

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
**Université A. MIRA - Bejaia**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département de Microbiologie**  
**Filière : Sciences biologiques**  
**Spécialité : Microbiologie Alimentaire et Santé**



Mémoire de Fin de Cycle  
En vue de l'obtention du diplôme

**MASTER**

*Thème*

**Isolement de souches probiotiques  
de la flore vaginale**

Présenté par :

**M<sup>lle</sup>OUARABI Liza**

Soutenu le : **13 Juin 2016**

Devant le jury composé de :

Mme YAHIAOUI Haoua	M.A.A	Présidente
Melle BENDALI Farida	M.C.A	Encadreur
Mme NOURI-SAIDANI Karima	M.A.A	Examinatrice
Mr OUARABI Brahim	Médecin	Invité

**Année universitaire : 2015 / 2016**

## ***Remerciements***

***J'adresse mes sincères remerciements tout d'abord à ma promotrice Dr Bendali Farida pour tous ses conseils, ses encouragements et pour la qualité de son encadrement dont j'ai bénéficié lors de la préparation de ce mémoire de Master.***

***J'adresse également mes sincères remerciements aux membres de Jury :***

***Mme Yahiaoui Haoua et Mme Nouri-Saidani Karima pour l'honneur qu'elles m'ont fait en examinant ce mémoire et pour le temps et l'attention qu'elles ont bien voulu consacrer à ce travail.***

***Mes sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliqué qui m'ont permis de réaliser ce travail dans les meilleures conditions.***

***Enfin, il m'est agréable d'adresser mes chaleureux remerciements à tous les enseignants qui ont contribué à ma formation au sein de l'université de Bejaia et à tous ceux que je n'ai pas cités et qui m'ont pourtant aidés de près ou de loin à la réalisation de cette présente étude.***

## ***Dédicaces***

***Je dédie ce modeste travail à :***

***Mes très chers parents :***

***Qui ont œuvré pour ma réussite, de par leur amour et leur soutien. En témoignage de tous les sacrifices consentis et de leurs précieux conseils, pour toute leur assistance et leur présence dans ma vie, qu'ils reçoivent à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.***

***Mes très chères sœurs Lydia et Loulou :***

***Qui n'ont cessé d'être pour moi source de réconfort, d'amour et de générosité.***

***Ma grande amie Amanda Khelil et mon bras droit Ritchy***

***Ma petite famille de la biologie :***

***A leur tête Samsamus, Amir, Asma et Mira.***

## Liste des abréviations

A :Absorbance

ADN :Acide Désoxyribonucléique

*C.* : *Candida*

*E.* :*Escherichia*

*En.* :*Enterococcus*

HSV : Herpes Simplex Virus

*Lb.* : *Lactobacillus*

*S.* :*Staphylococcus*

sp : species

ssp :subspecies

UFC : Unité Formant Colonie

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Coupe sagittale de l'utérus .....	3
<b>Figure 2.</b> Mécanismes de l'adhésion spécifique et non spécifique aux cellules vaginales des lactobacilles .....	8
<b>Figure 3.</b> Mécanisme d'adhésion des lactobacilles à la fibronectine humaine .....	8
<b>Figure 4.</b> Mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adhésion.....	9
<b>Figure 5.</b> Lactobacilles d'une flore vaginale normale (à gauche) et cellules épithéliales recouvertes de bactéries (vaginose bactérienne) (à droite) .....	10
<b>Figure 6.</b> Facteurs influençant le pH vaginal .....	11
<b>Figure 7.</b> Fonctions potentielles attribuées aux probiotiques.....	14
<b>Figure 8.</b> Principe d'action des Ellen® Probiotic Tampons ®.....	15
<b>Figure 9.</b> Technique d'un prélèvement vaginal .....	16
<b>Figure 10.</b> Photographies optiques (grossissement x100) de l'aspect cellulaire de quatre isolats microbiens après coloration de Gram ou au bleu de méthylène (A et D : <i>Candida</i> , B : bacille lactique, C : <i>Staphylococcus</i> ).....	24
<b>Figure 11.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°1.....	26
<b>Figure 12.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°2.....	27
<b>Figure 13.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°3.....	28
<b>Figure 14.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°4.....	28
<b>Figure 15.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°6.....	30
<b>Figure 16.</b> Répartition de la flore vaginale de la patiente N°7.....	31
<b>Figure 17.</b> Résultat du criblage des souches de lactobacilles quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.....	33
<b>Figure 18.</b> Résultat du criblage des souches d' <i>E. coli</i> quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.....	35

<b>Figure 19.</b> Résultats du criblage des souches de <i>Staphylococcus</i> quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.....	36
<b>Figure 20.</b> Résultat du criblage des souches d' <i>Enterococcus</i> quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.....	37
<b>Figure 21.</b> Résultat du criblage des souches de <i>Candida</i> quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.....	38
<b>Figure 22.</b> Activité hémolytique des souches de lactobacilles.....	39
<b>Figure 23.</b> Sensibilité aux antibiotiques de quelques souches de lactobacilles vaginaux.....	41
<b>Figure 24.</b> Test des spots montrant l'activité antibactérienne de culture de souches de lactobacilles à l'égard de souches pathogènes.....	42
<b>Figure 25.</b> Activité antimicrobienne des souches de lactobacilles vaginaux à l'égard d' <i>Enterococcus</i> sp. 5EN8 (A), <i>E. coli</i> 6E2 (B) et <i>S. aureus</i> 7S3 (C).....	44
<b>Figure 26.</b> Activité antifongique des souches de lactobacilles à l'égard de la souche <i>Candida</i> sp. C1.....	45
<b>Figure 27.</b> Pourcentage de survie des souches de lactobacilles aux pH 1 et 1,5.....	46
<b>Figure 28.</b> Pourcentage survie des souches de lactobacilles en présence de la bile .....	47

### **Liste des tableaux**

<b>Tableau I.</b> Importance du cycle oestroprogestatif : impact sur les flores vaginales et les risques infectieux post-chirurgicaux (hystérectomie).....	5
<b>Tableau II.</b> Conditions de culture pour le dénombrement de la flore totale et des Lactobacilles.....	17
<b>Tableau III.</b> Tests d'identification d' <i>E. coli</i> .....	19
<b>Tableau IV :</b> Test d'identification des souches pathogènes isolées.....	20
<b>Tableau V :</b> Liste des antibiotiques testés.....	22
<b>Tableau VI :</b> Classification des souches de lactobacilles selon Mathur et <i>al.</i> (2006).....	32

<b>Tableau VII :</b> Classification des souches d' <i>E.coli</i> selon Mathur et al.(2006).....	33
<b>Tableau VIII :</b> Classification des souches de <i>Staphylococcus</i> selon Mathur et al.(2006).....	36
<b>Tableau IX :</b> Classification des souches d' <i>Enterococcus</i> selon Mathur et al.(2006).....	37
<b>Tableau X :</b> Classification des souches de <i>Candida</i> selon Mathur et al.(2006).....	38

# Sommaire

Introduction.....	1
-------------------	---

## Partie Bibliographique

I. Flore génitale de la femme .....	3
I. 1. Secteurs microbiologiques de l'appareil génital féminin .....	3
I. 2. Flore vaginale normale .....	3
I. 3. Evolution de la flore vaginale normale.....	4
I. 3. 1. Avant la puberté.....	4
I. 3. 2. Au moment de la puberté .....	4
I. 3. 3. Chez la femme adulte.....	4
I. 3. 4. Au cours de la vie génitale de la femme.....	5
I. 3. 5. Après la ménopause .....	5
I. 4. Rôle protecteur de la flore de Doderlein.....	6
I. 4. 1. Inhibition de la croissance de l'agent pathogène.....	6
I. 4. 2. Inhibition de l'adhésion des agents pathogènes.....	7
I. 4. 3. Inhibition de l'expansion des agents pathogènes : la co-agrégation.....	9
II. Déséquilibre de flore vaginale.....	9
II. 1. Vulvo-vaginites candidosiques.....	10
II. 2. Les vaginoses bactériennes .....	10
II. 3. Vaginite bactérienne ou parasitaire.....	10
II. 4. Etiologie des infections vaginales .....	11
II. 5. Complication des infections vaginales.....	12
II. 6. Récurrence des infections vaginales.....	12
II. 7. Traitement des infections vaginales.....	12

<b>II. 8. Perspectives thérapeutiques : Utilisation des probiotiques.....</b>	<b>13</b>
<b>III. Probiotiques.....</b>	<b>13</b>
<b>III. 1. Définition .....</b>	<b>13</b>
<b>III. 2. Caractéristiques.....</b>	<b>13</b>
<b>III. 3. Effets bénéfiques des probiotiques .....</b>	<b>13</b>
<b>III. 4. Les lactobacilles en tant que probiotiques.....</b>	<b>14</b>

## **Matériel et Méthodes**

<b>I. Prélèvements vaginaux.....</b>	<b>16</b>
<b>I. 1 Origine des prélèvements.....</b>	<b>16</b>
<b>I. 2. Méthode de prélèvement.....</b>	<b>16</b>
<b>II. Dénombrement des Lactobacilles et de la flore totale.....</b>	<b>16</b>
<b>III. Isolement, purification et identification des souches.....</b>	<b>17</b>
<b>III. 1. Isolement des Lactobacilles.....</b>	<b>17</b>
<b>III. 2. Isolement des souches pathogènes.....</b>	<b>17</b>
<b>III. 3. Purification et identification phénotypique des souches.....</b>	<b>18</b>
<b>IV. Caractérisation des souches.....</b>	<b>20</b>
<b>IV. 1. Criblage des souches isolées quant à leur pouvoir d'adhésion sur surfaces en Polystyrène.....</b>	<b>20</b>
<b>IV. 1. 1. Ensemencement de la microplaque .....</b>	<b>20</b>
<b>IV. 1. 2. Coloration au cristal violet (0,1%).....</b>	<b>21</b>
<b>IV. 2. Activité hémolytique.....</b>	<b>21</b>
<b>IV. 3. Résistance aux antibiotiques .....</b>	<b>21</b>
<b>IV. 4. Test d'activité antibactérienne .....</b>	<b>22</b>
<b>IV. 5. Résistance à l'acidité et à la bile des souches de Lactobacilles.....</b>	<b>23</b>

IV. 5. 1. Test de la résistance au pH acide.....	23
IV. 5. 2. Test de résistance à la bile .....	23

## Résultats et Discussion

I. Isolement et identification présumptive des souches lactiques et pathogènes .....	24
II. Identification phénotypique des souches pathogènes.....	25
II. 1. Souches d' <i>E. coli</i> et de <i>Proteus</i> .....	25
II. 2. Souches de <i>Staphylococcus</i> .....	25
II. 3. Souches de <i>Micrococcus</i> .....	25
III. Profil microbien des flores vaginales en fonction des patientes.....	25
IV. Caractérisation des souches isolées.....	32
IV. 1. Capacité d'adhésion et de formation de biofilms.....	32
IV. 1. 1. Capacité d'adhésion des souches de lactobacilles.....	32
IV. 1. 2. Capacité d'adhésion des souches pathogènes .....	33
V. Activité hémolytique des souches de lactobacilles et pathogènes .....	39
VI. Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques .....	40
VII. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles.....	42
VIII. Sensibilité des souches de lactobacilles à l'acidité et aux sels biliaires .....	46
CONCLUSION .....	48

### Références bibliographiques

### Annexes

# *Introduction*

## Introduction

De nombreux microorganismes coexistent dans l'organisme humain et constituent ce qu'il est convenu de désigner sous le terme de « Flore normale ou commensale ». Ces microorganismes appartenant à diverses espèces sont inoffensifs à l'état normal et souvent doués d'un effet positif. Parmi ces flores, la flore vaginale est particulièrement importante par sa dimension, sa diversité, son évolution en fonction de l'âge et son rôle (**Bergone-Bérézin, 2007**).

La flore vaginale est dominée par des Lactobacilles de différentes espèces composant « la flore de Doderleïn ». Cette flore laisse apparaître peu à peu aux chercheurs les fils conducteurs de sa composition et de très complexes propriétés des lactobacilles la composant (**Lepargneur et Rousseau, 2002**). Les lactobacilles forment un élément très important de l'écosystème vaginal et sont prédominant ( $10^7$  - $10^8$  UFC/g de sécrétion vaginale), chez les femmes saines pré-ménopausées. En effet, beaucoup d'infections des voies urinaires et vaginales sont associées à une diminution de la population des lactobacilles vaginaux (**Strus et al., 2005**).

En outre, l'âge, les rapports sexuels, les grossesses, les oestroprogestatifs sont autant de facteurs de variation de cette flore ainsi que les habitudes hygiéno-vestimentaires telles que les douches et toilettes vaginales réalisées avec des produits mal adaptés de même que le port de protections et de dispositifs intra-utérins (**Le Blanc, 2009**).

Malgré un traitement approprié, les taux de récurrences sont très importants, cela conduit à utiliser de plus en plus souvent des produits correcteurs de la flore vaginale tels que les probiotiques, capables de suppléer la flore défaillante par une flore de remplacement (**Faure et al., 2013**). Il est en effet bien établi par exemple que le Métronidazole, actuelle molécule thérapeutique de choix de la vaginose voit son activité diminuer dès la deuxième cure chez une femme qui récidive, et que tous les traitements de chimiothérapie anti-infectieux (surtout donné pour d'autres pathologies que gynécologiques), ont tous un impact négatif très important sur la flore de Doderleïn (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

Il semble désormais possible d'envisager de la reconstituer avec des bactéries probiotiques spécifiquement choisies, même s'il n'y a aucun consensus en particulier, sur le mode d'administration : voie orale ? Voie vaginale ? Doit-on utiliser des associations de lactobacilles et si oui, lesquelles ? Quel rythme d'administration ? Autant de questions qui

montrent bien que la recherche clinique en matière de probiotiques reste un long chemin à parcourir (**Bohbot et Lepargneur, 2012**).

C'est dans ce contexte que s'inscrit cette étude qui a comme objectifs :

- Dans un premier temps : l'étude de la diversité de la flore vaginale et plus particulièrement, le dénombrement et la recherche de la flore de Doderlein « lactobacilles » chez des femmes atteintes de diverses affections et consultant au niveau d'un centre hospitalier privé de la wilaya de Bejaïa et,
- Dans un deuxième temps : la caractérisation des souches de lactobacilles isolées quant à leur potentiel probiotique et ce afin de sélectionner une souche ou des souches potentiellement probiotiques.

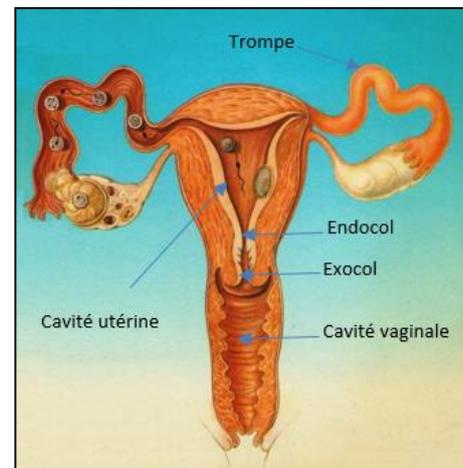
Pour ce faire et afin de cerner le contexte de cette étude, une synthèse bibliographique relative au sujet est confectionnée donnant un aperçu sur la flore vaginale normale, les différentes infections vaginales et le rôle des lactobacilles au niveau de la muqueuse vaginale. Par la suite, la méthodologie adoptée dans cette étude sera détaillée, les résultats obtenus seront présentés et discutés en se référant à la littérature. Enfin, les conclusions auxquelles ils nous ont amenés seront exposées suivies de certaines perspectives.

# *Synthèse bibliographique*

## I. Flore génitale de la femme

### I. 1. Secteurs microbiologiques de l'appareil génital féminin

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



**Figure1.** Coupe sagittale de l'utérus (**Kamina, 1979**)

Le milieu vaginal est composé d'une phase liquide riche en eau et en substances d'origine plasmatique complétées par les composants de la glaire cervicale. Les éléments solides du milieu vaginal consistent en cellules vaginales exfoliées, leucocytes et bactéries dont la concentration varie de  $10^6$  à  $10^{12}$  bactéries par gramme de sécrétion vaginale selon que cette flore est normale ou pathologique (**Quentin, 2006**).

### I. 2. Flore vaginale normale

Le vagin est une cavité septique contenant une flore microbienne normale qui peut subir des modifications physiologiques importantes sous l'influence de nombreux facteurs tels que : âge, imprégnation hormonale, activité sexuelle, contraception, conditions hygiéniques. L'écologie vaginale d'une femme saine comporte donc un système bactérien dynamique et mouvant en fonction des différents stades de la vie génitale (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

Pour une femme saine d'âge moyen post pubertaire et pré ménopausée non enceinte et non menstruée, la flore vaginale est dominée par des lactobacilles de différentes espèces composant « la flore de Doderlein » (**Quentin, 2006**). Les principales espèces de lactobacilles sont présentées dans le **tableau I (Annexe I)**. La concentration usuelle de lactobacilles en l'absence de pathologie est située entre  $10^5$  et  $10^8$  bactéries par gramme de sécrétion vaginale. Parallèlement à cette flore dominante on peut observer de très nombreuses espèces issues de la flore digestive. Cette flore est à  $10^4$  bactéries par gramme de sécrétion vaginale et est en constante évolution (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

## I. 3. Evolution de la flore vaginale normale

La flore vaginale est évolutive et subit d'importantes modifications en fonction de l'âge (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

### I. 3. 1. Avant la puberté

A la naissance, la flore est absente puis le tractus vaginal sera rapidement colonisé par des bactéries issues de fèces et des mains de la mère ou du personnel soignant mais cette flore est quantitativement pauvre. La flore vaginale est formée majoritairement de bactéries fécales et cutanées (*Escherichia coli*, staphylocoques) (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

Chez le nourrisson et durant l'enfance, l'absence d'une imprégnation oestrogénique se traduit par une absence de sécrétion de l'endocol et par des cellules épithéliales pauvres en glycogène. Dans ces conditions, les bacilles de Doderlein sont absents et le pH vaginal est élevé (**Larréque et al., 2004**).

### I. 3. 2. Au moment de la puberté

On entre dans la phase d'imprégnation œstrogénique débutante et la sécrétion d'œstrogènes s'accompagne de la colonisation progressive du vagin par une flore d'adultes : lactobacilles et bactéries anaérobies. La synthèse de glycogène liée à la sécrétion d'œstrogènes va constituer le substrat préférentiel de *Lactobacillus* sp. Les espèces les plus actives à cet effet sont *Lactobacillus crispatus*, et *Lactobacillus jensenii* (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

Les conditions vaginales locales se rapprochent puis s'identifient à celle de la femme adulte. Le pH vaginal devient acide car la flore vaginale riche en bacilles de Doderlein produit de l'acétate et du lactate à partir de son substrat préférentiel « le glycogène » (**Larréque et al., 2004**).

### I. 3. 3. Chez la femme adulte

Cette évolution se confirme mais va subir des variations liées aux différentes étapes de la vie génitale de la femme. L'écosystème vaginal est fragilisé par les menstruations, l'accouchement et les rapports sexuels et l'équilibre vaginal sera rompu par un nombre élevé de partenaires sexuels, par la présence d'un stérilet ou d'autres facteurs tels que l'usage de la douche vaginale (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

## I. 3. 4. Au cours de la vie génitale de la femme

La grossesse et le post-partum constituent aussi des facteurs de variations des flores vaginales et peuvent s'accompagner d'un risque infectieux. Celui-ci est particulièrement à surveiller après une hystérectomie en phase postopératoire au cours de laquelle est bouleversé l'équilibre bactérien génital : le cycle œstroprogestatif comportera, pendant la phase proliférative un risque évalué à 32 % et de 18 % pendant la phase progestative (**Bergogne-Bérézin, 2007**) (**tableau I**). Durant la grossesse, la flore vaginale varie avec une augmentation importante des lactobacilles au troisième trimestre et réduction proportionnelle des souches d'*E. coli* (**Moutquin, 2000**).

**Tableau I.** Importance du cycle oestroprogestatif : impact sur les flores vaginales et les risques infectieux post-chirurgicaux (hystérectomie) (**Menard et Bretelle, 2012**).

	<b>Phase proliférative</b>	<b>Phase progestative</b>
<b><i>Risque infectieux</i></b>	<b>32 %</b>	<b>18 %</b>
<b><i>Entérobactéries</i></b>	<b>44 %</b>	<b>22 %</b>
<b><i>E. coli</i></b>	<b>21 %</b>	<b>9 %</b>
<b><i>Cocci à Gram positif anaérobies</i></b>	<b>51 %</b>	<b>32 %</b>
<b><i>Bacteroides fragilis</i></b>	<b>33 %</b>	<b>18 %</b>

## I. 3. 5. Après la ménopause

La carence œstrogénique post-ménopausique va créer ou accentuer un certain nombre de troubles dans la sphère urogénitale : sécheresse vaginale, prurit, vaginite et cystite à répétition (**Rozenbaum, 2002**).

