2018) 261 lactobacilles isolés du vagin de femmes en bonne santé ont été criblés pour leurs caractéristiques probiotiques potentielles.

Nous avons essayé de compiler et de résumer les données existantes concernant les caractéristiques de sécurité, l'étude de (l'activité hémolytique, la résistance aux antibiotiques, Activité hydrolase des sels biliaries) et propriétés fonctionnelles (résistance au pH bas et aux sels biliaries, tolérance au lysozyme, survie gastro-intestinale, activité antagoniste contre les agents pathogènes, hydrophobicité, capacités d'auto-agrégation et de co-agrégation, hydrogène la production de peroxyde, la formation de biofilm, la production d'exopolysaccharides, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales vaginales humaines normales et aux cellules épithéliales Caco-2, et la production d'acide lactique) .

Les résultats suggèrent que parmi les souches de lactobacilles testées, les trois souches *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus salivarius*, remplissaient les critères probiotiques décrits ci-dessus que les autres isolats testées, et sont de bons candidats pour d'autres essais in vitro et in vivo.

Par conséquent, l'écosystème vaginal représente une source appropriée de candidats probiotiques qui pourraient être utilisés dans de nouvelles formules fonctionnelles pour l'eubiose gastro-intestinale et vaginale.

Bibliographie

Bibliographie

- **Abbara A. 2012.** Interactive Book in Obstetrics Gynecology. Alfred Fournier Institute. 6th version. Paris.
- **Al Kassaa, I., Hamze, M., Hober, D., Chihib, N. E. & Drider, D. 2014.** Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb. Ecol.* 67, 722–734.
- **Amouri I, Abbes S, Sellami H, Makni F, Sellami A, Ayadi A. 2010.** Vulvo vaginal candidiasis: review. *J Mycol Medical J Med Mycol.* 15-108.
- **Antonio M, Hawes S, Hillier S. 1999.** The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *The J Infect Dis.* 180 : 1950-1956.
- **Barbes C. et Boris S. 2009.** Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care and STDs.* 13(12):747-751.
- **Boris S., Suarez J., Vazques F. and Barbes C. 1998.** Adherence of Human vaginal *Lactobacilli* to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infection and Immunity* 66(5):1985-1989.
- **Borges, S., Silva, J. & Teixeira, P. 2014.** The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obstet.* 289, 479–489.
- **Borges S, Barbosa J, Teixeira P. 2016.** Gynecological health and probiotics. In: Watson RR, Preedy VR (eds) *Probiotics, prebiotics, and synbiotics - bioactive foods in health promotion.* Elsevier, London, pp 741–752.
- **Brown, J.M, and M.M. McNeil. 2003.** *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces and other aerobic actinomycetes.* In: Murray, P. R., E. J. Baron, J.H. Jorgensen, M. A. Tenover, and R. H. Tenover (ed.). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Bouhbot J. et Lepargneur J. 2012.** La vaginose en 2011: encore beaucoup d'interrogations. *Gynécologie obstétrique & fertilité.* 40 (1) : 31-36.
- **Caggia, C., De Angelis, M., Pitino, I., Pino, A. & Randazzo, C. L. 2015.** Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. *Food Microbiol.* 50, 109–117.
- **Caillouette J. et al. 2005.** Vaginal pH as a marker for bacterial pathogens and menopausal status. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 176(6): 1270-1277.
- **Danielsen, M. & Wind, A. 2003.** Susceptibility of *Lactobacillus* spp. To antimicrobial

agents. *Int.J. Food Microbiol.* 26, 1–11.

- **DeMan, Rogosa and Sharpe. 1960.** A medium for the cultivation of Lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology.* 23:130-135.
- **Di Gioia D., Biavati B. 2018.** Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety: Conclusive Remarks and Future Perspectives. In: Di Gioia D., Biavati B. (eds) *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety.* Springer, Cham.
- **DJAMILI H. 2010.** Vulvovaginal candidiasis in the hospital consultantvmilitary instruction mohamed of Rabat: Prospective study. Doctoral thesis in medicine, faculty of medicine and pharmacy, Morocco, 81p.
- **Dubernet, S., Desmaures, N. & Gueguen, M. 2002.** A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol. Lett.* 214, 271–275.
- EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J.* 10, 2740. (2012).
- EFSA. Technical guidance - Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human or veterinary importance (2008).
- **EZZARIGA N. 2015.** Probiotique : applications thérapeutiques et effets secondaires thèse doctorat.
- **Falsen E, Pascual C, Sjoden B, Ohlen M, Collins M. 1999.** Phenotypic and Phylogenetic characterization of a novel Lactobacillus species from human sources : description of *Lactobacillus inerssp. nov.* *Int J Syst Bacteriol.* 49 : 217-221.
- **Faure S, Pubert C, Rabiller J, Taillez J, Yvain A-L. 2013.** Que savons-nous des probiotiques ? *Actual Pharm.* 18–21.
- **Federighi Michel. 2005.** Bactériologie alimentaire compendium d'hygiène des aliments. Paris. 2^{ème} édition: Econornica.
- Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). (2016). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. 2002. Accessed in [fp://fp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf](http://fp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf). January 12th (2016).
- **Flores, M., and D. Welch. 1992.** Section 6. Mycology: culture media, p.6.7.1-6.7.3. In : H.D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- **Handwerger, S., Pucci, M. J., Volk, K. J., Liu, J. & Lee, M. S. 1994.** Vancomycin-resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic

peptidoglycan precursors that terminate in lactate. *J. Bacteriol.* 176, 260–264.

- **Hütt, P. et al. 2006.** Characterisation of probiotic properties in human vaginal lactobacilli strains. *Microb. Ecol. Health Dis.* 12, 30484.
- **Ibarreche Pérez, M., Castellano, P. & Vignolo, G. 2014.** Evaluation of anti-*Listeria* meat borne *Lactobacillus* for biofilm formation on selected abiotic surfaces. *Meat Sci.* 96, 295–303.
- **Klebanoff MA, Schwebke JR, Zhang J, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW. 2004.** Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 104 : 267–72.
- **Lachlak N. 2006.** Study of *Lactobacillus acidophilus* complex. Essentiel compose of the vaginal flora. Thèse de doctorat. Université de Toulouse. France.
- **Lefèvre JC. 1993.** Vaginoses bactériennes. Données bactériologiques récentes : de la physiopathologie au traitement. *Rev Fr GynecolObstet.* 6 : 251-64.
- **Lepargneur J. et Rousseau V. 2002.** Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction.* 31 :485-494.
- **Leveau J., Bouix M. et Deroissart H. 1991.** Manual of food bacteriology. Polytechnica. Paris: 2-40.
- **Leveau J. et Bouix M. 1993.** Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel. Paris. Lavoisier.pp 612.
- **Macklaim, J. M. et al. 2013.** Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus* inersin health and dysbiosis. *Microbiome.* 1, 12–10,
- **Madigan M. et Martinko J. 2007.** Biologie des micro-organismes. 11 e édition. France. 1200 pp 383.
- **Maggi L, Mastromarino P, Macchia S, Brigidi P, Pirovano F, Matteuzi D. and Conte U. 2000.** Technological and biological evaluation oftablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50:389-395.
- **Martín R, Suárez JE. 2010.** Biosynthesis and Degradation of H₂O₂ by Vaginal *Lactobacilli*. *Appl Environ Microbiol.* 5-400.
- **Matthew E. Falagas, Gregoria I. 2006.** Betsi and Stavros Athanasiou, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review, 58, 266–272.
- **Parolin, C. et al. 2015.** Isolation of Vaginal *Lactobacilli* and Characterization of Anti-*Candida* Activity. *PLoS One* 10(6), e0131220.
- **Petrova, M. I., Reid, G., Vanechoutte, M. & Lebeer, S. 2017.** *Lactobacillus iners*: Friend

or Foe? Trends Microbiol. 25, 182–191.