La flore génitale s'appauvrit à mesure que l'imprégnation hormonale diminue et qu'un état d'atrophie vaginale s'installe en l'absence d'usage d'œstrogènes de substitution locaux. De plus, l'atrophie favorise la survenue de vaginite infectieuse, la protection par la flore normale étant défaillante (**Bergogne-Bérézin, 2007**).

## I. 4. Rôle protecteur de la flore de Doderlein

La flore de Doderlein forme un biofilm protecteur qui s'oppose à toute tentative d'invasion d'un microorganisme infectieux. La protection est complétée par une panoplie sophistiquée de mécanismes (**Bohbot et Lepargneur, 2012**).

### I. 4. 1. Inhibition de la croissance de l'agent pathogène

- **Production d'acides organiques**

Le glycogène est une source carbonée importante dans le milieu vaginal : il est déposé dans l'épithélium vaginal par activation hormonale des œstrogènes, variables au cours du cycle menstruel. La flore de Doderlein, composée de lactobacilles, utilise le glycogène ou le glucose (produit de l'hydrolyse du glycogène par le tissu épithélial ou par les lactobacilles ou par d'autres micro-organismes) pour maintenir un pH vaginal bas voisin de 4 : fermentation en acides organiques dont majoritairement de l'acide lactique (**Boskey et al., 1999**).

Le glycogène peut aussi être dégradé en acide lactique par les cellules de l'épithélium vaginal. Une étude récente a montré que plus de 50 % de l'acide lactique retrouvé dans le milieu vaginal est de la forme isométrique D. Or, les cellules humaines ne peuvent synthétiser que la forme L de l'acide lactique, alors que les bactéries produisent les formes D ou L ou DL en mélange. Ainsi les bactéries représentent la première source d'acide lactique dans le milieu vaginal (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

- **Production de peroxyde d'hydrogène**

Les lactobacilles ne possèdent pas de cytochrome-oxydase pour assurer la phosphorylation oxydative (réduisant  $O_2$  en  $H_2O$ ) mais utilisent des flavoprotéines pour l'oxydation terminale (convertissant  $O_2$  en  $H_2O_2$ ) (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

La production du peroxyde d'Hydrogène a une action délétère directe sur certaines bactéries, essentiellement celles dépourvues du système catalase-peroxydase, ou indirecte par production de composés toxiques par association du  $H_2O_2$  avec des substances contenues dans le mucus vaginal (chlorures, myéloperoxydase..). Cependant, tous les lactobacilles isolés dans le vagin ne sont pas dotés de la même capacité de production de peroxyde d'Hydrogène (**Bohbot, 2007**).

- **Production de bactériocines et substances similaires**

De très nombreux auteurs ont extrait des peptides antimicrobiens de lactobacilles, comme la lactoline, l'acidoline, la lactocidine, la lactobacilline et l'acidophiline de *L. acidophilus*, la lactobrevine de *L. brevis* et la bulgaricane de *L. bulgaricus*. Certains lactobacilles, produisant du peroxyde d'hydrogène, synthétisent une bactériocine qui inhibe la catalase des gonocoques à pH acide, renforçant d'autant l'activité peroxydasique. Ainsi, les lactobacilles en combinant l'action du peroxyde d'hydrogène, l'acidification par l'acide lactique et de l'inhibiteur de la catalase, ont un très fort pouvoir anti-gonocoque (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

- **Production d'une arginine désaminase**

Les lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase, inhiberaient la croissance et la prolifération des bactéries anaérobies pathogènes associées à la vaginose : ils métabolisent l'arginine en citrulline et ammoniacque, et privent ainsi les agents pathogènes de cet acide aminé (**figure 1, Annexe I**). Les polyamines dont la spermine, spermidine, putrescine et la cadaverine sont produites par décarboxylation des acides aminés. L'arginine, par exemple, est transformé en putrescine. Les polyamines sont à l'origine de différents effets négatifs sur l'hôte comme la rupture de l'intégrité de la muqueuse vaginale et l'exfoliation des cellules épithéliales vaginales (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

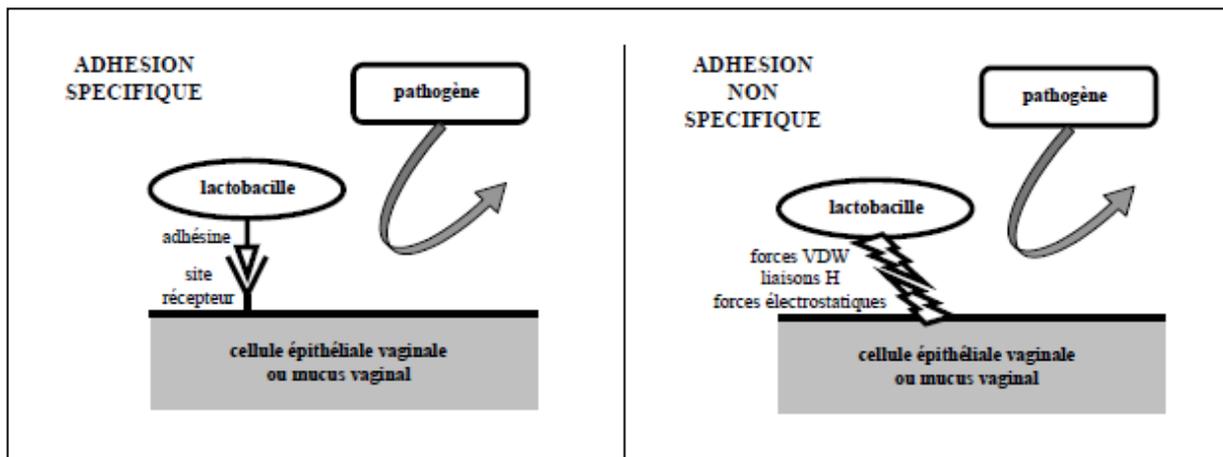
### **I. 4. 2. Inhibition de l'adhésion des agents pathogènes**

- **Adhésion aux cellules épithéliales vaginales**

Les lactobacilles forment un biofilm tapissant la muqueuse vaginale et protègent ainsi le milieu contre l'agression de micro-organismes responsables d'infections diverses en déployant différents mécanismes (**figure 2**) :

- Adhésion spécifique impliquant des structures externes des bactéries (les adhésines) et de l'épithélium (les sites récepteurs).
- Adhésion non spécifique basée sur différentes interactions physico-chimiques (force de Van Der Waals, forces électrostatiques, liaisons hydrogènes...)

Une fois établie, la flore dominante de l'écosystème exerce un effet barrière en formant un biofilm (**Tailliez, 2004**).

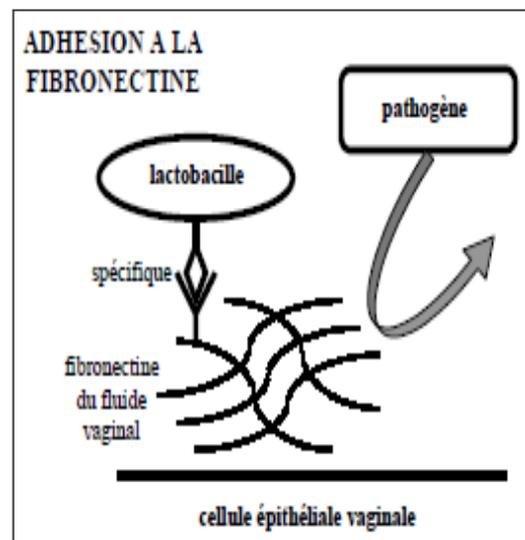


**Figure 2.** Mécanismes de l'adhésion spécifique et non spécifique aux cellules vaginales des lactobacilles (Lepargneur et Rousseau, 2002).

- **Adhésion à la fibronectine humaine**

La fibronectine, molécule à haute masse moléculaire (450 à 500 KDa), est présente sous forme:

- fibrillaire dans la matrice extracellulaire qui recouvre les surfaces des cellules et des muqueuses.
- soluble dans les fluides physiologiques comme par exemple le fluide vaginal.



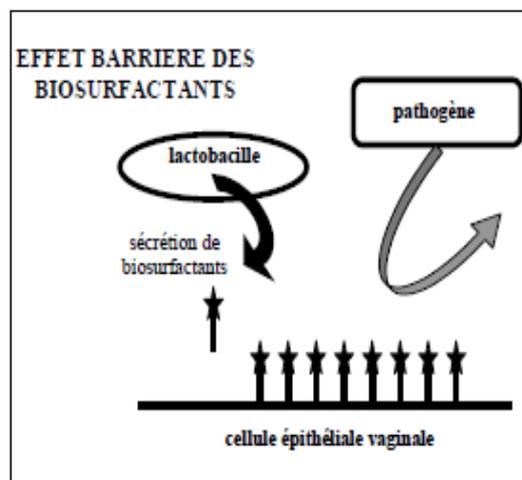
**Figure 3.** Mécanisme d'adhésion des lactobacilles à la fibronectine humaine (Lepargneur et Rousseau, 2002).

La principale propriété de la fibronectine est de moduler les interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules (**figure 3**), via la formation d'un complexe d'adhésion avec les intégrines cellulaires. La fibronectine joue un rôle dans l'adhésion de la flore aux surfaces des muqueuses en formant une structure de base pour l'attachement des microorganismes. Elle favorise aussi l'installation de la flore endogène normale mais aussi l'infection possible par la flore pathogène (Lepargneur et Rousseau, 2002).

## • Production de biosurfactants

Initialement les biosurfactants ont été définis comme des molécules amphiphiles « détergentes » produites par des microorganismes (**figure 4**). Ce sont surtout des glycolipides ou des lipopeptides. Récemment, la production de biosurfactants par des lactobacilles, en particulier la surlactine, a été décrite chez des souches de *L. acidophilus* et *L. Fermentum* (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

La capacité de production de biosurfactants qui détergent les bactéries non autochtones qui se seraient fixées sur l'épithélium vaginal a été attribuée à la flore vaginale normale (**Bohbot et Lepargneur, 2012**)



**Figure 4.** Mécanismes impliqués dans les phénomènes d'adhésion (**Lepargneur et Rousseau,2002**).

### I. 4. 3. Inhibition de l'expansion des agents pathogènes : la co-agrégation

La co-agrégation est une interaction entre deux microorganismes de souches ou d'espèces différentes. Dans le milieu vaginal, ce phénomène peut avoir lieu entre les lactobacilles et les souches potentiellement pathogènes. En se co-agréant, les lactobacilles empêchent l'accès des agents pathogènes aux tissus récepteurs et leur adhésion à l'épithélium (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

La (**figure 2 ,annexeI**) résume les mécanismes d'action des lactobacilles sur le flore pathogène au niveau de la muqueuse vaginale.

## II. Déséquilibre de flore vaginale

La rupture de l'équilibre de la flore vaginale, assurée par la flore de Doderlein, conduit à des infections génitales chez la femme qui se manifestent par diverses pathologies (**Menard et Bretelle, 2008**).

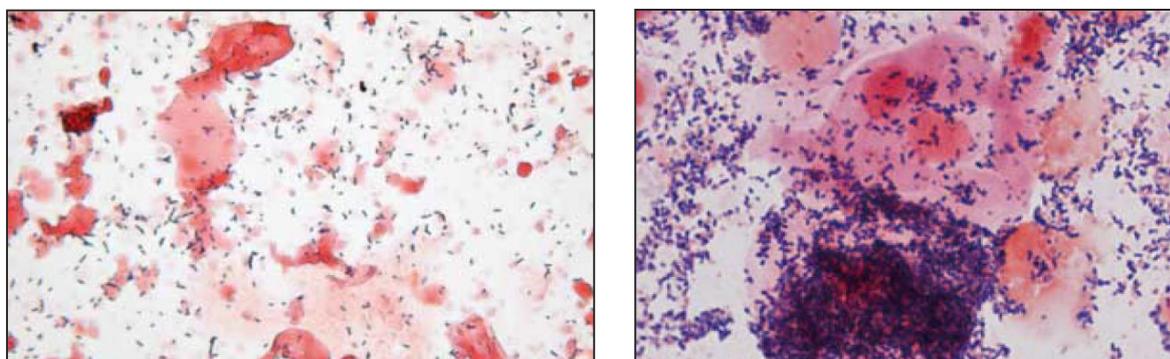
## II. 1. Vulvo-vaginites candidosiques

Il s'agit le plus souvent d'une prolifération de levures à partir d'un portage naturel. Cette prolifération est favorisée par une imprégnation œstrogénique (grossesse oestroprogestative), une antibiothérapie, une corticothérapie ou par l'état général de la patiente (immunodépression, diabète). Les troubles sont liés au caractère allergisant de la candidine, protéine alors libérée en quantité massive. La patiente présente un érythème vulvaire et vaginal. La présence d'un enduit vaginal blanchâtre crémeux inodore est caractéristique (**Le Blanc, 2009**)

## II. 2. Les vaginoses bactériennes

La vaginose bactérienne se définit comme un déséquilibre de la flore vaginale caractérisé par un remplacement des lactobacilles par une flore polymicrobienne comprenant : *Gardenerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Mobiluncus* spp. et d'autres bactéries anaérobies (**figure 5**) (**Menard et Bretelle, 2008**).

La patiente se plaint de prurit vulvaire, de dyspareunies, d'une mal-odeur vaginale accentuée par les rapports ou les règles. L'examen clinique au spéculum montre des leucorrhées grisâtres non purulentes et un pH supérieur à 4,5 (**Le Blanc, 2009**).



**Figure 5.** Lactobacilles d'une flore vaginale normale (à gauche) et cellules épithéliales recouvertes de bactéries (vaginose bactérienne) (à droite)

(**Menard et Bretelle, 2008**).

## II. 3. Vaginite bactérienne ou parasitaire

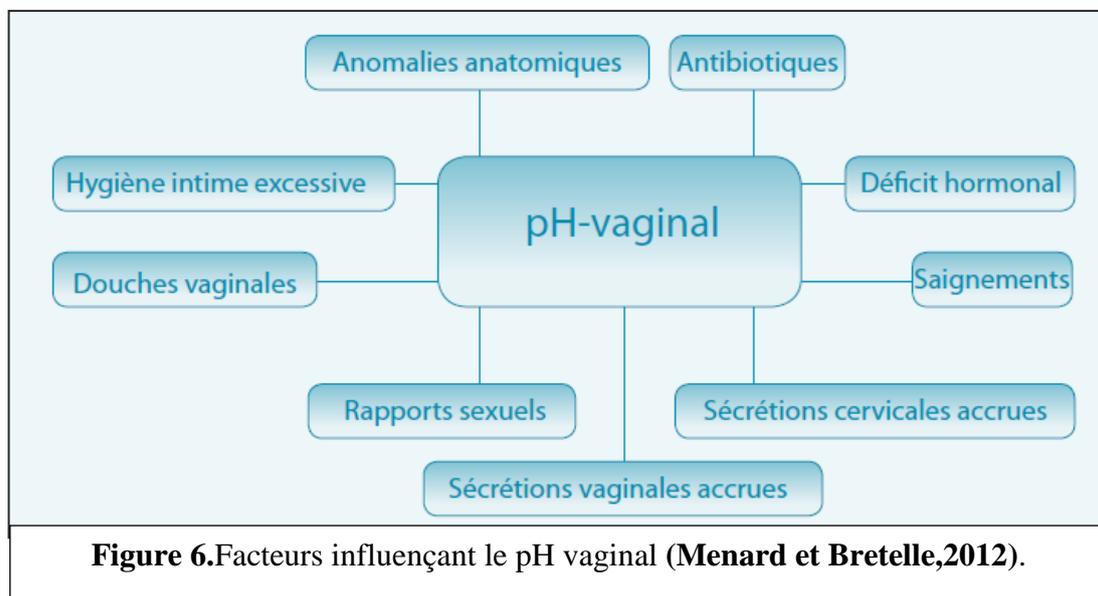
Elle est à l'origine de brûlures vulvo-vaginales, de leucorrhées jaunâtres purulentes et d'un érythème muqueux qui amène la patiente à consulter (**Le Blanc, 2009**).

Cependant, une vaginite peut aussi être liée à la pullulation anormale d'une bactérie habituellement présente dans la flore normale mais en très faible nombre : Cette pullulation

liée à des modifications locales de l'équilibre bactérien s'accompagne de phénomènes inflammatoires qui signent l'infection tel est le cas de l'infection à *Gardenerella vaginalis* (Bergogne-Bérézin, 2007). La figure 3 (Annexe I) montre une infection à *Trichomonas*.

### II. 4. Etiologie des infections vaginales

Les études épidémiologiques ont permis d'isoler certains facteurs de risque associés à la vaginose bactérienne : origine ethnique (africaine plus que caucasienne), existence d'une intoxication tabagique, type de contraception (absence d'utilisation de préservatifs), hygiène vaginale (pratique de toilette vaginale) et activité sexuelle (changement récent de partenaire sexuel, nombre croissant de partenaires sexuels, rapports homosexuels (figure 6).



Il peut aussi s'agir d'une altération endogène de la flore vaginale favorisée par les variations hormonales le cycle menstruel. L'étiologie est pour le moment loin d'être clairement définie même si quelques hypothèses ont été évoquées sur la base des études épidémiologiques (Menard et Bretelle, 2008; Bohbot et Lepargneur, 2012).

La transmission par voie sexuelle d'agents pathogènes tels que *Gardenerella vaginalis* et des mycoplasmes est possible mais non exclusive. Même si certains microorganismes ne sont pas à proprement parler responsables d'infections sexuellement transmissibles (IST), ils peuvent être transmis par voie sexuelle et donc coloniser le tractus génital des partenaires, qui devront être pris en charge (Emile, 2009).

## II. 5. Complication des infections vaginales

Pendant la grossesse, la présence d'une infection vaginale est associée à un risque de complication obstétricale (rupture prématurée des membranes, prématurité, choriomniotite, naissance d'enfant de petit poids) (Menard et Bretelle, 2012). S'il existe un lien statistique entre vaginose bactérienne et complication obstétricale le lien de causalité n'a pas pu être clairement établi (Menard et Bretelle, 2008).

Depuis plusieurs années, la présence d'une vaginose bactérienne est considérée comme facteur de risque de prématurité mais cette association est controversée et peu de travaux ont été consacrés à cette association (Bothuyn-Queste, 2012).

## II. 6. Récurrence des infections vaginales

Des travaux récents ont montré que le phénomène de formation de biofilm, lié à l'adhésion sur la muqueuse vaginale, fait partie d'un stade de colonisation précédant l'infection par certaines bactéries telles que: *Gardenerella vaginalis* (Menard et Bretelle, 2008). Il a été montré que cette bactérie est capable de produire des biofilms vaginaux très souvent en association avec *Atopobium vaginae*. La notion que le biofilm joue un rôle important dans la vaginose explique la fréquence des récurrences dans cette infection (Bergogne-Bérézin, 2007).

## II. 7. Traitement des infections vaginales

Le traitement de la vaginose bactérienne a deux objectifs : Pour une vaginose bactérienne symptomatique il s'agit de corriger les signes fonctionnels par un retour à une flore normale, tandis que celui de la vaginose bactérienne asymptomatique implique la prévention des complications obstétricales (Menard et Bretelle, 2008).

Dans la majorité des cas de manifestations génitales à caractère infectieux, le recours à des traitements anti-infectieux par voie systémique n'est pas très préconisé. Cependant, certaines vaginites nécessitent un traitement antibiotique en fonction des risques de transmission materno-fœtale ou en raison de leur caractère chronique susceptible d'altérer les voies génitales hautes et de compromettre les possibilités de grossesses ultérieures (Bergogne-Bérézin, 2007). Le tableau II (Annexe I) montre le traitement prescrit lors d'une grossesse.

## II. 8. Perspectives thérapeutiques : Utilisation des probiotiques

Une approche de traitement plus « naturel » pourrait être envisagée pour la vaginose et les vaginites banales ou au minimum pour restaurer l'écosystème vaginal après un traitement classique. Les probiotiques sont un de ses nouveaux traitements en essai.