- **Petrova, M. I. et al. 2018.** Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. *Front. Microbiol.* 9, 1278.
- **Pino, A. et al. 2018.** Polyphasic approach to study physico-chemical, microbiological and sensorial characteristics of artisanal Nicastrese goat's cheese. *Food Microb.* 70, 143–154.
- **Pinto Vizoso, M. G., Franz, C. M., Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. 2006.** *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int J Food Microbiol.* 109, 205–214.
- **Pithva, S., Shekh, S., Dave, J. & Vyas, B. R. 2014.** Probiotic attributes of autochthonous *Lactobacillus rhamnosus* strains of human origin. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 173, 259–277.
- **Prescott et al. 2001.** *Microbiologie*. 3^{ème} édition. Boeck. Paris. 1088. pp 383.
- **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.
- **Ravel, J. et al. 2011.** Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 4680–4687.
- **Reid G. 2001.** Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr*; 73 (suppl): 437-43.
- **Rogosa A, Sharpe M. 1960.** Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J Gen Microbiol.* 23 : 197-201.
- **Ronnqvist D. 2007.** Urogenetal probiotics Potential role of *Lactobacillus* in the prevention of urogenital infections in women. Umeå. Sweden.
- **Rousseau. V. 2004.** Evaluation of oligosaccharides with a probiotic effect against the vaginal microflora. Doctoral thesis. Toulouse. France.
- **Salminen, S., Von Wright, A., Ouwehand, A. & Holzapfel, W. H. 2000.** Safety assessment of starters and probiotics. In M. Adams & R. Nout (Eds) *Fermentation and food safety*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, 239–252.
- **Sanders, M. E. et al. 2010.** Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 3, 164–185.
- **Santos, C. M. et al. 2016.** Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiology.* 162, 1195–1207.
- **Solieri, L., Bianchi, A., Mottolese, G., Lemmetti, F. & Giudici, P. 2014.** Tailoring the probiotic potential of non-starter *Lactobacillus* strains from ripened Parmigiano Reggiano cheese by in vitroscreening and principal component analysis. *Food Microb.* 38, 240–249.
- **Song Y, Kato N, Matsumiya Y, Liu C, Kato H, Watanabe K. 1999.** Identification of and

Hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and new born infants. *J Clin Microbiol.* 37 (9) : 3062-3064.

- **Stsepetova, J. et al. 2017.** Assessment of phenotypic and genotypic antibiotic susceptibility of vaginal *Lactobacillus* sp. *J. Appl. Microbiol.* 123, 524–534.

- **Tailliez P. 2004.** Lactobacilli: properties. Habitats. Physiological role and interest in human health. MASSON. Paris. 6:35-41.

- **Tarnberg M, Jakobsson T, Jonasson J, Forsum U. 2002.** Identification of randomly selected colonies of lactobacilli from normal vaginal fluid by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions. *APMIS.* 110 (11) : 802-810.

- **Torino, M. I., Taranto, M. P., Sesma, F. & de Valdez, G. F. 2001.** Heterofermentative pattern and exopolysaccharide production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15807 in response to environmental pH. *J Appl Microbiol.* 91, 846–852.

- **Vallor A, Antonio M, Hawes S, Hillier S. 2001.** Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli : role of hydrogen peroxide production. *J Infect Dis.* 184 : 1431-1436.

- **Van de Wijgert, J. H. et al. 2014.** Te vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One.* 9(8):e105998.

- **Verdenelli MC, Coman MM, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2014.** Evaluation of antipathogenic activity and adherence properties of human *Lactobacillus* strains for vaginal formulations. *J Appl Microbiol* 116:1297–1307.

- **Whitman W.B. et al. 2009.** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2ème édition. Volume 3. Springer. New York.

- **Zhou, X. et al. 2007.** Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J.* 1, 121–133.

Annexes

Annexes

Annexe 1 :

Composition de milieu de culture d'isolement Gélose MRS :

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée (De Man *et al.*, 1960) :

Milieu MRS :

Peptone 10,00 g

Extrait de viande 10,00 g

Extrait de levure 5,00 g

Glucose 20,00 g

Phosphate disodique 2,00 g

Acétate de sodium 5,00 g

Polysorbate80 1,00 g

Citrate d'ammonium 2,00 g

Sulfate de magnésium 0,10 g

Sulfate de manganèse 0,05 g

Agar 15,00 g

pH final à 25°C : $6.5 \pm 0,2$

Annexe 3 les articles inclus dans la partie expérimentale

- **Al Kassaa, I., Hamze, M., Hober, D., Chihib, N. E. & Drider, D. 2014.** Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microb. Ecol.* 67, 722–734.
- **Aldunate M, Srbinovski D, Hearps AC, Latham CF, Ramsland PA, Gugasyan R et al. 2015.** Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 6:1–23.
- **Amin M, Goodarzi H, Orang Z, Farsi S, Jorfi M. 2011.** Isolation and identification of Lactobacillus species from the vagina and their antimicrobial properties. *Afr J Microbiol Res* 5:3300–3304.
- **Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA et al. 2001.** Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 185:375–379.
- **Atassi F, Servin AL. 2010.** Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain *Lactobacillus johnsonii* NCC933 and vaginal strain *Lactobacillus gasseri* KS120.1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS Microbiol Lett* 304:29–38.
- **Belma Aslim and Emine Kilic. 2006.** Some Probiotic Properties of Vaginal Lactobacilli Isolated from Healthy Women.
- **Borges S, Silva J, Teixeira P. 2014.** The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 289:479–489.
- **Bouridane H, Sifour M, Idoui T, Annick L, Thonard P. 2016.** Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iran J Biotech* 14:192–201.
- **Daood II, Shareef SY, Al JIH, Almukhtar SH. 2020.** Evaluation and antimicrobial susceptibility testing of enterococcus faecalis isolated from high vagina. *EurAsian J Biosci* 14:1715–1720
- **Das Purkayastha S, Bhattacharya MK, Prasad HK, Bhattacharjee MJ, de Mandal S, Mathipi V et al (2020)** Probiotic and cytotoxic potential of vaginal *Lactobacillus* isolated from healthy northeast Indian women. *J Pure Appl Microbiol* 14:205–214.
- **Das Purkayastha S, Bhattacharya MK, Prasad HK, Bhattacharjee MJ, de Mandal S, Mathipi V et al. 2020.** Probiotic and cytotoxic potential of vaginal *Lactobacillus* isolated from healthy northeast Indian women. *J Pure Appl Microbiol* 14:205–214.
- **DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ, Robaczewska A, Sun**

- CL, Goltsman DSA, Wong RJ, Shaw G, Stevenson DK, Holmes SP, Relman DA. 2015.** Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:11060–11065.
- **Dlamini ZC, Langa RLS, Aiyegoro OA, Okoh AI. 2019.** Safety evaluation and colonisation abilities of four lactic acid bacteria as future probiotics. *Probiotics Antimicrob Proteins* 11 :397–402..
- **Eschenbach DA, Davick PR, Williams BL, Klebanoff SJ, Young-Smith K, Critchlow CM, et al. 1989.** Prevalence of hydrogenperoxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* ; 27 :251-6.
- **Fuochi V, Cardile V, Petronio G, Furneri PM. 2018.** Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. Strains from human vagina. *J Appl Microbiol* 126:1541–1550 .
- **Gil NF, Martinez RC, Gomes BC, Nomizo A, De Martinis EC. 2010.** Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz J Microbiol*; 41: 6 14.
- **Klebanoff, S.J., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A. and Waltersdorph, A.M. 1991.** Control of the microbial flora of the vagina by H₂O₂-generating lactobacilli. *Journal of Infectious Diseases* 164, 94–100.
- **Leahy, S., Higgins, D., Fitzgerald, G. & Van Sinderen, D. 2005.** Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 98, pp. 1303-1315.
- **Mastromarino, P. et al. 2002.** Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. *J. Appl. Microbiol.* 93, 884–893.
- **Monika Kumherová1 & Kristina Veselá1 & Michaela Kosová1 & Jaromír Mašata2 & Šárka Horáková1 & Jan Šmidrkal1. 2020.** Nouveaux lactobacilles probiotiques potentiels pour la prévention et le traitement des infections vulvo- vaginales.
- **Özogul F, Hamed I. 1660–1670.** The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 58.
- **Rabe LK, Hillier SL. 2003.** Optimization of media for detection of hydrogen peroxide production by *Lactobacillus* species. *J Clin Microbiol* 41:3260–3264. .
- **Salas-Jara M, Ibabaca A, Vega M, García A. 2016.** Biofilm forming *Lactobacillus*: new challenges for the development of probiotics. *Microorganisms* 4:35. .
- **Sangeetha KT, Golia S, Vasudha CL. 2015.** A study of aerobic bacterial pathogens associated with vaginitis in reproductive age group women (15–45 years) and their sensitivity pattern. *Int J Res Med Sci* 3:2268–2273.
- **Shazadi Kiran, Najma Arshad. 2021.** Evaluation of inhibitory and probiotic properties of

lactic acid bacteria isolated from vaginal microflora.