## III. Probiotiques

### III. 1. Définition

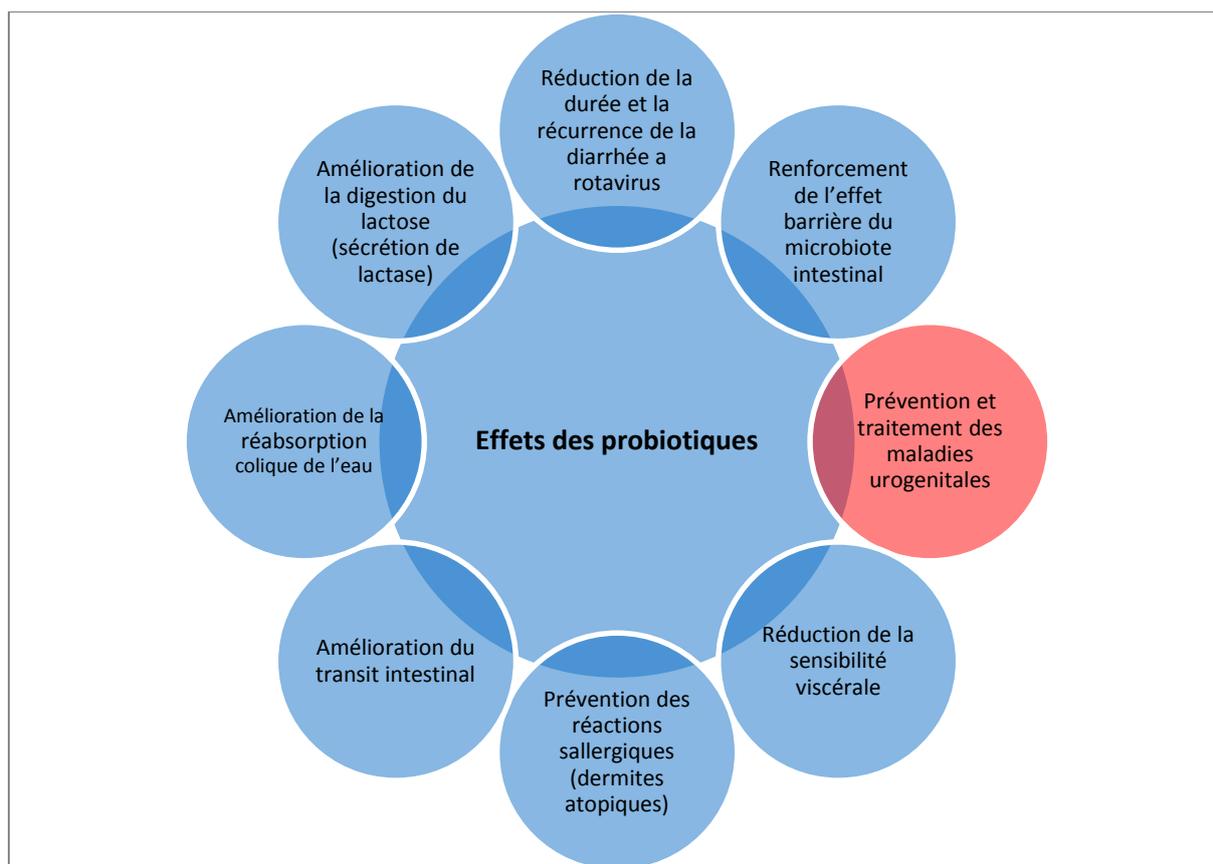
La définition des probiotiques a évolué au cours des années. La définition généralement adoptée a été proposée par l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture "FAO" en 2002 : « le terme probiotique désigne aujourd'hui un microorganisme vivant qui, lorsqu'il est ingéré en quantité adéquate exerce un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**Cahier de nutrition diététique, 2007**).

### III. 2. Caractéristiques

Plusieurs critères ont été proposés pour aider les industriels à rationaliser leur sélection de souches qui auraient les meilleures chances d'avoir des propriétés probiotiques (**Luquet et Corrieu, 2005**). Les souches probiotiques doivent avoir certaines caractéristiques pour d'une part, atteindre leur site d'action, en général l'intestin et, d'autre part agir. Par ailleurs, leur ingestion doit être sans risque pour l'hôte. Ces caractéristiques, résumées dans le (**tableau III,Annexe I**) , sont réparties en trois catégories à savoir les critères de sécurité, fonctionnels et technologiques (**Butel, 2014**).

### III. 3. Effets bénéfiques des probiotiques

Les probiotiques ont été utilisés en premier lieu pour leurs effets bénéfiques sur le microbiote intestinal, leurs effets sont maintenant reconnus comme beaucoup plus large (**figure 7**).Des résultats encourageants ont été obtenus dans la prévention des récurrences de vaginose bactérienne avec des souches de *L. rhamnosus* GR-1 et de *L. reuteri*. Des études ont montré que les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de *Candida albicans* et/ou son adhérence à l'épithélium vaginal (**Faure, 2013**).



**Figure 7.** Fonctions potentielles attribuées aux probiotiques (Marteau et Rambaud, 1996; Dupont, 2001; Faure, 2013).

Parmi les microorganismes les plus utilisés en tant que probiotiques nous avons les lactobacilles.

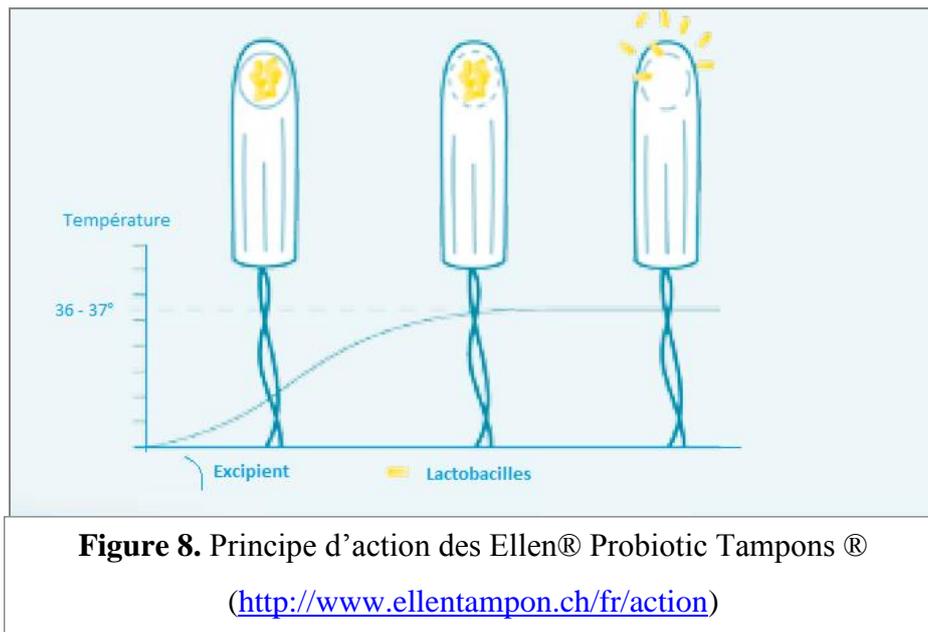
### III. 4. Lactobacilles en tant que probiotiques

Au sein des bactéries lactiques, les lactobacilles forment un ensemble très disparate. Les cellules à coloration de Gram positive, non sporulées et généralement non mobiles, peuvent se présenter sous la forme de bâtonnets longs et fins, ou très courts, ou incurvés ou même ovoïdes. La plupart de lactobacilles se multiplient dans une gamme de températures comprise entre 15°C et 42°C. Certaines souches thermophiles restent viables à 55°C (Tailliez, 2004).

Ces bactéries résistent très bien aux conditions acides et peuvent se développer à des pH proches de 4. Cette particularité de résistance aux environnements acidifiés permet aux lactobacilles de poursuivre leur développement au cours du processus naturel de fermentation lactique (Madigan et Martinko, 2007). Chez les sujets en bonne santé, les lactobacilles sont normalement présents dans la cavité buccale, l'iléon et le colon. Ce sont par ailleurs, les micro-organismes dominants de la flore vaginale (Allaert et Pillon, 2011).

Les produits probiotiques contenant les lactobacilles peuvent être utilisés par voie orale ou vaginale. L'objectif est la colonisation du vagin et la prévention des récurrences, même si peu d'études ont évalué leur efficacité. Les acidifiants (acide ascorbique et acide lactique) sont également utilisés (Menard et Bretelle, 2008).

De nombreux essais ont prouvé l'efficacité des tampons et crèmes à base de probiotiques quant à la restauration d'un écosystème vaginal sain par une utilisation continue durant plusieurs cycles (figure 8).



# *Matériel et méthodes*

## I. Prélèvements vaginaux

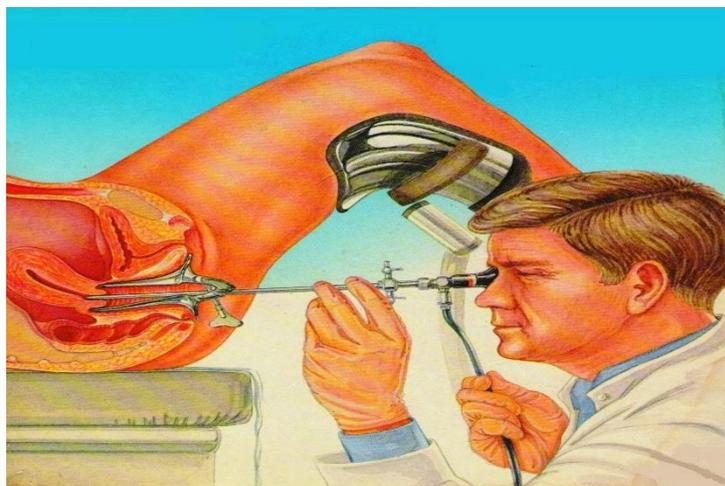
### I. 1 Origine des prélèvements

Cette étude est effectuée sur 10 femmes ayant consulté au service de gynécologie d'un établissement hospitalier privé de la wilaya de Bejaïa entre Janvier et Mars 2016.

Les antécédents des patientes ont été fournis par le gynécologue responsable du service. Le questionnaire (annexe II) comprend des informations basiques (âge, motif de consultation, état gestationnel, état infectieux et prise d'antibiotiques).

### I. 2. Méthode de prélèvement

Le prélèvement vaginal est réalisé par le gynécologue, par mise en place d'un speculum stérile sans nettoyage antiseptique de l'exocol. Un écouvillon est introduit dans l'endocol en effectuant un mouvement rotatoire (**figure 9**). L'écouvillon est ensuite introduit dans 9ml d'une solution de Tryptone -Sel (TS, Sigma-Aldrich, Allemagne) et constitue l'échantillon. Ce dernier est acheminé rapidement au laboratoire. Deux prélèvements sont effectués pour chaque femme.



**Figure 9.** Photographie d'une technique de prélèvement vaginal (**Kamina, 1979**)

## II. Dénombrement des Lactobacilles et de la flore totale

Le dénombrement des lactobacilles et de la flore totale est réalisé par la méthode d'ensemencement en masse. A partir d'un échantillon, une série de dilutions décimales est réalisée allant de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  en utilisant du TS comme diluant. L'ensemencement concerne les dilutions de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  pour les Lactobacilles et de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$  pour la flore totale tel qu'indiqué dans le **tableau II**.

**Tableau II.** Conditions de culture pour le dénombrement de la flore totale et des Lactobacilles.

Flore	Milieu de dénombrement	pH	Température (°C)	Durée d'incubation (h)
<b>Totale</b>	Gélose nutritive (GN; Conda, Espagne)	7	30	24-48
<b>Lactobacilles</b>	Gélose de Man Rogosa et Sharpe (MRS; Conda, Espagne)	5,4	37	48-72

### III. Isolement, purification et identification des souches

#### III. 1. Isolement des Lactobacilles

Pour chaque prélèvement, un enrichissement est réalisé en inoculant 1 ml de l'échantillon dans 5 ml de bouillon MRS (Conda, Espagne) pH 5,4 et en incubant pendant 24-48 h. Des isolements en stries sont effectués sur gélose MRS (pH 5,4) à partir de chaque bouillon MRS positif suivi d'une incubation à 37°C de 24-72 h.

#### III. 2. Isolement des souches pathogènes

Pour chaque prélèvement, un enrichissement est réalisé en inoculant 1 ml de l'échantillon dans 5 ml d'un bouillon spécifique à la bactérie recherchée comme suit :

- Bouillon nutritif (Sigma-Aldrich, Allemagne) pour la recherche d'*E. coli* et de *Proteus*
- Bouillon nutritif à pH 4 pour la recherche de *Candida*
- Bouillon nutritif additionné de 7,5 % (m/v) de NaCl pour la recherche de *S. aureus*
- Bouillon Rothe (Himedia, Inde) pour la recherche d'*Enterococcus*.

Tous les tubes sont incubés à 37°C sauf pour la recherche d'*E. coli* où une incubation à 44°C est effectuée. Des isolements en stries sont effectués sur géloses spécifiques à partir de chaque bouillon positif comme suit :

- Gélose « Eosine Methylene Blue » (EMB; Conda, Espagne) avec incubation à 44°C pour sélectionner les souches d'*E. coli*.
- Gélose Chapman (Liofilchem, Italie) avec incubation à 37°C pour sélectionner les souches de *S. aureus*.

- Gélose Slanetz et Bartley (Biokar, France) avec incubation à 37°C pour sélectionner les souches d'*Enterococcus*
- Gélose VRBG (Crystal Violet Rouge Neutre Bile Glucose; Liofilchem, Italie) avec incubation à 37°C pour sélectionner les souches de *Proteus*.
- Gélose nutritive avec incubation à 37°C pour sélectionner les souches de *Candida*.

### III. 3. Purification et identification phénotypique des souches

La purification consiste à faire des repiquages successifs (gélose ↔ bouillon) jusqu'à l'obtention d'une culture pure de colonies caractéristiques et bien isolées en vérifiant séquentiellement la forme, l'organisation cellulaire, le Gram et la présence ou l'absence d'une catalase.

L'identification des souches est réalisée à l'aide d'une étude morphologique et physiologique: l'identification préliminaire est réalisée en se rapportant à certaines conditions de culture (aspect colonial sur milieu spécifique, T° de croissance) et aux résultats de la coloration de Gram (Gram, forme et organisation cellulaire). Quant à l'étude physiologique, elle consiste à soumettre les souches au test de recherche de la catalase, au test de recherche de la coagulase pour les staphylocoques et culture dans des milieux spécifiques (Schubert, citrate de Simmons et TSI) pour *Escherichia coli*.

Suivant **Guiraud (2003)**, les tests biochimiques d'identification d'*E.coli* sont réalisés comme décrit dans le tableau III et les tests d'identification des autres souches sont effectués que rapporté dans le tableau IV.

**Remarque :** La composition des milieux de culture est donnée en **Annexe III**

**Tableau III.** Tests d'identification d'*E.coli* (Guiraud, 2003)

Test	Description	Lecture
<b>Fermentation des sucres (Glucose, Lactose et saccharose), production de gaz et de H<sub>2</sub>S</b>	Du milieu TSI (Triple Sugar Iron) (Conda, Espagne) est utilisé. Ce milieu est réparti en tubes à essai sous forme semi –inclinée avec un haut culot et une petite pente. Il est ensemencé par piqure profonde du culot au fil droit et par ensemencement en stries de la tranche. Après incubation à 37°C/24 h le milieu est examiné.	Dans le culot l'anaérobiose relative favorise l'utilisation du glucose qui entraîne une acidification et un virage au jaune de l'indicateur. Sur la pente l'aérobiose favorise l'utilisation du Lactose et du saccharose qui entraîne le virage au jaune de l'indicateur. L'apparition de bulles dans le culot traduit la production de gaz, un noircissement dû à la formation de Sulfure de Fer traduit celle de H <sub>2</sub> S.
<b>Utilisation du citrate comme seule source de carbone</b>	Elle est testée par culture sur milieu Citrate de Simmons (Himedia, India) en tubes inclinés. Ce milieu est ensemencé par stries à partir d'un milieu solide et incubé à 37°C/24 h.	L'utilisation du citrate comme seule source de Carbone se traduit par une croissance et une alcalinisation du milieu qui vire du vert au bleu.
<b>Dégradation du lactose avec production de gaz et production d'indole.</b>	Les deux tests sont effectués dans un même milieu, bouillon de Schubert (Conda, Espagne) avec cloche de Durham. Après incubation à 44°C/24 h, l'ajout de quelques gouttes du réactif de Kovacs (Sigma-Aldrich, Allemagne), permet de vérifier la production d'indole.	Les tubes présentant un trouble et du gaz dans la cloche sont considérés positifs pour la fermentation du lactose. La présence d'un halo rouge indique la production d'indole.

**Tableau IV** : Test d'identification des souches pathogènes isolées.

Genre ou espèce	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Proteus</i>	<i>Candida</i>	<i>Enterococcus</i>
<b>Test</b>	Test de la recherche de la coagulase : 0,5 ml du culture en BHI est ajouté à 0,5 ml de plasma humain puis incubé à 37° C/ 18h ( <b>Luquet et Corrieu, 2005</b> ).	Croissance sur milieu VRBL : l'absence de croissance confirme l'appartenance au genre <i>Proteus</i> .	Observation microscopique après coloration au Bleu de Méthylène (X40).	Après croissance sur gélose Slanetz-Bartley : observation microscopique (X100).

## IV. Caractérisation des souches

### IV. 1. Criblage des souches isolées quant à leur pouvoir d'adhésion sur surfaces en polystyrène

Les souches de Lactobacilles et de bactéries pathogènes visées sont criblées quant à leur pouvoir d'adhésion sur surface en polystyrène.

A partir de cultures fraîches de 24 h sur GN pour les souches pathogènes et de 48 à 72 h sur gélose MRS pour les souches de lactobacilles, une colonie est repiquée dans leurs bouillons respectifs (BN et MRS). Les bouillons sont incubés pendant 18 h à 37°C.

#### IV. 1.1. Ensemencement de la microplaque

La formation de biofilms est testée sur des microplaques en polystyrène stériles suivant la méthode d'**O'Toole et Kolter (1998)** telle que décrite par **Ait Ouali et al. (2014)**. Les puits de la microplaque préalablement remplis avec 100 µl de bouillon Trypticse- Soja (TSB; Sigma-Aldrich, Allemagne) sont ensemencés en triple (trois répétitions par souche dans la même microplaque) avec 100 µl d'une suspension bactérienne fraîches de 18 h puis la microplaque est incubée à 37°C/24 h. Des puits contenant 200 µl de TSB stérile sont utilisés comme témoins.

### **IV. 1. 2. Coloration au cristal violet (0,1%)**

Après incubation, les suspensions dans les puits sont aspirées soigneusement puis ces derniers sont rincés avec 200 µl de TS stérile pendant 10 min sous agitation. Les cellules adhérentes sont fixées avec 200 µl d'Ethanol absolu (Biochem-Cheopharma, Québec) à 96% pendant 20 min puis ce dernier est aspiré et les puits sont laissés sécher stérilement.

Par la suite, les cellules fixées sont colorées avec 200 µl d'une solution de cristal violet (Biochem-Chemopharma, Québec) à 0,1% (m/v) pendant 20 min, puis lavées avec 200 µl de TS stérile jusqu'à l'obtention d'une couleur claire du liquide de lavage. Enfin, le colorant fixé aux cellules est solubilisé en ajoutant 200µl d'Ethanol 96%. La quantité de colorant fixé, qui reflète indirectement la quantité de cellules fixées, est estimée par la mesure de l'absorbance à 630 nm.

### **IV. 2. Activité hémolytique**

Pour vérifier l'activité hémolytique des souches de lactobacilles s et pathogènes isolées, leurs cultures fraîches sont déposées en spots à la surface d'une gélose de base Columbia (Liofilchem, Italie) additionnée de 5 % (v/v) de sang humain (fournit par l'organisme d'accueil) puis incubée pendant 24 h à 37°C. Au bout de cette période d'incubation, les géloses sont examinées pour l'apparition ou non de zones hémolytiques autour des spots (Ait Ouali et *al.*, 2014).

### **IV. 3. Résistance aux antibiotiques**

La résistance aux antibiotiques des souches de lactobacilles isolées est vérifiée pour presque toutes les classes d'antibiotiques citant les pénicillines, les aminoglycosides, les tétracyclines, les macrolides, les glycopeptides, les sulfamides, les diaminopyrimidine, les rifamycines et les aminosides (tableau V).

Les suspensions bactériennes sont inondées sur la gélose MRS pré-coulée en boîtes et solidifiée. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 15 min puis les disques imprégnés d'antibiotiques (MAST,UK) sont déposés sur la surface de la gélose. La formation ou non de zones d'inhibition autour des disques est déterminée après 24 h d'incubation à 37°C et leurs diamètres sont mesurés.

Tableau V : Liste des antibiotiques testés

Antibiotique	Charge ( µg)
Gentamycine	10
Bactrim (sulfamel+Trimeth)	23,75+1,25
Ampicilline	10
Tetracycline	30
Rifampicine	5
Vancomycine	30
Erythromycine	15
Streptomycine	10

#### IV. 4. Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est déterminée à l'égard de souches pathogènes, représentatives de chaque espèce identifiée, criblées en se basant sur les résultats des tests d'adhésion et d'hémolyse.

L'activité antibactérienne des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes est mise en évidence par un test d'antagonisme direct : Test des spots de Schillinger et Luke 1989 tel que décrit par **Ait Ouali et al. (2014)**.