- **Shehata, M., El Sohaimy, S., El-Sahn, M. & Youssef, M. 2016.** Screening of isolated potential probiotic lactic acid bacteria for cholesterol lowering property and bile salt hydrolase activity. *Annals of Agricultural Sciences*, 61(1), p. 65–75.
- **Stoyancheva G, Marzotto M, Dellaglio F, Torriani S. 2014.** Bacteriocin production and gene sequencing analysis from vaginal *Lactobacillus* strains. *Arch Microbiol* ; 196: 64553.
- **Yüksekdağ ZN, Beyatli Y, Aslim B. 2004.** Determination of some characteristic saccoid forms of lactic acid bacteria isolated from Turkish kefir with natural probiotic. *LWT-FoodSciTechnol* 37:663667.

Résumé

Lactobacilli are one of the main bacteria that exist in the vagina and have a great beneficial impact on women's health. In this study (article by Pino et al., 2018), an identification and screening was carried out on 261 strains of vaginal lactobacilli for their probiotic effect. The identification made it possible to detect 8 species, namely: *L. gasseri* (28%), *L. salivarius* (20%), *L. crispatus* (18%), *L. helveticus* (13%), *L. fermentum* (10%), *L. rhamnosus* (10%), *L. paracasei* (1%) and *L. plantarum* (1%). The study of the probiotic potential of the identified strains showed that only 3 strains fulfilled the chosen probiotic criteria, namely, strains: *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus salivarius*, and are good candidates for further *in vitro* and *in vivo* assays.

Keywords: Vaginal lactobacilli, probiotics, probiotic potential, strain, phenotypically, genotypically, *in vitro*, *in vivo*.

Les lactobacilles sont l'un des principales bactéries existant à un niveau du vagin et qui ont un grand impact bénéfique sur la santé des femmes. Dans cette étude (article de Pino et al., 2018), une identification et un criblage a été porté sur 261 souches de lactobacilles vaginales pour leur effet probiotique. L'identification a permis de détecter 8 espèces à savoir : *L. gasseri* (28%), *L. salivarius* (20%), *L. crispatus* (18%), *L. helveticus* (13%), *L. fermentum* (10%), *L. rhamnosus* (10%), *L. paracasei* (1%) et *L. plantarum* (1%). L'étude du potentiel probiotique des souches identifiées a démontré que seulement 3 souches ont remplissaient les critères probiotique choisis à savoir, les souches : *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus helveticus* et *Lactobacillus salivarius*, et sont de bons candidats pour d'autres essais *in vitro* et *in vivo*.

Mots clé : Les lactobacilles vaginaux, probiotiques, potentiel probiotique, souche, phénotypiquement, génotypiquement, *in vitro*, *in vivo*.

العصيات اللبنية هي واحدة من البكتيريا الرئيسية الموجودة في المهبل ولها تأثير مفيد كبير على صحة المرأة. في هذه ، تم تحديد وفحص 261 سلالة من العصيات اللبنية المهبليّة لتأثيرها (Pino et al., 2018) الدراسة (مقال بواسطة *L. gasseri* (28%) ، البروبيوتيك. أتاح التحديد الكشف عن 8 أنواع ، وهي *L. salivarius* (20%) ، *L. crispatus* (18%) ، *L. helveticus* (13%) ، *L. fermentum* (10%) ، *L. rhamnosus* (10%) ، *L. paracasei* (1%) ، *L. plantarum* (1%). أظهرت دراسة إمكانات الكائنات الحية : المجهريّة للسلالات المحددة أن 3 سلالات فقط استوفت معايير الكائنات الحية المجهريّة المختارة ، وهي السلالات : وهي مرشحة *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus helveticus* و *Lactobacillus salivarius* ، جيدة لمزيد من الاختبارات في المختبر وفي الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: العصيات اللبنية المهبليّة ، البروبيوتيك ، إمكانات البروبيوتيك ، السلالة ، النمط الظاهري ، النمط الجيني ، في المختبر ، في الجسم الحي.