Après remplissage des boîtes de Pétri avec de la gélose MRS, solidification et séchage, 5 µl des cultures des Lactobacilles ( $10^8$  UFC/ml) obtenues après 18 h d'incubation dans du bouillon MRS sont déposés en spots à l'aide d'une micropipette. Les boîtes sont ensuite séchées pendant 30 min puis incubées à 37°C/24 h. Au terme de la période d'incubation, les géloses sont recouvertes par 10 ml d'une GN molle en surfusion préalablementensemencée avec 1 ml d'une culture fraîche de la souche cible puis ré-incubées à 37°C.

L'activité antibactérienne est révélée par la présence ou l'absence de zones d'inhibition autour des spots. Le diamètre de ces zones est par la suite mesuré.

### **IV. 5. Résistance à l'acidité et à la bile des souches de Lactobacilles**

#### **IV. 5. 1. Test de la résistance au pH acide**

Des cultures bactériennes de 18 h sont préparées pour les souches de lactobacilles sélectionnées à un taux de  $10^8$  UFC/ml. A partir de ces cultures, 1ml estensemencé dans du bouillon MRS ajusté à deux valeurs de pH 1 et 1,5. Après une incubation de 24 h à 37°C une série de dilutions décimales est effectuée suivie d'un ensemencement en masse dans de la gélose MRS et incubées à 37°C pendant 24-48 h. Après incubation, les cellules viables sont dénombrées pour calculer le pourcentage de survie.

#### **IV. 5. 2. Test de résistance à la bile**

La résistance à la bile est évaluée comme décrit par **Bendali et al. (2011)** avec quelques modifications. Les lactobacilles sélectionnés sont cultivés pendant 24 h à 37°C dans du bouillon MRS. Les cultures bactériennes ( $10^8$  UFC/ml) sont centrifugées (5000 g/10 min) et lavées deux fois avec du PBS (pH 7,2). Du bouillon MRS contenant 0,3%, 0,5% et 1% de bile porcine (Sigma-Aldrich, Allemagne) est inoculé avec le culot obtenu et incubé pendant 4 h à 37°C. La résistance est évaluée en déterminant le nombre de cellules viables par dénombrement dans une gélose MRS.

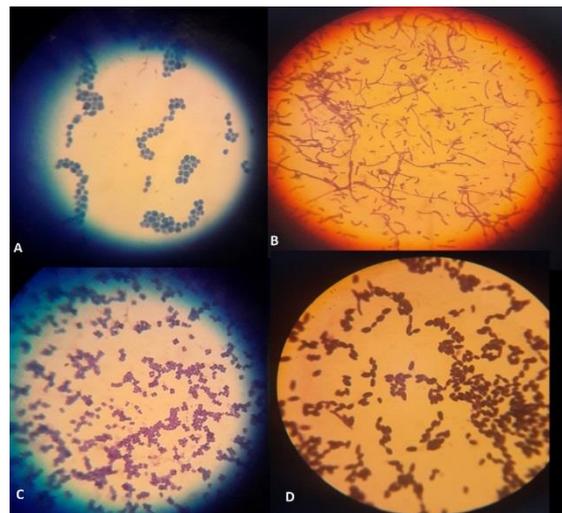
## *Résultats et discussion*

### I. Isolement et identification présumptive des souches lactiques et pathogènes

Deux cents dix (210) isolats ont été obtenus à partir de dix (10) différents prélèvements vaginaux de femmes ayant consulté au service de gynécologie d'un établissement hospitalier privé de la wilaya de Béjaïa. Les souches ont été codées suivant le numéro du prélèvement (1-10) suivi de la première lettre du genre présumé (Lb, E...) et du numéro de la colonie purifiée (1-5).

Sur la base des deux critères spécifiques du groupe des bactéries lactiques, à savoir le Gram positif et l'absence d'une catalase et en se référant aux conditions de culture (milieu MRS pH 4,5) et à la forme cellulaire, quarante-quatre (44) isolats ont été présumés appartenir au genre *Lactobacillus*.

Parmi les isolats obtenus, cent soixante-six (166) souches ont été présumées appartenir à 5 genres et/ou espèces pathogènes, en se basant sur le Gram (+/-), la présence ou l'absence d'une catalase ainsi que l'utilisation de milieux sélectifs avec la prise en considération de certaines conditions de culture telle que la température. Ces 166 isolats ont été répartis en 50 isolats appartenant à *E. coli*, 16 à *Enterococcus* sp. 38 à *Staphylococcus* sp. 3 à *Micrococcus* sp. et 56 à *Candida* sp. . La figure 10 illustre quelques photographies optiques de l'aspect cellulaire des souches isolées.



**Figure 10.** Photographies optiques (grossissement x100) de l'aspect cellulaire de quatre isolats microbiens après coloration de Gram (B, C et D) ou au bleu de méthylène (A) (A et D : *Candida*, B : bacille lactique, C : *Staphylococcus*).

## II. Identification phénotypique des souches pathogènes

Des tests biochimiques ont été utilisés pour identifier les souches pathogènes isolées et ceci se rapportant aux données de la littérature (Delarras, 2007) (Annexe VI).

### II. 1. Souches d'*E.coli* et de *Proteus*

Sur la base des résultats phénotypiques (caractères morphologiques, culturaux et physiologiques et biochimiques) des 53 isolats récupérés du milieu EMB (à 44°C) toutes les souches ont été assignées à l'espèce *E. coli* à l'exception des souches **6E4**, **7E4** et **7E5**.

Toutes les souches présumées appartenir au genre *Proteus* ont poussé sur gélose VRBL ce qui confirme leur non appartenance à ce genre.

### II. 2. Souches de *Staphylococcus*

A partir des résultats phénotypiques des 38 isolats récupérés sur milieu Chapman on peut assigner toutes les souches à l'espèce *Staphylococcus aureus* à l'exception des souches 1S1, 2S2, 2S3, 2S4, 6S3, 7S1 et 7S8 qui pourrait appartenir à l'espèce *Staphylococcus epidermidis*.

### II. 3. Souches de *Micrococcus*

A partir des résultats des tests phénotypiques des trois isolats (2μ1, 2μ2 et 2μ3) récupérés du milieu Chapman les souches ont été assignées à l'espèce *Micrococcus luteus*.

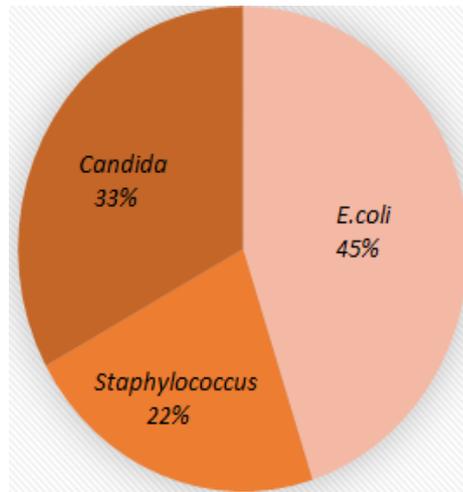
**Remarque :** Les souches supposées appartenir à *Enterococcus* n'ont pas été identifiées de manière poussée dans cette étude.

## III. Profil microbien des flores vaginales en fonction des patientes

### III. 1. Profil de la patiente N°1 : Femme de 21 ans enceinte consultant pour une Bartholinite et sous antibiothérapie mixte.

L'âge de la femme à l'origine du prélèvement et son état gestationnel orientent vers une riche flore de Doderlein (Lactobacilles). Cependant, l'antibiothérapie antérieure (Clamoxyl) ainsi que celle suivie au moment du prélèvement (Ampicilline et Gentamicine) pourrait expliquer l'absence de cette flore naturelle et bénéfique (figure 11).

En effet, les lactobacilles de la flore vaginale sont très sensibles aux antibiotiques souvent prescrits lors d'infections gynécologiques. Ceci entraîne directement le déséquilibre de l'écosystème vaginal dès la mise en œuvre de la moindre antibiothérapie. L'état pathologique de la patiente et l'antibiothérapie accompagnant ces pathologies pourraient expliquer l'abondance de bactérie supposées être minoritaires au sein d'une flore saine.



**Figure 11. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°1**

En effet, la bartholinite est une surinfection d'un kyste du canal de la glande de Bartholin. Les principaux genres responsables sont d'origine vaginale ou digestive : Entérobactéries, Entérocoques, Staphylocoque doré, Streptocoques, et bactéries anaérobies (**Lansac, 2011**). Cette étiologie justifie la composition riche en *E. coli* et en Staphylocoques retrouvée lors de notre travail. De plus, ce cas est en faveur d'une présence fongique. En effet la prolifération des levures à partir d'un portage naturel est favorisée par une antibiothérapie ou un état général affaibli (**Le Blanc, 2009**). Malheureusement pour la flore anaérobie, leur exigence en anaérobiose stricte, ne nous a pas permis de les rechercher.

### **III. 2. Profil de la patiente N°2 : Femme de 42 ans consultant pour une infection de type Exocervicite.**

L'âge de la patiente à l'origine de ce prélèvement la situe dans une tranche de femme plus exposée aux infections. Au cours de la vie génitale de la femme, plusieurs facteurs sont à l'origine de variation de la flore vaginale et d'un risque infectieux accentué (**Bergone-Bérézin, 2007**).

Le motif de consultation, une exocervicite, appuie cette hypothèse. En effet, la cervicite désigne les inflammations du col quelle qu'en soit la cause. L'exocervicite est le cas où la muqueuse de l'exocol participe à l'inflammation et souvent seule en cause: infection à *C. albicans*, *Chlamydia* ou *Trichomonas* (Mergui et al., 1995).

Ce cas pathologique pourrait être la conséquence d'une absence de Lactobacilles (flore protectrice), ce qui a permis une prolifération accrue des Staphylocoques blancs venant d'un portage sain (figure 12). La modification du pH du tractus vaginal due à l'exocervicite en est probablement le facteur majeur.

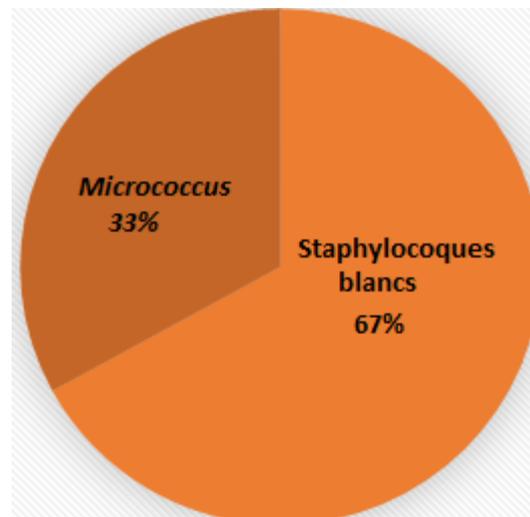
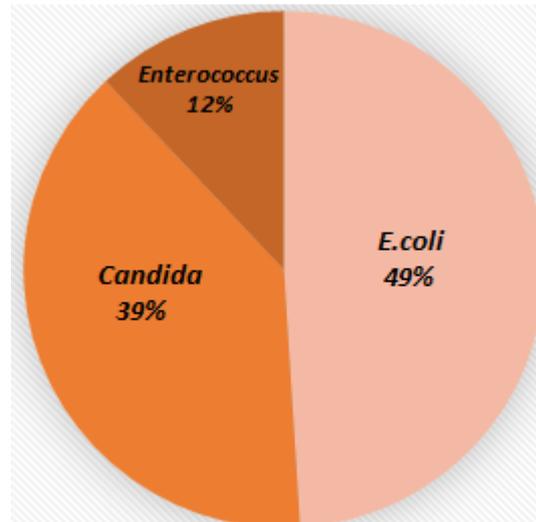


Figure 12. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°2

### III. 3. Profil de la patiente N°3 : Femme de 25 ans suivie pour stérilité et consultant pour une infection à *Chlamydia*

En se référant au questionnaire, la patiente serait atteinte d'une infection à *Chlamydia* (confirmation par analyse sérologique) et consulterait pour une prise en charge de stérilité par cœlioscopie. Beaucoup d'ouvrages relient l'infection à *Chlamydia* à la stérilité. En effet, l'infection des cellules de l'endocol par *Chlamydia trachomatis* peut atteindre la muqueuse des trompes grâce à un pouvoir invasif et altérer définitivement la fertilité des femmes (Casin, 1999). La composition de la flore vaginale (figure 13) dans ce cas (*E. coli*, 49%, levures du genre *Candida*, 39% et Entérocoques, 12%) en plus de la présence de *Chlamydia trachomatis* (non recherchée dans notre étude) nous guide vers une co-infection, où une association née entre les bactéries de la flore vaginale et une bactérie impliquée dans une infection sexuellement transmissible (IST).

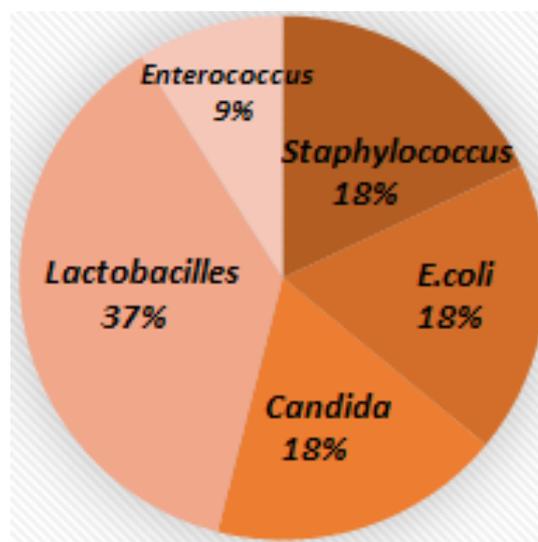


**Figure 13. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°3**

La constitution de la flore en plus de l'absence de Lactobacille désigne un état de vaginose. La vaginose joue un rôle favorisant l'acquisition d'IST comme la Chlamydieuse par diminution de la flore Lactobacillaire (Bohbot et Lepargneur,2012).

### **III. 4. Profil de la patiente N°4 : Femme de 31 ans consultant pour un fibrome utérin**

La flore vaginale de cette patiente (figure 14) est majoritairement constituée de Lactobacilles (37%) évaluée à  $2.10^7$  UFC/ml. A côté desquels on retrouve une flore d'origine probablement digestive : *E. coli* (18%), staphylocoques (18%), levures du genre *Candida* (18%) et Entérocoques (9%).



**Figure 14. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°4**

Nous sommes face à une flore vaginale qualifiée de « normale » par de nombreux auteurs. En effet, on peut noter au sein de la flore vaginale normale la présence de *S. aureus*, d'*E.coli*, et d'autres Entérobactéries en proportions inférieures (**Bergone-Bérézin, 2007**). La patiente consultait pour un fibrome utérin. Ce dernier appelé aussi « léiomyome » est une tumeur musculaire bénigne localisée dans la paroi utérine (**Wainsten, 2009**). Les œstrogènes sont considérés comme le principal agent induisant la croissance des fibromes (**Fernandez, 2002**). Il s'agit donc d'une pathologie à caractère non infectieux et relevant d'un déséquilibre hormonal à tendance hyperœstrogénique.

Le glycogène, déposé dans l'épithélium par activation des œstrogènes, est une source carbonée importante dans le milieu vaginal notamment pour les Lactobacilles qui l'utilisent dans le processus fermentaire (**Lepargneur et Rousseau, 2002**). Dans ce cas, le caractère hyperœstrogénique du fibrome est en faveur de la présentation d'une flore vaginale normale.

### **III. 5. Profil de la patiente N°5 : Femme de 25 ans souffrant de Dysménorrhées**

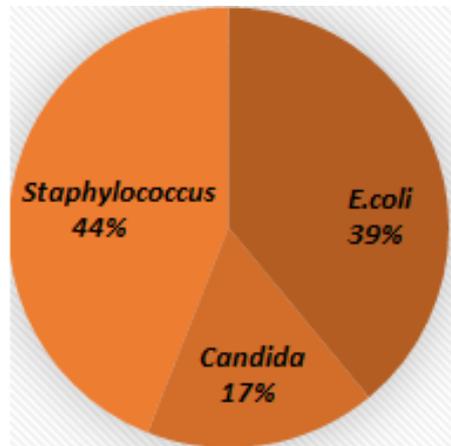
La flore vaginale de cette patiente est constituée de 45% de Lactobacilles, de 33 % de levures du genre *Candida* et de 22% d'Entérocoques. La dysménorrhée dont souffre la patiente est une physiopathologie mal connue à laquelle on attribue différentes causes : flux sanguin utérin faible, adénomyoses, malformations utérines, ainsi qu'aux séquelles d'infections vaginales (**Fignon et al., 1995**).

Bien que les lactobacilles soient majoritaires, le taux élevé de levures oriente vers une cause infectieuse de la dysménorrhée et pourrait prédire une récurrence d'infection à *Candida*.

### **III. 6. Profil de la patiente N°6 : Femme de 31 ans ayant été sous antibiothérapie avant prélèvement et consultant pour une infection cervico-vaginale**

Le profil microbien de cette patiente (figure 15) est dominé par des Staphylocoques (44%), en plus de l'espèce *E. coli* (39%) et de levures du genre *Candida* (17%). Cette flore a été estimée à  $3,3.10^4$  UFC/ml.

Il s'agit d'un cas de déséquilibre de la flore normale par pullulation de bactéries habituellement minoritaires dans la flore vaginale qui engendre la disparition des lactobacilles. La patiente consulte pour une infection cervico-vaginale certainement due aux Staphylocoques ou à *E. coli*.



**Figure 15. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°6**

L'antibiothérapie antécédente au prélèvement (Ciprolon pendant 10 jours) pourrait être l'étiologie de ce déséquilibre. Cependant, les Quinolones semblent être des antibiotiques peu actifs sur la flore de Doderlein notamment les Lactobacilles producteurs de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

La cause de la pullulation des microorganismes minoritaires, certainement à l'origine de l'infection, pourrait être les pratiques de toilettes fréquentes ou inadéquates et qui déséquilibrent le pH vaginal (**Menard et Bretelle, 2008**).

### **III. 7. Profil de la patiente N°7 : Femme de 31 ans portant un stérilet et consultant pour une infection vaginale**

La flore vaginale de cette patiente (figure 16) est exempte de Lactobacilles et est constituée d'une population microbienne évaluée à  $6.10^3$  UFC/ml avec 45% de Staphylocoques, 33% d'*E.coli* et 22,22% de levures du genre *Candida*. Il s'agit d'un cas de remplacement de la flore vaginale normale par des genres de portage minoritaire en temps normal.

La patiente de 31 ans consulte pour une infection vaginale. Le port du stérilet, dispositif intra utérin (DIU) de contraception, oriente vers une piste de contamination exogène. Le DIU peut avoir été posé alors qu'il existait une infection méconnue.

Ce mécanisme pourrait expliquer le fait que le risque infectieux lié aux DIU soit cantonné aux premières semaines suivant sa pose (Serfaty, 2011).

Chez les patientes utilisatrices de DIU, une très nette augmentation du pH vaginal est constatée, en corrélation avec un pourcentage élevé de vaginose. Le stérilet multiplie le cas de vaginose par 2,5 (Lepargneur et Rousseau, 2002).

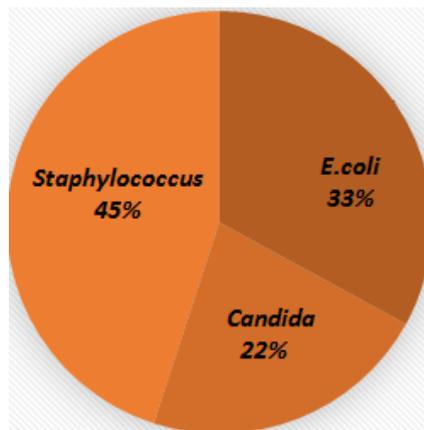


Figure 16. Répartition de la flore vaginale de la patiente N°7

### III. 8. Profil de la patiente N°8 : Femme de 33 ans consultant pour une infection cervicale

Parmi tous les microorganismes recherchés, seul *C. albicans* a pu être isolé et semble être l'agent causal de l'infection. On peut conclure à une candidose vulvo-vaginale.

La candidose vulvo-vaginale est l'une des infections les plus fréquentes en consultation gynécologique. Elle affecte environ 75% des femmes à un moment de leur vie génitale, de plus 5% des femmes souffrent de candidoses vulvo-vaginales récidivantes (Benchellal et al., 2011). Il s'agit le plus souvent d'une prolifération de levures à partir d'un portage naturel (chez 10 à 20% des femmes présentant *Candida*) (Le Blanc, 2009).

#### Remarque :

Les patientes N° 9 et N° 10 (de 30 ans), ayant un profil de femmes saines, n'ont fait objet que de l'isolement de souches de lactobacilles.

## IV. Caractérisation des souches isolées

### IV. 1. Capacité d'adhésion et de formation de biofilms

Le criblage des souches de lactobacilles et pathogènes obtenues à partir des 10 prélèvements vaginaux quant à leur pouvoir d'adhésion (formation de biofilm) a été effectué sur des microplaques en polystyrène. Les biofilms sont actuellement définis comme des communautés microbiennes associées aux surfaces et enrobées par une matrice extracellulaire d'origine microbienne (**Lebeaux et al., 2014**). Ils sont généralement étudiés dans un système statique en microplaque de 96 puits. Ce système très populaire permet la formation d'un biofilm à l'interface solide-liquide et le criblage à haut débit (**Tremblay et al., 2014**).

#### IV. 1. 1. Capacité d'adhésion des souches de lactobacilles

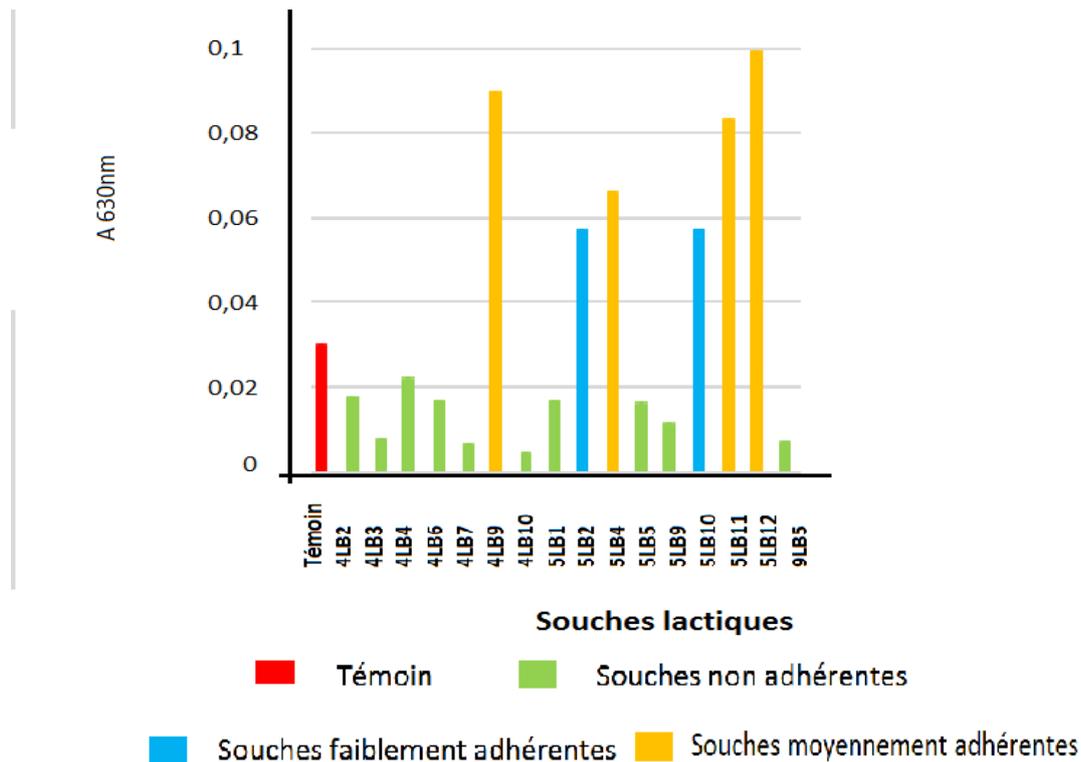
Les mesures d'absorbances (A) à 630 nm des solutions de cristal violet, correspondant aux cellules adhérentes, des 44 souches de lactobacilles ont donné des valeurs comprises entre 0 et 0,100. Ces différences dans les valeurs d'absorbance indiquent une différence dans la capacité d'adhésion des souches étudiées (figure 17).

Selon la classification de **Mathur et al. (2006)**, les souches de lactobacilles sont classées suivant leurs absorbances correspondant indirectement aux taux de cellules adhérentes (tableau VI).

**Tableau VI : Classification des souches de lactobacilles selon Mathur et al.(2006).**

<b>A&lt;0,030 (valeur du témoin) souches non adhérentes</b>	<b>0,030≤A&lt;0,060 souches faiblement adhérentes</b>	<b>0,060≤A&lt;0,120 souches moyennement adhérentes</b>
4LB1,4LB5,4LB8,4LB11 4LB12,4LB13,4LB14,4LB15 ,4LB15,4LB16,5LB3, 5LB6,5LB7,5LB8,5LB13, 5LB14,5LB15,5LB16,9LB1, 9LB2,9LB3,9LB4,9LB6, 9LB7,9LB8,10LB1,10LB2, 10LB3,10LB4,4LB2,4LB3 4LB4,4LB6,4LB7,4LB10, 5LB1,5LB5,5LB9 et 9LB5.	5LB2 et 5LB10	4LB9, 5LB4, 5LB11 et 5LB12.

La capacité de production de biofilms peut être considérée comme une propriété très importante car elle pourrait conduire à la formation d'une barrière aux agents pathogènes au niveau de la muqueuse vaginale (**Martin et al., 2008**). Cependant, selon une étude utilisant des cellules A431, a montré que seule une faible proportion des souches de lactobacilles vaginaux testées était capable d'adhérer, en dépit des conditions du test mimant le milieu vaginal (**Strus et al., 2005**).



**Figure 17. Résultats du criblage des souches de lactobacilles quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène**

### IV. 1. 2. Capacité d'adhésion des souches pathogènes

Les souches pathogènes testées appartiennent aux espèces et genres: *E. coli*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Candida*. Les mesures d'absorbances à 630 nm des solutions de cristal violet correspondant aux cellules adhérentes de ces souches révèlent une grande disparité dans leur capacité d'adhésion. Selon **Roux et Chigo (2006)**, la majorité des souches bactériennes étudiées en laboratoire forme des biofilms.

- **Souches d'*E.coli***

La mesure des absorbances a donné des valeurs comprises entre 0 et 0,265 (figure 18) et les souches ont été classées selon **Mathur et al. (2006)** (Tableau VII)

**Tableau VII : Classification des souches d'*E.coli* selon Mathur et al.(2006).**

<b>A&lt;0,070 (valeur du témoin) souches non adhérentes</b>	<b>0,070 ≤A &lt;0,140 souches faiblement adhérentes</b>	<b>0,140 ≤A&lt; 0,280 souches moyennement adhérentes</b>
7E6, 1E5, 1E8, 1E9, 1E14, 1E16, 3E2, 3E3, 4E1, 4E4, 3E11, 4E7, 4E8, 1E1, 1E2,1E3, 1E4, 1E5, 1E7, 1E10,1E11, 1E12, 1E13, 1E15, 3E1, 3E5, 3E6, 3E7, 3E8, 3E9, 3E10, 3E12, 3E13, 4E2, 4E3, 4E5, 4E6, 6E1, 6E2 et 7E1.	3E4, 3E14, 3E15, 3E16, 6E3, 6E7, 7E3, 7E4 et 7E5.	6E4, 6E5, 6E6 et 7E2

Selon une étude menée sur la souche *E. coli* K12, il a été montré que cette souche utilise diverses structures de surface comme le Fimbriae de type 1, le flagelle et l'antigène 43 pour le phénomène d'adhésion (**Schembri et al., 2003**).

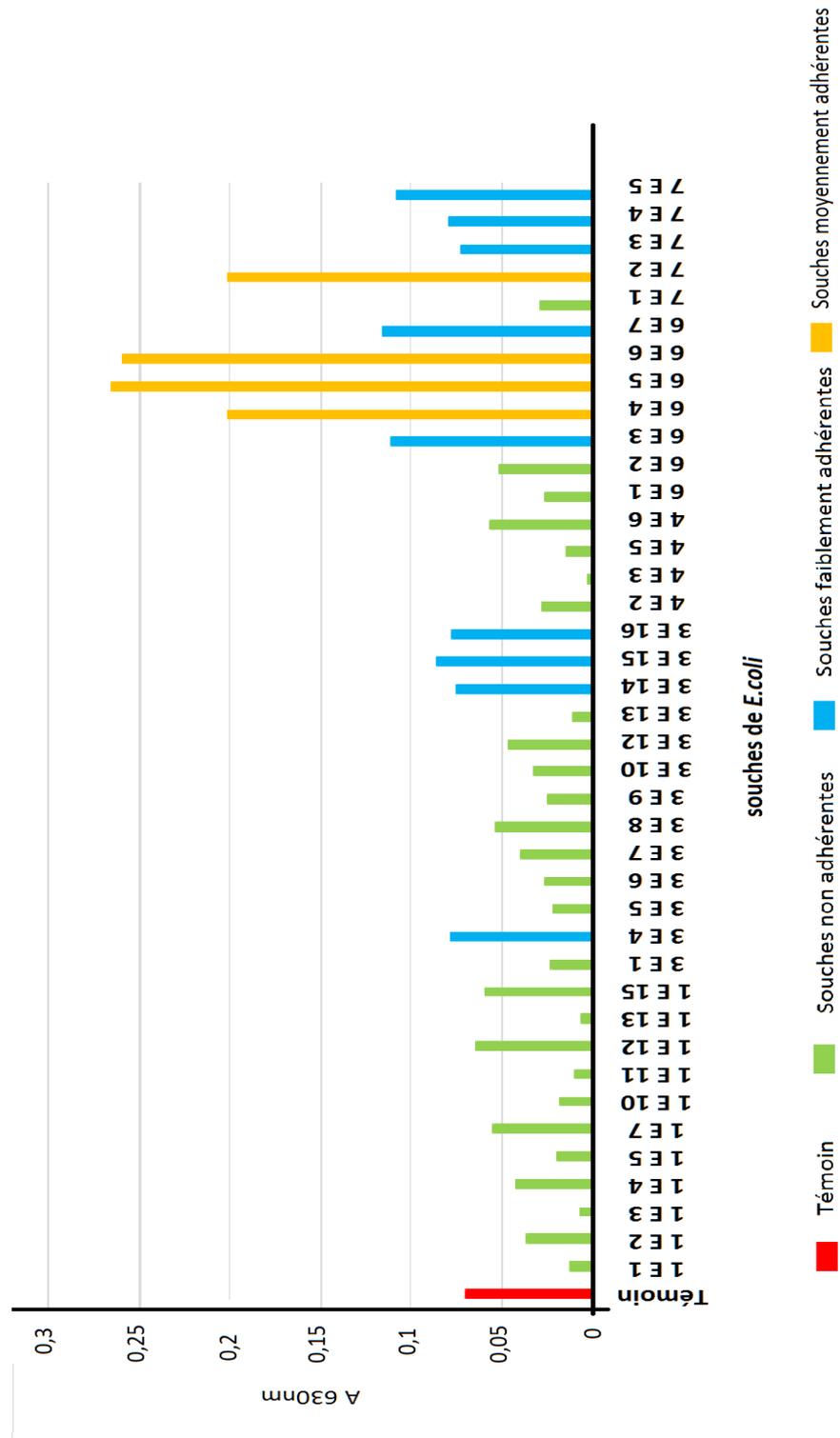


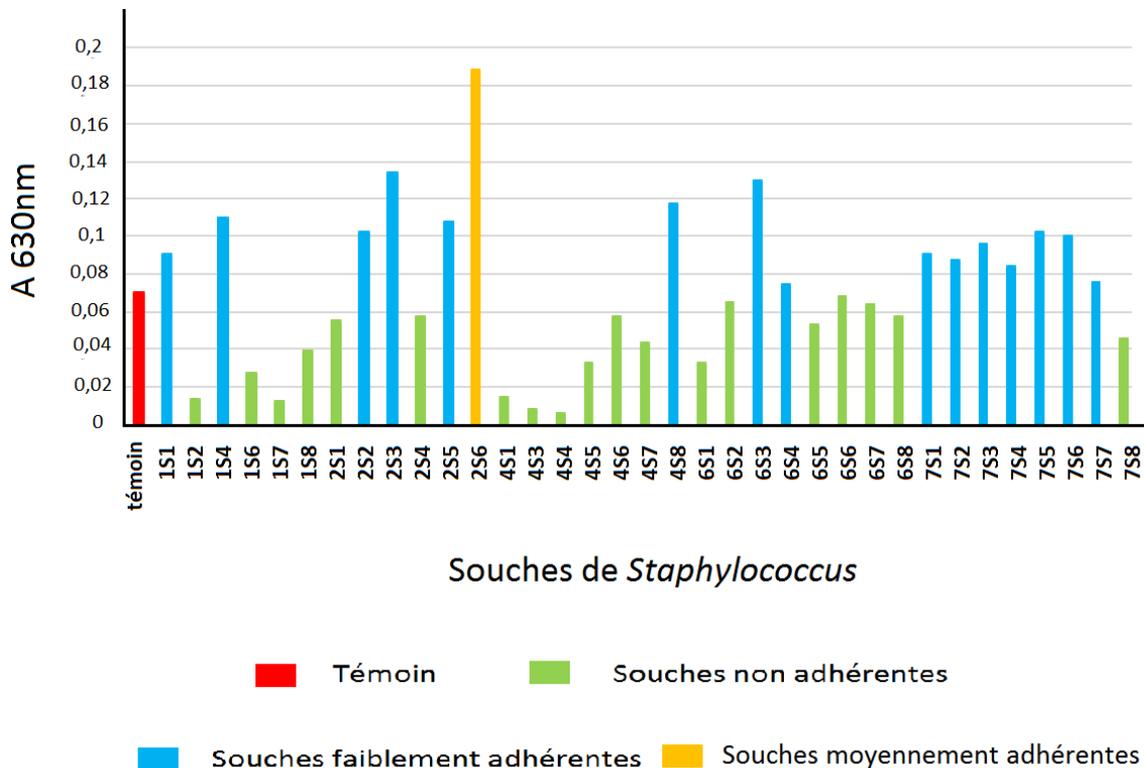
Figure 18. Résultats du criblage des souches d'*E.coli* quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène.

- **Souches de *Staphylococcus***

La mesure des absorbances a donné des valeurs comprises entre 0 et 0,190 (figure 19) et les souches ont été classées selon **Mathur et al. (2006)** (Tableau VIII)

**Tableau VIII : Classification des souches de *Staphylococcus* selon Mathur et al.(2006).**

<b>A&lt;0,07 (Valeur du témoin)</b> <b>souches non adhérentes</b>	<b>0,070 ≤A &lt;0,140 Souches</b> <b>faiblement adhérentes:</b>	<b>0,140 ≤A&lt; 0,280 Souches</b> <b>moyennement adhérentes.</b>
1S2, 1S6,1S7, 1S8, 2S1, 2S4, 4S1, 4S3, 4S4, 4S5, 4S6, 4S7, 6S1, 6S2, 6S5, 6S6, 6S7, 6S8, 7S8, 1S3, 1S5 et 4S2.	1S1, 1S4, 2S2, 2S3, 2S5, 4S8, 6S3, 6S4, 7S1, 7S2, 7S3, 7S4, 7S5, 7S6 et 7S7.	2S6



**Figure 19. Résultats du criblage des souches de *Staphylococcus* quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène**

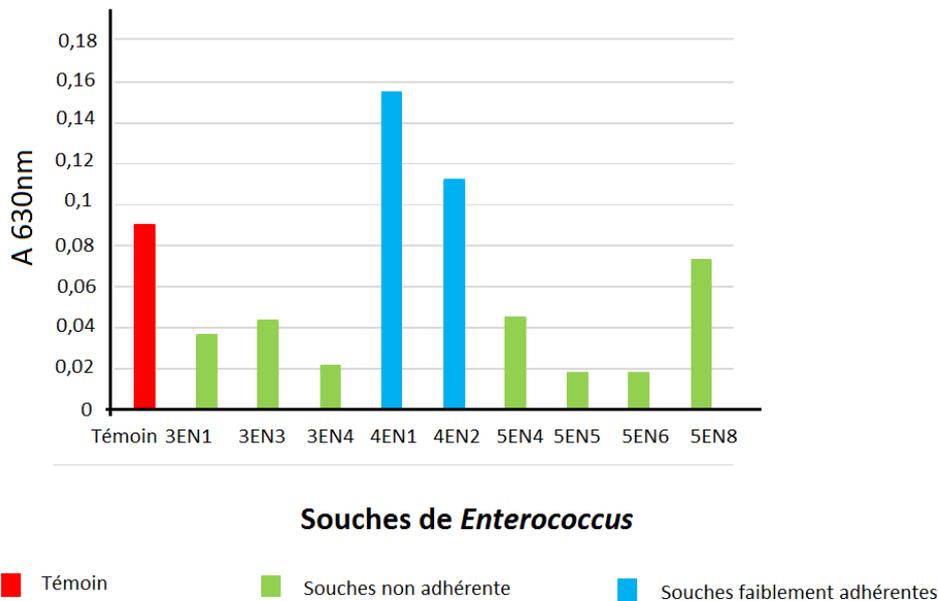
- **Souches d'*Enterococcus***

La mesure des absorbances a donné des valeurs comprises entre 0 et 0,155 (figure 20) et les souches ont été classées selon **Mathur et al. (2006) (Tableau IX)**.

**Tableau IX : Classification des souches d'*Enterococcus* selon Mathur et al.(2006).**

A<0,09 (Valeur du témoin) Souches non adhérentes	0,090 ≤A <0,180 Souches faiblement adhérentes :
3En1, 3En3, 3En4, 5En4, 5En5, 5En6, 5En8, 3En2, 4En3, 4En4, 5En1, 5En2, 5En3 et 5En7.	4En1 et 4En2.

Pour devenir pathogènes, les Entérocoques ont besoin d'exprimer des caractéristiques de virulence associées à l'adhésion. La substance d'agrégation (SA) est une glycoprotéine codée par un gène plasmidique régulé par des phéromones chez le genre *Enterococcus*. Ces dernières favorisent la liaison à des récepteurs de la surface des eucaryotes et jouent un rôle essentiel dans la colonisation de l'hôte. La gélatinase des Entérocoques contribue également au processus de formation de biofilm ce qui peut accroître leur capacité à coloniser les tissus et à persister dans les sites d'infection (**Aguilar-Galvez et al., 2011**).



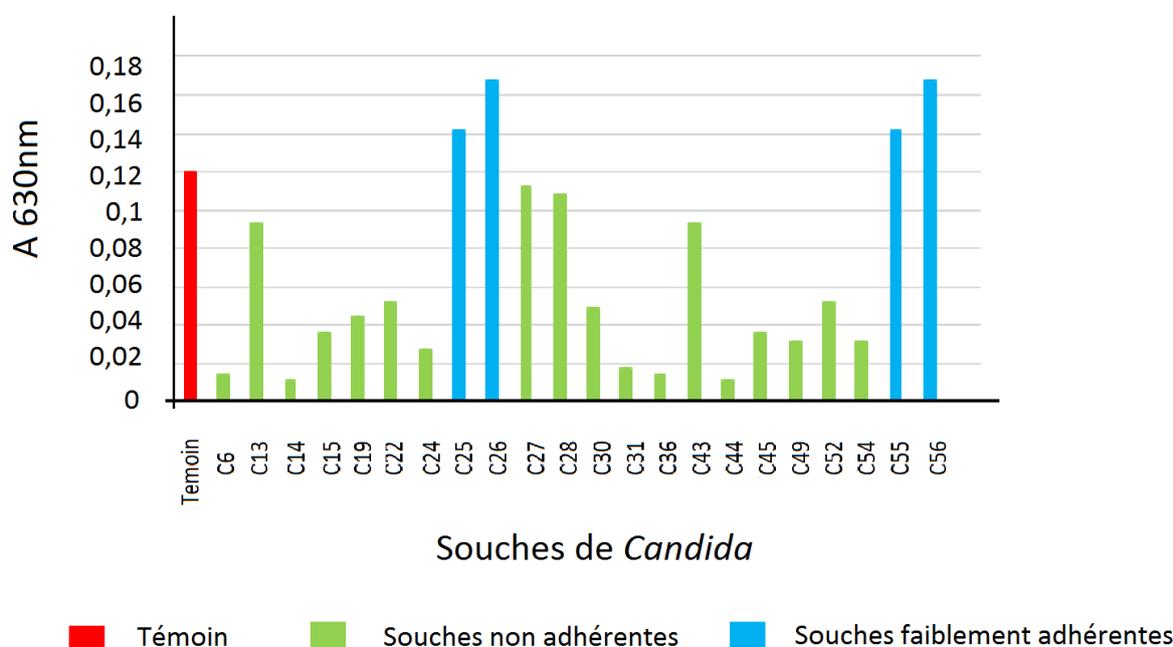
**Figure 20. Résultats du criblage des souches d'*Enterococcus* quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène**

- **Souches de *Candida***

La mesure des absorbances a donné des valeurs comprises entre 0 et 0,270 (figure 21) et les souches ont été classées selon **Mathur et al. (2006)**(Tableau X).

**Tableau X : Classification des souches de *Candida* selon Mathur et al.(2006).**

<b>A&lt;0,120 (valeur du témoin) Souches non adhérentes</b>	<b>0,120≤ A &lt;0,240 Souches faiblement adhérentes</b>
C1,C2,C3,C4,C5,C6,C7,C8,C9,C10,C11,C12,C13,C14, C15,C16,C17,C18,C19,C20,C21,C22,C23,C24,C25,,C28, C29,30,C31,C32,C33,C34,C35,C36,C37,C38,C39,C40, C41,C42,C43,C44,C45,C46,C47,C48,C49,C50,C51,C52, C53 et C54.	C26, C27, C55 et C56.



**Figure 21. Résultat du criblage des souches de *Candida* quant à leur capacité d'adhésion sur microplaque en polystyrène**

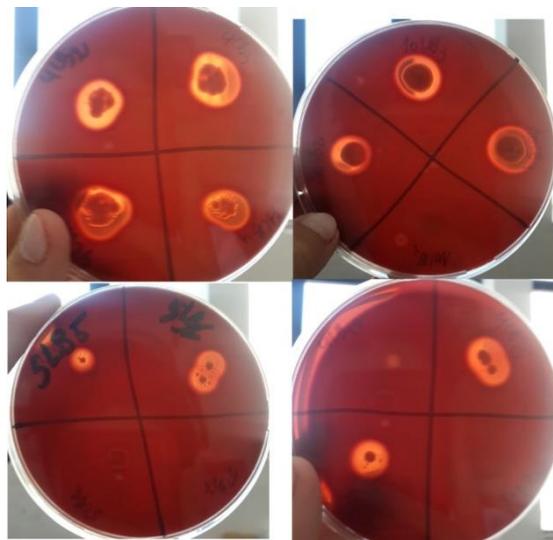
*Candida albicans* est la levure le plus fréquemment associée avec la formation de biofilm. Une des propriétés du biofilm à *Candida* est la résistance aux antifongiques qui rend le traitement des infections liées à ce microorganisme assez laborieux. De ce fait, les cellules de la levure sous forme biofilm sont environ 100 fois plus résistantes au Fluconazole et de 20 à 30 fois plus résistantes à l'Amphotéricine B comparativement aux cellules planctoniques (**Ross, 2010**).

### V. Activité hémolytique des souches de lactobacilles et pathogènes

L'activité hémolytique sur gélose au sang des souches de lactobacilles et pathogènes est montrée dans la figure 22. Le type ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) d'hémolyse est attribué selon **Delarras (2007)**.

#### V. 1. Souches de lactobacilles

Sur les 44 souches de lactobacilles testées, 11 souches (25%) n'ont révélé aucune activité hémolytique. Cependant, pour les 33 autres souches (75%), de larges auréoles claires ont été observées autour des spots ce qui indique une  $\beta$  hémolyse.



**Figure 22. Activité hémolytique des souches de lactobacilles**

#### V. 2. Souches pathogènes

##### V. 2. 1. Souches d'*Enterococcus*

Parmi les souches testées, 50% des souches se sont avérées être non hémolytiques. Pour les souches restantes, il a été observé une activité hémolytique de type  $\alpha$  (zones vertes) pour 31% des souches et une activité hémolytique de type  $\beta$  pour 19% des souches (zones claires).

##### V. 2. 2. Souches d'*E.coli*

Sur les 50 souches testées, 38 souches (76%) n'ont révélé aucune activité hémolytique. Par contre, 8 souches (16%) ont montré un halo avec verdissement (hémolyse incomplète de

type  $\alpha$ ) et les 4 souches restantes (8%) ont montré un halo clair (hémolyse complète de type  $\beta$ ).

### V. 2. 3. Souches de *Staphylococcus*

Aucune activité hémolytique n'a été observée pour 18 (47%) des souches de *Staphylococcus*. Par contre, les 20 souches restantes (53%) ont révélé une activité hémolytique de type  $\beta$  par l'apparition d'un halo clair autour des spots de culture.

### V. 2. 4. Souches de *Candida*

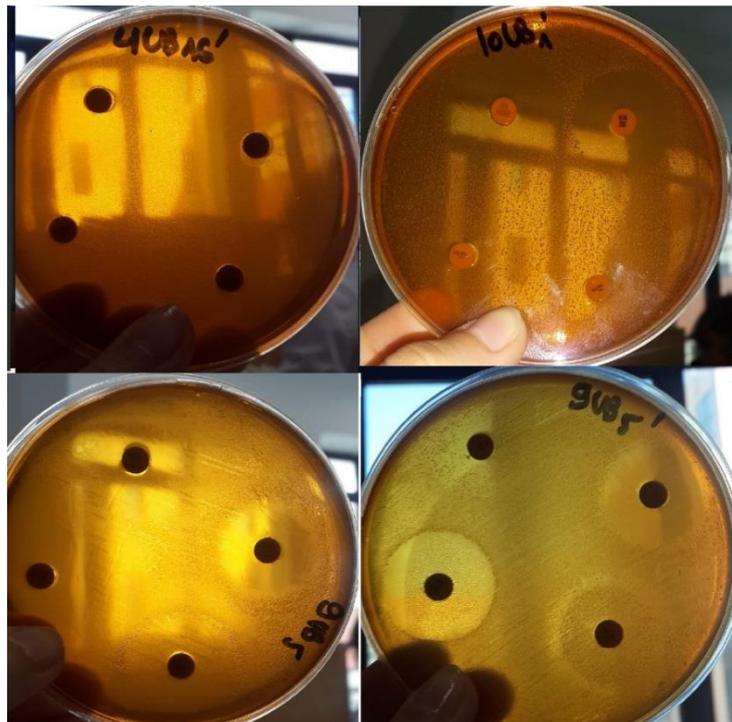
Le test d'hémolyse a permis de distinguer parmi les 56 souches de *Candida* testées, 39 souches (70%) n'ayant aucun pouvoir hémolytique ( $\gamma$  hémolytiques), 16 souches (28%) révélant une activité  $\alpha$  hémolytique (zones vertes) et une seule souche (2%) avec une activité  $\beta$  hémolytique (auréoles claires).

## VI. Résistance des souches de lactobacilles aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques a été testée pour sept souches de lactobacilles criblées sur la base de deux critères : Absence d'hémolyse et activité antimicrobienne à l'égard au moins une des souches pathogènes testées.

La résistance a été évaluée par la méthode de diffusion en disques pour un certain nombre d'antibiotiques de différentes familles communément utilisés en antibiothérapie (Annexe V). Sur les sept souches testées, seules deux se sont avérées être sensibles à la Gentamycine. Une étude menée sur des lactobacilles, isolés à partir de 50 prélèvements vaginaux de femmes saines, a montré que les souches étaient très résistantes à la Gentamycine (Martin et al., 2008).

Toutes les souches ont montré une grande sensibilité quant à la Streptomycine et à la Vancomycine. Cependant, les souches testées ont montré une résistance à l'Ampicilline, Rifampicine, Tétracycline et l'Erythromycine, quoiqu'en règle générale, les lactobacilles sont sensibles aux antibiotiques inhibant la synthèse protéique tels que la Tétracycline et l'érythromycine ainsi que ceux inhibant la synthèse de la paroi tel que l'ampicilline (D'Aimmo et al., 2005). Des exemples de résultats sont illustrés sur la figure 23.



**Figure 23. Sensibilité aux antibiotiques de quelques souches de lactobacilles vaginaux**

L'antibio-résistance à l'égard de Bactrim (mélange de Triméthoprime et de Sulfaméthoxazole) est partagée avec 3 souches résistantes et 4 souches sensibles.

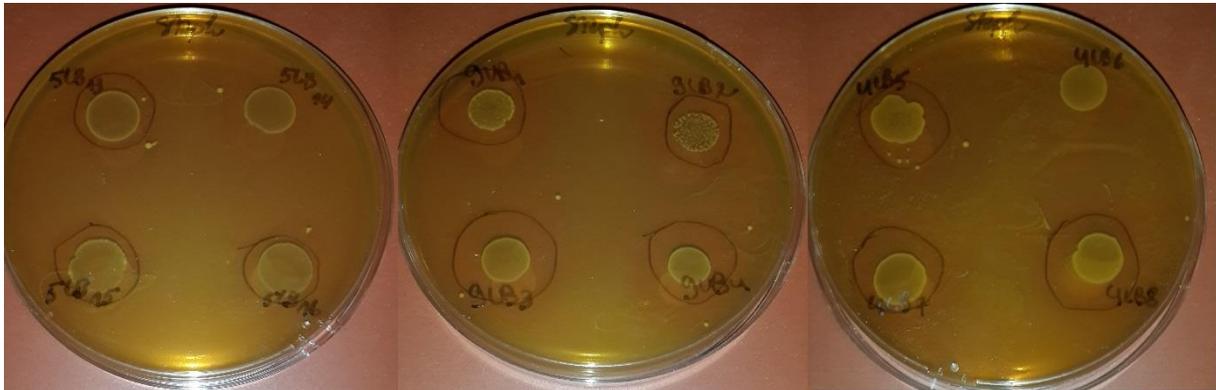
Ces résultats démontrent que le phénomène d'antibio-résistance est espèce-dépendante et la pression de sélection de souches multi-résistantes par l'usage fréquent d'antibiotiques génèrent plusieurs mutants à partir de souches naturellement sensibles. La résistance des souches de lactobacilles est très recherchée en thérapie associant probiotiques et antibiotiques. En effet, si les lactobacilles résistent à l'antibiothérapie, ils peuvent être associés à une antibiothérapie pour éviter la perturbation de la flore de Doderlein lors d'infections vaginales.

Les lactobacilles ont une résistance naturelle très élevée envers plusieurs antibiotiques mais cette résistance, est dans plusieurs cas, pas transmissible (**Rabia et Chah, 2011**). Plusieurs résistances sont intrinsèques, cependant, des cas de résistances acquises ont été rapportés (**Delgado et al., 2005**). **Hummel et al. (2007)** ont rapporté que les lactobacilles sont intrinsèquement résistants à la famille des quinolones par un mécanisme inconnu. D'après **Zhou et al. (2005)**, plusieurs souches de lactobacilles sont résistantes aux antibiotiques agissant sur les bactéries Gram négatives (acide fusidique, acide nalidixique) et aux aminoglycosides.

### VII. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches de lactobacilles

L'activité antimicrobienne des 44 souches de lactobacilles, issues de quatre prélèvements différents (F4, F5, F9, F10), est testée à l'égard de 4 souches pathogènes isolées de la flore vaginale (*E. coli* 6E2, *S. aureus* 7S3, *Enterococcus* 5EN8 et *Candida* C1), sélectionnées sur la base de leur pouvoir d'adhésion et d'hémolyse, en utilisant la méthode des spots.

La figure 24 montre les résultats du test des spots de quelques souches de lactobacilles à l'égard des quatre souches pathogènes cibles.



**Figure 24. Test des spots montrant l'activité antibactérienne de culture de souches de lactobacilles à l'égard de souches pathogènes**

Parmi les cultures de lactobacilles (18 h), 84% ont montré une activité antimicrobienne sur au moins une des souches pathogènes cibles et 70% d'entre elles ont montré une activité à l'égard des 4 souches pathogènes.

Une action antibactérienne a été relevée pour 82% des souches à l'égard de la souche pathogène d'*E.coli*, 70% à l'égard de la souche de *S. aureus* et 72% à l'égard de la souche d'*Enterococcus* sp.

Quant à l'activité antifongique, à l'égard de la souche *Candida* C1, elle a été observée chez 70% des souches de lactobacilles testées. Toutes les souches ayant une activité antifongique sont également dotées d'une activité antibactérienne.

Les diamètres moyens des zones d'inhibition (incluant les diamètres des spots) (figures 28 et 29) varieraient de 21 à 42 mm (annexe IV). La meilleure activité antimicrobienne enregistrée a été notée avec la souche 4LB8 à l'égard de *Candida* C1 et 4LB11 à l'égard de *S. aureus* 7S3 avec 42 mm respectivement. En outre l'activité la moins importante a été obtenue à l'égard de la souche *S. aureus* 7S3 par la souche lactique 5LB1 (21 mm). D'après les résultats obtenus, il en ressort que :

Parmi les 16 souches issues du prélèvement F4 se trouvent les deux souches ayant l'activité antimicrobienne la plus importante. Toutes ces souches ont une activité antimicrobienne et antifongique à l'exception de la souche 4LB6 qui n'a pas d'effet sur la souche de *Staphylococcus*.

Toutes les souches dépourvues d'activité antimicrobienne appartiennent au même prélèvement (F5), elles représentent 50% de ce groupe. La souche ayant l'activité la moins importante fait partie de ce groupe et représente la seule souche ayant un pouvoir antimicrobien sur 4 souches pathogènes pour ce prélèvement.

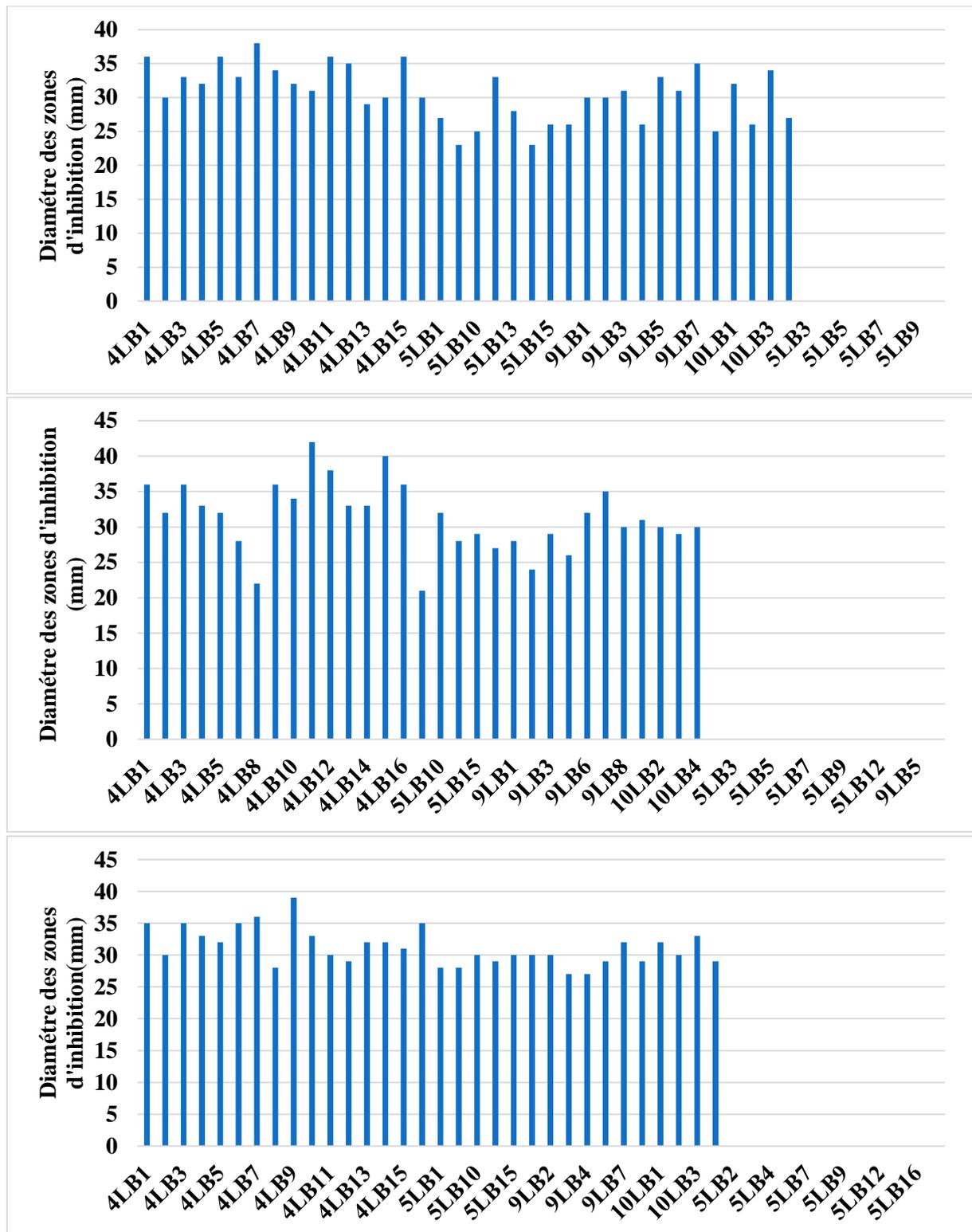
Toutes les souches du prélèvement F9 ont une activité antimicrobienne sur les 4 souches pathogènes testées mis à part 9LB5 qui n'agit pas sur les souches *Staphylococcus* et *Enterococcus* et 9LB8 qui est dépourvue d'activité antifongique.

Enfin le prélèvement F10 n'abrite que des souches ayant une activité antimicrobienne sur les 4 souches pathogènes testées (figure 25, figure 26).

Ces lactobacilles proviennent tous de prélèvements vaginaux de femmes saines (du point de vue infectieux), ce qui démontre leur rôle protecteur dans une flore vaginale normale.

En effet, les lactobacilles sont connus antagonistes de nombreuses flores pathogènes et ceci en déployant plusieurs mécanismes dont la compétition nutritionnelle et stérique et la synthèse de diverses substances antimicrobiennes (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

Un grand nombre de ces dernières ont été rapportées comme inhibiteurs d'une large gamme de bactéries à Gram positif et négatif ainsi que de levures. On a décrit une substance qui a montré une activité *in vitro* contre les espèces uropathogènes de *E.coli* et d'*Enterococcus* mais dont le rôle *in vivo* reste à élucider. D'autres mécanismes sont proposées pour expliquer l'antagonisme microbien comme la concurrence pour les éléments nutritifs et l'inhibition de l'adhésion des agents pathogènes aux surfaces (**Amin et al., 2011**).



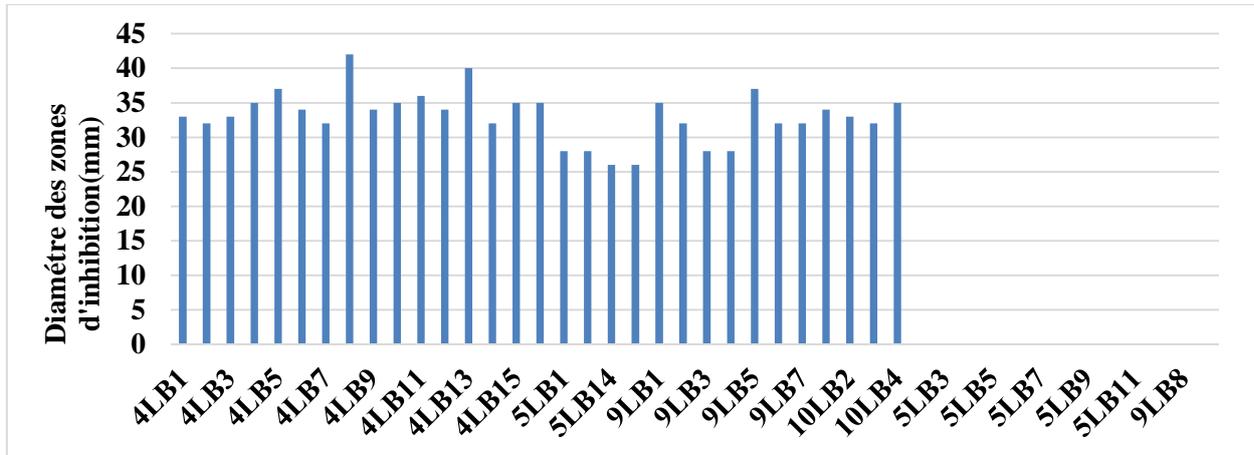


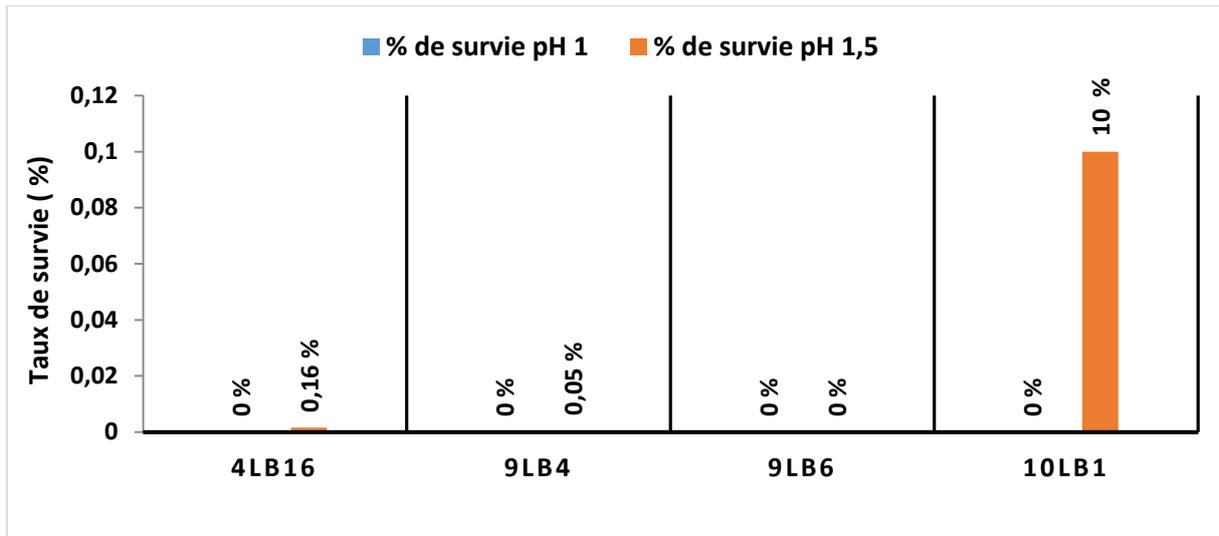
Figure 26. Activité antifongique des souches de lactobacilles à l'égard de la souche *Candida* sp. C1.

### VIII. Sensibilité des souches de lactobacilles à l'acidité et aux sels biliaires

L'une des conditions principales pour qu'une souche puisse répondre à la définition de « probiotique » est sa viabilité et de ce fait elle doit survivre au passage par l'estomac (Guglielmo *et al.* (2007) ; Corzo et Gilliland (1999) ont rapporté que chez l'Homme, le pH du suc gastrique peut être aussi faible que 1,5.

La voie d'administration des agents probiotiques vaginaux est soit orale ou locale (application comme gel ou sous forme de suppositoires). Dans tout les cas de figure, les souches doivent faire face à certains obstacles pour pouvoir s'installer sur la muqueuse vaginale. Si une souche de lactobacilles est administrée par voie orale, elle doit résister au transit gastro-intestinal pour pouvoir arriver au colon et coloniser la muqueuse vaginale via la voie digestive. Pour cela, les quatre souches de lactobacilles sélectionnées ont été testées quant à leur résistance à l'acidité (pH 1,5), mimant l'acidité moyenne de l'estomac et du vagin et aux sels biliaires (0,3, 0,5 et 1%).

Les résultats montrent que toutes les souches résistent au pH 1,5. La souche 10LB1 semble être la plus résistante au pH 1,5 avec un taux de survie évalué à 10%. Elle est suivie par la souche 4LB16 qui affiche un taux de survie de 0,16% puis de la souche 9LB4 avec un taux de 0,05%. La souche 9LB6 n'a pu résister à ce pH. Aucune survie des quatre souches n'a été détectée à pH 1. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés dans la littérature (Du Toit *et al.*, 1998; Jacobsen *et al.*, 1999; Dunne *et al.*, 2001).



**Figure 27. Pourcentage de survie des souches de lactobacilles aux pH 1 et 1,5**

La concentration physiologique en bile chez l'Homme se situe entre 0,1 et 0,5 % (Dunne et al., 2001). Toutes les souches testées résistent à ces deux valeurs.

Cependant, la souche 10LB1, la plus résistante au pH 1,5; semble être la plus sensible à la bile avec une décroissance en fonction de l'augmentation de la concentration de cette dernière jusqu'à atteindre un taux zéro à 1%. Les 3 autres souches résistent aux variations de concentration de bile de 0,3% à 1%. La plus résistante est la souche 9LB6 (8,5 %, 0,61% 0,036%) suivie de la souche 9LB4 (3,1 %, 0,076%, 0,0048%) puis de la souche 4LB16 (0,023%, 0,0041%, 0,00011%)

Deux études antérieures ont évalué la survie dans les selles de la souche probiotique *Lactobacillus casei* Shirota chez des volontaires qui en consommaient quotidiennement ( $10^{10}$  ou  $10^{11}$  UFC); la souche a été retrouvée à une concentration de  $10^7$  UFC/g de selles, quel que soit l'ingesta. De même, *Lactobacillus salivarius* a été décelable dans l'iléon 2 à 7 h après son ingestion (taux de survie 11,8%). Enfin, *Lactobacillus fermentum* KLD a été rapportée résistante au transit gastro-intestinal, 0,5% des cellules ingérées ont été récupérées après 4 h dans l'iléon (Flourié et Nancey, 2007).

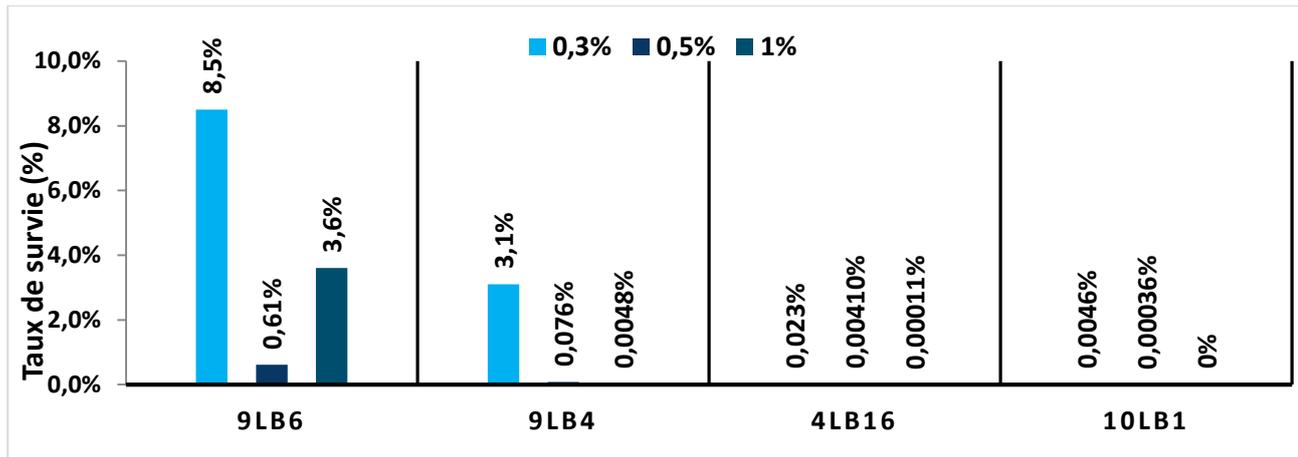


Figure 28. Pourcentage survie des souches de lactobacilles en présence de la bile

# *Conclusion*

## Conclusion

Ceci est la 1<sup>ère</sup> étude sur l'isolement et la caractérisation de la flore vaginale chez des femmes de la wilaya de Bejaia. Au cours de celle-ci, 44 souches de lactobacilles et 166 souches pathogènes ont été isolées à partir des prélèvements vaginaux.

Parmi les 44 souches de lactobacilles, seuls deux d'entre elles se sont avérées être faiblement adhérentes et 4 moyennement adhérentes au polystyrène. De même, parmi les 166 souches pathogènes (50 appartenant à *E.coli*, 38 à *Staphylococcus* sp, 16 à *Enterococcus* sp, 56 à *Candida* sp. et 3 à *Micrococcus* sp.) testés quant à leur pouvoir adhésif sur microplaque en polystyrène, 5 souches se sont avérées être moyennement adhérentes et 30 faiblement adhérentes.

L'étude de l'antagonisme des 44 souches de lactobacilles à l'égard de quatre souches pathogènes d'origine vaginale sélectionnées, parmi les 166 souches isolées, sur la base de leur pouvoir pathogène (hémolytique et adhésives) a été réalisée par un test direct cellules/cellules (test des spots). Une activité antimicrobienne à l'égard des 4 souches pathogènes a été détectée pour 36 souches, les diamètres des zones d'inhibition variaient de 21 à 42mm.

Quatre souches ont été sélectionnées sur la base de leur activité antimicrobienne et absence d'hémolyse et testées quant à leur résistance à l'acidité et aux sels biliars. Ces souches ont montré une bonne survie (0,05-10 %) au pH 1,5 et à 0,5 % de bile (0,023-0,61%).

Sur la base de l'ensemble de ces résultats, nous pouvons conclure que les infections vaginales sont associées à un déséquilibre de la flore normale, en particulier l'élimination ou la réduction de la flore de Doderlein « Lactobacilles » à l'origine de l'effet protecteur de muqueuse vaginale. Cette dernière, chez les femmes saines, peut constituer une bonne source d'isolement de souches de lactobacilles probiotiques pouvant être envisagées comme traitement préventif des infections vaginales ou traitement post-antibiothérapie pour repeupler la muqueuse vaginale.

Les résultats obtenus au cours de cette étude restent préliminaires et des études plus poussées sont nécessaires pour tirer des conclusions définitives. Cependant, ils sont très prometteurs et ouvrent de nombreuses perspectives:

- Identification de toute la flore isolée par méthodes moléculaires. En fait, l'identification des souches de lactobacilles et de levures est déjà entamée au niveau de l'Institut Charles Violette (U. Lille 1, France).
- Identification des mécanismes d'antagonisme mis en œuvre par les souches de lactobacilles (compétition, synthèse de substances antimicrobiennes).
- Mise en évidence d'une activité antibactérienne à l'égard de la flore anaérobie la plus souvent incriminée dans diverses infections vaginales.
- Vérification d'autres critères de sélection des probiotiques comme l'auto et la co-agrégation et l'hydrophobicité de surface.
- Adhésion sur des lignées de cellules vaginales
- Formulation d'un produit probiotique (administration *per os* ou locale)
- Etude *in vivo* chez des animaux femelles modèles (rates ou lapines).

## *Références bibliographiques*

## Références bibliographiques

- Aguilar Galvez AA, Dubois-Dauphin R ,Destain J, Campos D et Thonart P.(2011).Les entérocoques : avantages et inconvénients et biotechnologie.*Biotechnologie ,Agronomie, Société et Environnement* ,16,67-76.
- Ait Ouali F, Al Kassa I, Cudennec B, Abdallah M, Bendali F, Sadoun D, Chihib N et Drider D. (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces.*International Journal of Food Microbiology*, 191,116-124.
- Al Kassa I, Hober D, Hamze M, Chihib NE et Drider D. (2014). Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins.*Probiotics Antimicrobial Proteins*, 67,722-734.
- Allaert F et Pillon F.(2011). Les lactobacilles,une nouvelle arme pour prévenir les infections.*Actualités pharmaceutiques* ,511,41-42.
- Amin M , Goodarzi H,Orang Z ,Farsi S et Jorfi M.(2011).Isolation and identification of Lactobacillus species from the vagina and their antimicrobial properties.*African Journal of Microbiology Research*,5,3300-3304.
- Anonyme.(2007).Les probiotiques .*Cahier de nutrition diététique*, 42,(HS2), 7.
- Benchellal M,Guelzin K,Lemkhente Z,Jamili H ,Dehainy M,Moussaoui D,El Mellouki W,Idrissi K et Lmimouni B.(2011).La candidose vulvo-vaginale àl'hospital militaire d'instruction Mohammed V(Maroc).*Journal de Mycologie Médicale* .21,106-112.
- Bendali F, Durand A, Hébraud M, Sadoun D. (2011). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*: an Algerian isolate with antibacterial activity against enteric pathogens and probiotic fitness. *Journal of Food and Nutrition Research*,50 ,139-149.

## Références bibliographiques

---

- Bermudez-Humaran L-G, Langella P (2009) .Utilisation des bactéries lactiques comme vecteurs vaccinaux. *Revue francophone des laboratoires* ,417, 70-89.
- Bergogne-Bérézin E.(2007).Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic et thérapeutique. *Antibiotiques* ,9, 139-144.
- Bohbot J-M et Lepargneur J-P.(2012).La vaginose en 2011 : encore beaucoup d'interrogations.*Gynécologie obstétrique et Fertilité*,40,31-36.
- Bohbot J-M.Vaginose bactérienne. Communication présentée aux 31<sup>èmes</sup> journées nationales du CNGOF, Déc 2007, Paris, France.p.141-147.
- Boskey E,Telsch K, Whaley K,Moench T et Cone R.(1999) .Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification .*Infection and Immunity* ,67,5170-5175.
- Bothuyne-Queste E, Hannebicque-Montaigne K, Canis F,Noulard M-N, Plennevaux J, Tilloy E et Subtil D. (2012).La vaginose bactérienne est-elle un facteur de risque de prématurité ? Etude d'une cohorte de 1336 patientes au centre hospitalier d'Arras. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction*,41,262-270.
- Butel M-J.Les probiotiques et leur place en médecine humaine. *Journal des anti infectieux*, 2014. < <http://dx.doi.org/10.1016/j.antinf.2014.01.010> >
- Casin I.(1999).Diagnostic des cervicites bactériennes .*Revue Française des Laboratoires*, 318,49-52.
- Chakhtoura Z,Simon A,Duflos C et Thibaud E .(2013).Gynécologie de l'enfant et de l'adolescente.*Journal de Pédiatrie et de Puériculture*,26,38-56.
- Corzo G et Gilliland S.E. (1999). Bile salt hydrolase activity of three strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Science* , 82, 472-480.

## Références bibliographiques

---

- D'Aimmo D et Modesto Met Biavati B.(2007).Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. isolated from dairy and pharmaceutical products.*International Journal of Food Microbiology*,115,35-42.
- Delarras C.(2007).Microbiologie Pratique pour le Laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire .Edition :TED & DOC.Paris .476 p.
- Delgado A, Brito D, Peresb C, Noé-Arroyo F et Garrido-Ferandez A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology* ,22, 521–528.
- Delgado S0, Flórez A.B et Mayo B. (2005). Antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species from the human gastrointestinal tract. *Current Microbiology*,50 ,202-207.
- Douglas L-J.(2003).Candida biofilms and their role in infection. *Microbiology* ,11,30-35.
- Du Toit M, Franz C, Dicks L, Schillinger U, Haberer P, Warlies B, Ahrens F et Holzapfel W.(1998). Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, feces pH and feces moisture content.*International Journal of Food and Microbiology*,40, 93–104.
- Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S., Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan G. C, Shanahan F et Collins J. K.(2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation *in vivo* findings. *American Journal of Clinical Nutrition*,73, 386–392.
- Dupont C. (2001) .Probiotiques et prébiotiques.*Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 14, 77-81.
- Emile Carole.(2009).Examens bactériologiques des prélèvements vaginaux à visée diagnostique.*Option Biologie*,411,19-21.

## Références bibliographiques

---

- Faure S , Pubert C, Rabillier J ,Taillez J et Yvain A.(2013).Intéret des probiotiques en préventif au niveau des différentes flores de l'organisme. *Actualités Pharmaceutiques*,528,22-26.
- Fernandez H,Gervaise A et Tayrac R.(2002).Fibromes utérins .*Encyclopédie Médico-chirurgicale* .Paris .570-A-10.
- Fignon A,Pagneux JM ,Perrotin F ,Marret H Akpadz K et Body G.(1995). Dysménorrhée.*Encyclopédie Médico-chirurgicale*.Paris.161-A-10.
- Flourié B et Nancey S . (2007) . Propriétés fonctionnelles des probiotiques. *Cahier de Nutrition Diététique* , 42 (HS2),38-44.
- Garry P et Le Guern L. (1999). Les bactéries lactiques.*Bulletin de.Liaison CTSCCV*,6, 423-430.
- Guiraud J.P.( 2003).Microbiologie alimentaire.Edition : Dunod.Paris.89 p.
- Hummel A.S, Hertel C, Wilhelm H, Holzapfel C, et Franz M. (2007). Antibiotic Resistances of Starter and Probiotic Strains of Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 730-739.
- Idir F.(2014).Criblage de souches de bactéries lactiques et pathogènes productrices de biofilms sur surfaces en plastique et effet antibactérien et antiadhésif des souches lactiques à l'égard des souches pathogènes. Mémoire de Magister.Univeristé de Béjaia,Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie,Algérie ,58 pages.
- Jacobsen C. N, Roesfeldt Nielsen A. E, Moller P. L, Michaelsen K. F, Paerregaard A, Sandstrom B, Tvede M et Jacobsen M.(1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* sp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*,65, 4949–4956.

## Références bibliographiques

---

- Kamina P. (1979).Anatomie gynécologique et obstétricale. Edition :Maloine S.A.Paris.509 pages.
- Lansac J,Body G et Magnin G.(2011).La Pratique Chirurgicale en Gynécologie – Obstétrique.Edition : Elsevier –Masson .Paris .526.
- Larréque M,Vabres P et Guillet G.(2004).Vulvo-vaginites dans l'enfance.*Annales de Dermatologie et Venerologie*,131,889-899.
- Le Blanc Rose-Marie. (2009). Détecter des infections génitales basses chez la femme. *Option Biologie*, 424, 19-20.
- Lebeaux D,Chigo J-M et Beloin C.(2014).Tolérance des biofilms aux antibiotiques :comprendre pour mieux traiter .*Journal des Anti-infectieux*, 97,1016-1026.
- Lepargneur J-P, Rousseau V. (2002). Rôle protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* ,31,485-494.
- Luquet F et Corrieu G .(2005). Bactéries lactiques et probiotiques.Edition Tec & Doc.Paris.306 pages.
- Madigan M et Martinko J. (2007) .Brock, Biologie des micro-organismes. Edition Pearson Education.Paris .1047 pages.
- Marteau P, Rambaud J-C. (1996). Qui sont les probiotiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 3,129-192.
- Martin R,Soberon N,Vaneechoutte M, Florez A , Vazquez F et Suarez J.(2008).Characterization of indigenous vaginal lactobacilli from healthy women as probiotic candidates.*International Microbiology*,11,261-266.

## Références bibliographiques

---

- Mathur S et Singh R. (2005).Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *International.Journal of Food Microbiology*, 105,281-295.
- Mathur T,Singhal R ,Kham S ,Upad hyay D-J,Fatma T et Rattan A.(2006).Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci:An evaluation of three different screening methods.*Indian Journal of Medical Microbiology*,24,25-29.
- Mergui JL, Guyot B et Guyot S. (1995).Polypes du col utérin et cervicites .*Encyclopédie Médico-Chirurgicale*.Paris.390-1-20.
- Menard J-P et Bretelle.F. (2008) .Déséquilibre microbiologique de la flore vaginale chez la femme enceinte. Controverse sur le dépistage de la vaginose bactérienne asymptomatique. *La lettre du Gynécologue*, 334, 17-20.
- Menard J-P et Bretelle F. (2012) .Vaginose bactérienne et accouchement prématuré. *Gynécologie Obstétrique et fertilité*, 40, 48-54.
- Moutquin J-M.(2000).Infection génitale maternelle et accouchement prématuré.*Journal Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction* ,3,302-305.
- Neuman G. La dysbiose vaginale : son diagnostic et l'utilisation de probiotiques pour la protection menstruelle .<<http://www.ellentampon.ch/fr/action>>.
- Quentin R. Ecologie bactérienne vaginale : nature, exploration et prise en charge des déséquilibres. Communication présentée aux 30<sup>èmes</sup> journées nationales du CNGOF, Nov 2006, Paris, France.p.5-18.
- Quentin R et Verdon R. (2012).Les infections génitales hautes: bases microbiologiques du diagnostic et du traitement.*Journal de Gynécologie-obstetrique et Biologie de la Reproduction*, 41,850-863.

## Références bibliographiques

---

- Rabia A, et Chah N. (2011). Review article. Antibiotic resistance of probiotics organisms and safety of probiotic dairy products. *International Food Research Journal*, 18, 837-853.
- Ross J-F. (2010).La réponse au Farnésol de *Candida albicans*: Production de biofilm et parenté génétique. Mémoire du grade de Maîtrise en Microbiologie et Immunologie.Université de Montréal, Faculté des études supérieures, 140 p.
- Roux A et Chigo J-M.Les biofilms bactériens.*Bulletin Académique Vétérinaire .France-2006*.Tome 159, N°3.<[www.academie-veterinaire-defrance.org](http://www.academie-veterinaire-defrance.org)>.
- Rozenbaum H. (2002).Ménopause. *Endocrinologie Nutrition-Encyclopédie Médico-chirurgicale*.10-035-A-10,15 p.
- Serfaty D. (2011).Contraception.Edition :Elsevier –Masson.Paris .562 p.
- Shembri M,Kjaergaard K et Klemm P.(2003).Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms.*Molecular Microbiology*,48,253-267.
- Strus M,Kucharska A, Kukla G, Wloch M, Maresz K et Heczko P.(2005).The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*.*Infections Diseases in Obstetrics and Gynecology* ,13,69-75.
- Tailliez P. (2004) .Les lactobacilles : propriétés, habitats, rôle physiologique et intérêt en santé humaine. *Antibiotiques* ,6,35-41.
- Tremblay Y, Hathroubi S et Jacques M. (2014).Les biofilms bactériens :leur importance en santé animale et en santé publique . *Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*,78,110-116.
- Wagner R et Johnson Set Tucker D.(2012).Protection of vaginal epithelial cells with probiotic Lactobacilli and the effect of oestrogen against infection by *Candida albicans*.*Open Journal of Medical Microbiology*,2,54-64.

## Références bibliographiques

---

- Wainsten J-P. (2009).Le Larousse Médical .Edition: Larousse .Paris .1113 p.
- Zhou JS, Pillidge C, Gopal P.K. et Gill H.S. (2005). Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 198,211-217.

# *Annexes*

## Annexe I : Synthèse bibliographique

**Tableau I.** Espèces de lactobacilles isolées de prélèvements vaginaux (**Lepargneur et Rousseau, 2002**).

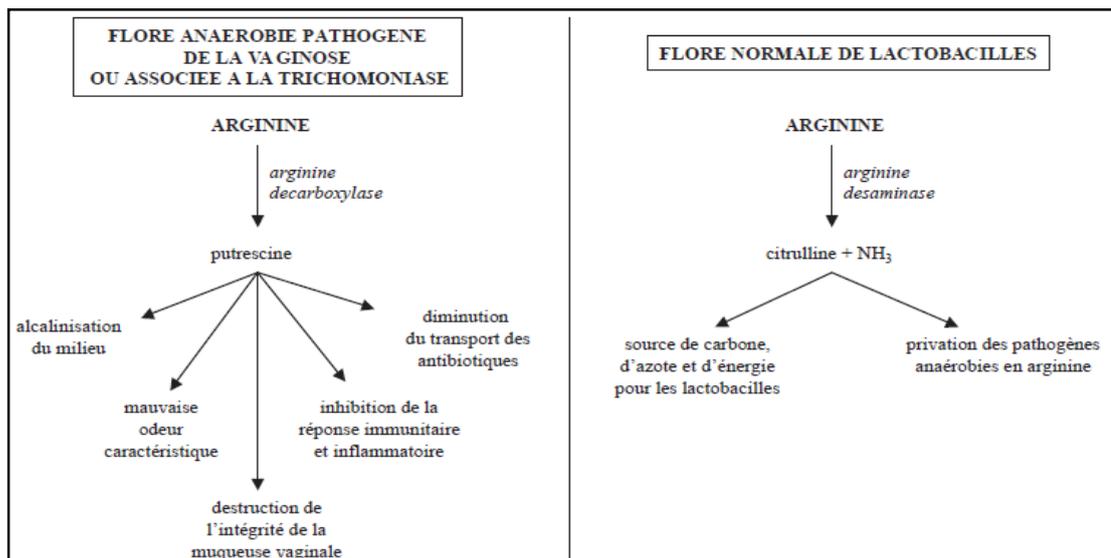
	Antonio, 1999 (étude sur 302 femmes)	Song, 1999 (étude sur 91 femmes)
<i>Lb. crispatus</i>	32 %	52,7 %
<i>Lb. jensenii</i>	23 %	–
<i>Lb. 1086V</i>	15 %	–
<i>Lb. gasseri</i>	5 %	20,8 %
<i>Lb. fermentum</i>	0,3 %	5,5 %
<i>Lb. oris</i>	0,3 %	–
<i>Lb. ruminis</i>	0,3 %	–
<i>Lb. reuteri</i>	0,3 %	–
<i>Lb. vaginalis</i>	0,3 %	8,8 %
<i>Lb. plantarum</i>	–	3,3 %
<i>Lb. salivarius ssp. salicinius</i>	–	1,1 %
<i>Lb. salivarius ssp. salivarius</i>	–	1,1 %
<i>Lb. acidophilus</i>	–	–
<i>Lb. cellobiosus</i>	–	–
Non identifiées	–	6,6 %
Autres bactéries que lactobacilles	23,5 %	–

**Tableau II :** Traitement de la vaginose bactérienne pendant la grossesse (**Menard et Bretelle, 2012**).

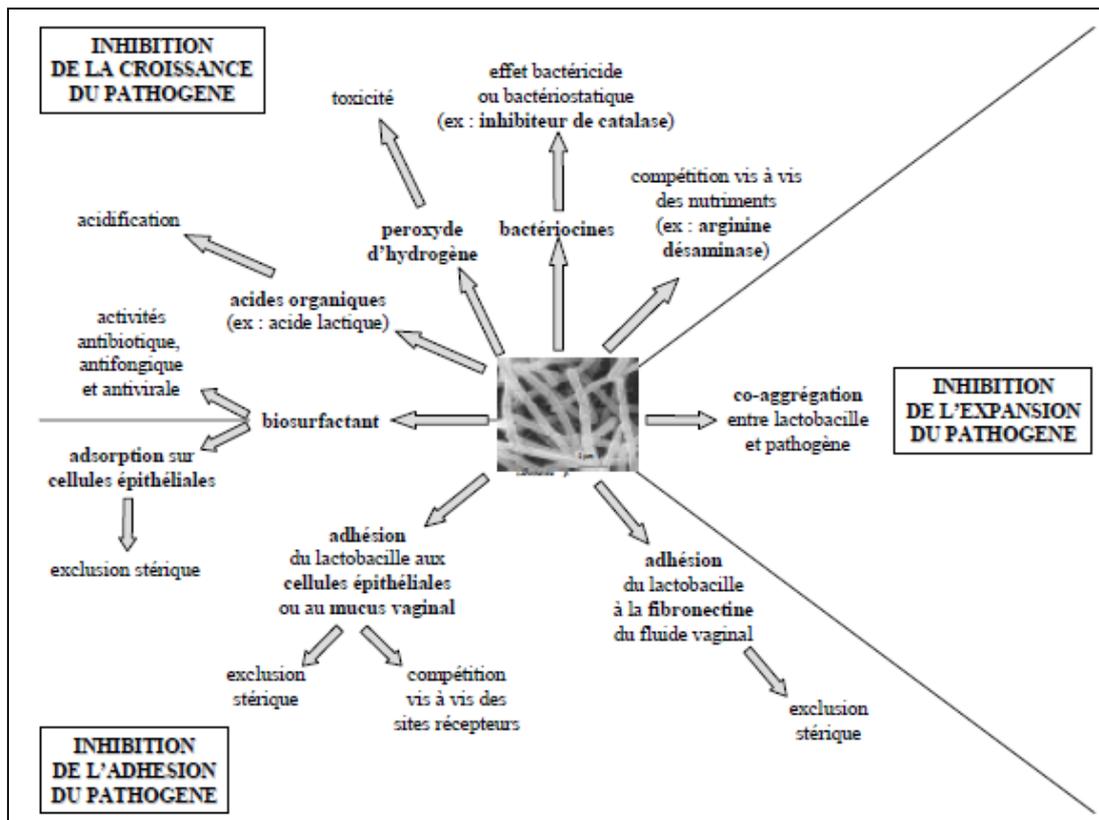
Molécule	Posologie	Durée
<b>Métronidazole</b>	Comprimé 500 mg	2 fois par jour pendant 7 jours
	Comprimé 500 mg	4 comprimés en une seule prise
	Gel vaginal 0,75 %	5 g, 2 fois par jour pendant 7 jours
<b>Clindamycine</b>	Comprimé 300 mg	2 fois par jour pendant 7 jours

**Tableau III.** Critères de base utilisés pour la conception des probiotiques (Al Kassa et al., 2014).

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécurité dans les aliments et l'utilisation clinique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Origine humaine de préférence</li> <li>• Absence de pathogénicité et de virulence</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critères technologiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stabilité de la souche lactique</li> <li>• Viabilité au cours du traitement et du stockage</li> <li>• Bonnes propriétés sensorielles</li> <li>• Résistance aux phages</li> <li>• Facilité de production à grande échelle</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Critères fonctionnels</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Résistance à la bile et à l'acidité</li> <li>• Adhérence aux cellules intestinales humaines</li> <li>• Effet sur la santé cliniquement validé et documenté</li> </ul>



**Figure 1.** Effet des lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase (Lepargneur et Rousseau, 2002).



**Figure 2.** Effets des lactobacilles vaginaux sur les souches à potentiel pathogène (Lepargneur et Rousseau, 2002).



**Figure 3.** Pertes blanches dans la colpite à Trichomonas (Menard et Bretelle, 2012).

## Annexe II : Questionnaire

### Questionnaire

Patiente n° :.....

Nombre de prélèvements :.....

Date :.../.../.....

---

Age de la patiente :.....ans

Motif de consultation :.....

Grossesse :  Oui  Non

Infection :  Oui  Non

- Si oui, de quel type : .....

La patiente suit elle une antibiothérapie  Oui  Non

- Si oui, quel antibiotique :.....
- Durée de l'antibiothérapie :.....

La patiente a-t-elle suivie une antibiothérapie antérieure  Oui  Non

- Si oui, quel antibiotique :.....
  - Durée de l'antibiothérapie : .....
-

### Annexe III: composition des milieux de culture selon le fournisseur

Tableau I : Bouillon MRS (de Man Rogosa et Sharpe)

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Glucose	20
Tween 80	1ml
Phosphate dipotassique	2
Acétate de Sodium	3
Citrate triammoniacale	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Eau distillée	Qsp 1L

Tableau II :Bouillon TSB(Trypticase-Soy Broth, pH 7) :

Composants	g/l
Peptone de caseine	17
Peptone de soja	3
Glucose	2,5
Phosphate dipotassique	2,5
Chlorure de sodium	5
Extrait de levure	6
Eau distillée	Qsp 1L

Tableau III : Gélose Chapman pH 7

Composants	g/l
Peptone	10
Extrait de viande de bœuf	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	2,5
Rouge de phénol	0,025
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

Tableau IV : Bouillon nutritif pH 7

Composants	g/l
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2,5
Peptone	5
Chlorure de Sodium	5
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau V : Bouillon BHIB pH7 :**

Composants	g/l
Infusion cœur-cervelle	27,5
Peptone	5
Chlorure de sodium	2
D(+) glucose	2,5
Phosphate disodique	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Remarque :** pour les milieux gélosés (géloses ordinaires), ajouter 15 g d'agar / 1L d'eau distillée  
. Dans le cas des géloses molles, ajouter 7,5 g /1L d'eau distillée.

**Tableau VI : Gélose EMB pH 7,2**

Composants	g/l
Peptone	10
Lactose	10
Phosphate dipotassique	2
Eosine	0,4
Bleu de méthylène	65 mg
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau VII : Milieu VRBL pH 7,4**

Composants	g/l
Peptone	7
Extrait de levure	3
Lactose	10
Chlorure de sodium	5
Mélange de sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,002
Rouge neutre	0,03
agar	15

**Tableau VIII : Milieu Citrate de Simmons pH 7 :**

Composants	g/l
Citrate de sodium	1
Bleu de bromothyl	0,08
Chlorure de sodium	5
Sulfate de magnésium	0,2
Hydrogénophosphate de potassium	1
Dihydrogénophosphate d'ammonium	1
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau IX : Bouillon Rothe pH 7 :**

<b>Composants</b>	<b>g/l</b>
Polypeptone	20
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate monopotassique	2,7
Azide de sodium	2,7
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau X: Gélose Slanetz et Bartley pH 7:**

<b>Composants</b>	<b>g/l</b>
Tryptose	20
Extrait de levure	5
Glucose	2
Phosphate dipotassique	4
Azide de sodium	0,4
Chlorure de 2,3 ,5 triphényltétrazolium	0,1
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau XI : Milieu VRBG pH 7,4**

<b>Composants</b>	<b>g/l</b>
Peptone	7
Extrait de levure	3
glucose	10
Chlorure de sodium	5
Mélange de sels biliaires	1,5
Cristal violet	0,002
Rouge neutre	0,03
agar	15

**Tableau XII :Gélose TSI pH 7 :**

<b>Composants</b>	<b>g/l</b>
Tryptone	14
Extrait de levure	3
Extrait de viande	3
Glucose	1
Lactose	10
Saccharose	10

Chlorure de sodium	5
Thiosulfate de sodium	0,3
Citrate ferrique ammoniacal	0,3
Rouge de phénol	24
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau XIII: bouillon TSB pH 7 :**

Composants	g/l
Tryptone	17
Peptone de soja	3
Glucose	2,5
Phosphate dipotassique	2,5
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau XIV : Gélose Columbia pH 7 :**

Composants	g/l
Polypeptone	17
Peptone pancréatique	3
Axtrait de levure	3
Amidon de maïs	1
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillée	Qsp 1L

**Tableau XV : Bouillon Tryptone-Sel (TS) pH 7 :**

Composants	g/l
Tryptone	1g
Chlorure de sodium	9g
Eau distillée	Qsp 1L

## Annexe IV :Activité antimicrobienne des souches lactiques

Souches à tester	Diamètre des zones d'inhibition (mm)			
	Souche <i>E.coli</i> (6E2)	Souche <i>Staphylococcus</i> (7S3)	souche <i>Enterococcus</i> (5En8)	Souche <i>Candida</i> (C1)
4LB1	36	36	35	33
4LB2	30	32	30	32
4LB3	33	36	35	33
4LB4	32	33	33	35
4LB5	36	32	32	37
4LB6	33	0	35	34
4LB7	38	28	36	32
4LB8	34	22	28	42
4LB9	32	36	39	34
4LB10	31	34	33	35
4LB11	36	42	30	36
4LB12	35	38	29	34
4LB13	29	33	32	40
4LB14	30	33	32	32
4LB15	36	40	31	35
4LB16	30	36	35	35
5LB1	27	21	28	28
5LB2	23	0	0	0
5LB3	0	0	0	0
5LB4	0	0	0	0
5LB5	0	0	28	0
5LB6	0	0	0	0
5LB7	0	0	0	0
5LB8	0	0	0	0
5LB9	0	0	0	0
5LB10	25	32	30	0
5LB11	33	0	0	0
5LB12	0	0	0	0
5LB13	28	28	0	28
5LB14	23	0	29	26
5LB15	26	29	30	0
5LB16	26	27	0	26
9LB1	30	28	30	35
9LB2	30	24	30	32
9LB3	31	29	27	28
9LB4	26	26	27	28
9LB5	33	0	0	37
9LB6	31	32	29	32
9LB7	35	35	32	32
9LB8	25	30	29	0
10LB1	32	31	32	34
10LB2	26	30	30	33
10LB3	34	29	33	32
10LB4	27	30	29	35

### Annexe V : Sensibilité des LB aux antibiotiques :

Antibiotique	concentration	Diamètre de la zone d'inhibition en mm						
		4LB1 6	9LB 6	9LB 4	10LB 1	5LB1 3	5LB1 4	9LB 5
Gentamycine	10µg	20	16	14	30	14	22	20
Bactrim (sulfamel+Trimeth)	23,75+1,25	0	26	0	30	0	24	0
Ampicilline	10µg	30	28	24	36	0	20	22
Tetracycline	30µg	24	24	14	24	0	20	24
Rifampicine	5µg	20	30	22	30	0	20	20
Vancomycine	30µg	0	0	0	26	0	28	0
Erythromycine	15µg	30	26	20	0	20	24	14
Streptomycine	10µg	8	0	0	0	0	0	0

### Annexe VI : Principaux critères d'identification

Tableau I : Caractères principaux des entérobactéries (Delarras , 2007).

Caractères principaux – Milieux de culture Identification biochimique	
Morphologie	Bacilles 0,5µm sur 3µm environ à extrémités arrondies
Coloration de Gram	Gram -
Type respiratoire	Aéro-anaérobie ou anaérobie facultative
Oxydase	-
Catalase	+
Aspect et couleur des colonies sur EMB	Colonies de diamètre 2 à 3 mm, éclat métallique verdâtre par réflexion, couleur sombre à noire par transparence ( <i>E.coli</i> )
Glucose	+
Lactose	+

**Tableau II : Caractères des Staphylocoques (Delarras , 2007).**

Caractères principaux – Milieux de culture Identification biochimique	
Morphologie	<i>Cocci</i> sphériques de 0,5 à 1 µm de diamètre : -en amas (« grappes de raisin ») : Staphylococcus aureus ; - en paires, amas irrégulier : autres espèces.
Coloration de Gram	Gram+
Type respiratoire	Anaérobies facultatifs en général
Oxydase	+
Catalase	+
Condition de culture	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Température optimale a 37°C ; croissance à 10°C et à 45°C selon les espèces</li> <li>• pH optimal de 7,2 à 7,4</li> </ul>
Caractères spécifiques	Halotolérant : 6,5% de NaCl
Milieux d'isolement sélectifs	Gélose de Baird- Parker Gélose Baird-Parker RPF Milieu de Chapman...

**Tableau III : Caractères principaux des Microcoques (Delarras , 2007).**

Caractères principaux – Milieux de culture Identification biochimique	
Morphologie	<i>Cocci</i> de 0,8 à 3,5µm de diamètre, isolés, en amas, tétrades, diplocoques suivant les espèces.
Type respiratoire	Aérobies stricts
Oxydase	- (+)
Catalase	+
Conditions de culture	<ul style="list-style-type: none"> <li>- température optimale entre 20 et 37°C suivant espèces</li> <li>- croissance à 37°C</li> <li>- Espèces psychrotrophes</li> <li>- pH optimal de 7,2 à 7,4</li> </ul>
Caractères spécifiques	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Halotolérants : de 5 à 10-15% de NaCl</li> <li>- Croissance à 7,5%</li> <li>- Production de pigment</li> </ul>
Milieux d'isolement sélectifs	Pas de milieu spécifique, détection possible sur gélose de Baird-Parker, gélose de Chapman.

## Résumé

Cette étude a été effectuée sur 10 femmes (service de gynécologie, établissement hospitalier privé, w. Bejaïa) entre Janvier et Mars 2016. Les objectifs visés étaient dans un premier temps l'étude de la diversité de la flore vaginale et plus particulièrement des lactobacilles à partir de prélèvements vaginaux et dans un deuxième temps la caractérisation de ces derniers quant à leur potentiel probiotique. Quarante quatre (44) souches de lactobacilles et 166 souches pathogènes (53 appartenant à *E. coli*, 38 à *Staphylococcus* sp, 16 à *Enterococcus* sp, 56 à *Candida* sp. et 33 à *Micrococcus* sp.) ont pu être isolées. Parmi ces souches, six souches de lactobacilles et 35 souches pathogènes se sont avérées adhérentes au polystyrène. La capacité d'adhésion et par conséquent de formation de biofilms constitue un critère crucial de virulence. L'étude de l'antagonisme des souches de lactobacilles à l'égard de 4 souches pathogènes d'origine vaginale sélectionnées (hémolytiques et adhésives) a été réalisée par le test des spots. Une activité antimicrobienne à l'égard des 4 souches pathogènes a été détectée pour 36 souches de lactobacilles. De plus, 4 souches de lactobacilles criblées, sur la base de leur fort pouvoir antimicrobien et caractère non hémolytique, se sont avérées résistantes à l'acidité (pH 1,5) et à la bile (0,5 %), deux contraintes auxquelles les candidats probiotiques doivent faire face. Ce travail nous a permis de sélectionner quatre souches candidates à l'élaboration d'un produit probiotique. Cependant, des études plus poussées sont nécessaires afin de tirer des conclusions définitives.

**Mots clés :** flore vaginale, caractérisation, *Lactobacillus*, probiotique, antagonisme

## Abstract

This study was undertaken with 10 women vaginal samples (private health-care unit, Bejaia, Algeria) between January and March 2016. The aimed objectives were primarily the study of the vaginal flora diversity and particularly the Lactobacilli, using vaginal sampling procedure and secondly, the characterization of their probiotic potential using classical tests (adhesion to polystyrene, resistance to acidity and bile and antimicrobial activity). Forty four Lactobacilli strains and 166 pathogens (53 belonging to *E. coli*, 38 to *Staphylococcus* sp, 16 to *Enterococcus* sp., 56 to *Candida* sp. and 33 to *Micrococcus* sp.) strains were isolated from the vaginal samples. From them, six Lactobacilli and 35 pathogenic strains were adherent to polystyrene. The adhesion capacity of the pathogens, testify on their biofilm formation potential, a crucial virulence trait. The study of the Lactobacilli antagonism towards four pathogenic strains from vaginal origin, screened on their hemolytic and adhesion power (*E. coli*, *S. aureus* 7S3, *Enterococcus* sp. and *Candida* sp. C1) was conducted using a spot on lawn test. An antimicrobial activity against the four targeted pathogenic strains was detected in 36 lactobacilli strains. Moreover, four Lactobacilli strains, screened on the basis of their high antimicrobial potential and non hemolytic trait, were resistant to acidity (pH 1.5) and bile (0.5 %) stresses, two constraints which a probiotic candidate must face. This work allowed us to screen potential probiotics lactobacilli candidates from the vaginal flora. However, more laborious studies are necessary to reach definitive conclusions.

**Key words:** vaginal flora, characterization, *Lactobacillus*, probiotic, antagonism