



République Algérienne démocratique et populaire

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Larbi Tébessi- Tébessa-

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences de la Nature et de la Vie

Département : Biologie Appliquée

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Domaine : Science de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Option : Microbiologie Appliquée



Thème

Etude de l'effet probiotique des bactéries lactiques
isolées de la cavité vaginale

Présentée par

Mlle Cheriet Yamina

Mlle Assoul Basma

Mlle Brahmi Nadjia

Date de soutenance : 14 /06/2022

Devant le jury composé de :

Dr. Menasria. T

M.C.A Université de Tébessa

Président

Dr. Benhadj. M

M.C.A Université de Tébessa

Promotrice

Dr. Toumi. N

M.C.A Université de Tébessa

Examinatrice

Année Universitaire

2021/2022

Remerciements

*Je remercie en premier lieu DIEU, le Clément, le Miséricordieux, le tout Puissant.
Louange à ALLAH Seigneur des mondes, qui m'a permis de réaliser ce travail, ainsi
que ses innombrables bienfaits.*

*Je tiens avant tout à remercier mon promotrice **Dr. BENHADJ MABROUKA** qui a
accepté de m'encadrer, qui m'a guidé par ses précieux conseils et suggestions
pertinentes et m'a bien expliqué les étapes de ce travail. Veuillez trouver ici,
l'expression de mon profond respect et mes sincères remerciements.*

Je tiens également à remercier :

***Dr. MENASRIA TAHA** pour l'honneur qu'il me fait de présider le jury et d'évaluer
ce travail.*

***Dr. TOUMI NASSIMA** pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Un grand remercie de **Dr. MATROUH ROUMAÏSSA** aussi qui ont contribué avec
un soin particulier à la réalisation de ce travail. À tout moment ils ont fait preuve
de la plus grande disponibilité à mon égard. J'ai apprécié de près leur rigueur,
leur simplicité et leur grande générosité. Je vous prie de trouver ici le témoignage
de ma profonde reconnaissance et de mes remerciements.*

*Mes remerciements vont à tout le personnel des laboratoires pédagogiques de
l'université de Microbiologie et spécialement mes techniciennes **CHAHRA** et **IMEN**,*

Merci pour votre gentillesse qui m'ont aidé avec une grande humeur.

*Enfin je remercie tous ceux et celles qui ont contribué de près ou de loin à
l'élaboration de ce modeste travail, trouvent ainsi l'expression de mes profondes
gratitudes et respects.*

Dédicace

Grace à Allah

Je dédie ce travail :

*A mes très chers **parents**, pour leur joie de vivre, leur patience et volonté
dont vous m'avez toujours entourée et
que vous m'avez transmise. Je vous remercie du fond du cœur pour
m'avoir encouragée et conseillée durant mes études
Que Dieu les garde pour moi.*

A mes chères frère et sœurs

Sabri,Aymen,Mohamed,Riheb,Arwa

*A mon binômes **Basma et nadjia***

*Je dédie ce travail à toutes nos préparations, nos larmes et nos fous rires,
nos déceptions et nos éclats de joie. A tous les moments qu'on a passés
ensemble.*

*A mes amies **Khadija, Imen, Hanen, Zouhour,,Salwa, Nada, Douha, Aida, Amina,
Chaima, Chifa,***

Asma,Imen.....

*Je vous remercie pour votre
soutien tout le long de ces années et pour les moments passés de joie ou de
tristesse toujours on a été épaulés l'un à l'autre.*

A tous ceux qui me sont chers.

A toute la promotion MicrobiologieAppliquée2019/2020.

A tous mes professeurs durant les cycles de ma scolarité

*A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail.*

Cheriet Yamina

Dédicace

Avant tout je remercie tout d'abord Allah de m'avoir donné le courage, la force, la santé, et la patience pour pouvoir accomplir ce travail.

À ma mère, mon deuxième pilier dans la vie, qui me permet de poursuivre mon chemin tout en étant à mes côtés. Merci pour tes encouragements, ton amour et ton assistance. Je suis devenue ce que je suis grâce à toi.

À mon père Je tiens à te remercier du plus profond de mon cœur pour tous tes encouragements afin de me dépasser et d'aller toujours plus loin. J'espère t'avoir fait honneur avec mon modeste travail.

*À mes sœurs **OUMAIMA** et **CHOUROUK***

*À mon frère **ISLEM***

*À mes binômes **YAMINA** et **NADJIA***

*A tous mes amis **CHAIMA, KOUKA, KHADIJA, IMEN, CHAIMA**.....pour vos encouragements et vos inquiétudes*

À mes collègues et amis : Travailler avec vous au labo était avec un grand plaisir ; je garderai un très bon souvenir de nos nombreux moments de rire et surtout nos débats très enrichissants...

Assoul basma

Dédicace

Grace à Allah

Je dédie ce travail

A Mes Très chers Parents

A ma chère mère **khira** et à mon cher père **Seghir** pour l'amour qu'ils m'ont toujours donné, leurs encouragements et toute l'aide qu'ils m'ont apportée durant mes études. Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération, et mon amour pour les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon instruction et mon bien-être.

A mes chères frères **Adel** et **Mohamed**.

A ma belle-sœur **Souad**.

A ma nièce **Mariam** et sa femme **Sara**.

A mon fiancé **Salah Eddine**.

A toute ma famille.

A mon binômes **Yamina** et **Basma**.

A mes amies **Khadija, Hayat, Amal, Chaima , Yasmine , Souad , Chadia , Hanan Hadil , Amina , Bouthaina...**

À toute la classe de Microbiologie Appliquée 2021/2022.

A tous mes professeurs durant les cycles de ma scolarité.

A tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Nadjia

Remerciements

Dédicace

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction

1

Partie bibliographique

Chapitre I : Les bactéries lactiques

1. Historique ou découverte	4
2. Généralité et définition des bactéries lactiques	5
3. Habitat	6
4. Taxonomie et caractère distinctifs	6
4.1. Caractères morphologiques	6
4.1.1. Caractères biochimiques et physiologiques	6
4.2. Caractère moléculaire	7
4.1.3. Caractères immunologiques	9
4.2. Taxonomie	10
5. Métabolisme fermentaire	10
6. Les différents genres	12
6.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	13
6.2. Le genre <i>Pediococcus</i>	14
6.3. Le genre <i>Leuconostoc</i>	15
6.3.1. Le genre <i>Oenococcus</i>	16
6.3.2. Le genre <i>Weissella</i>	17
6.4. Le genre <i>lactococcus</i>	17
7. Domaine d'utilisation des bactéries	18

Chapitre 2 : les probiotiques

1. Historique	21
2. Définition	21
3. Classification des probiotiques	22
3.1. Les bactéries lactiques	22

3.2. Les bactéries non lactiques	23
3.3 Les levures Classe des Saccharomycotina	23
4. Les différents critères de sélection des souches probiotiques	24
4.1. Critères fonctionnels	25
4.1.1 Survie au cours du transit digestif	25
4.1.2 Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus	25
4.1.3 Colonisation	25
4.1.4 Aptitude de produire des différents effets bénéfiques sur homme	25
4.2 Critères technologiques	25
4.3 Critères de Sécurité	26
4.1.1. Identification de la souche	26
4.1.2. Innocuité	26
4.1.3. Origine	27
5. Les mécanismes d'action des probiotiques	27
6. Effets des probiotiques sur La santé humain	29
6.1 L'élimination ou diminution d'intolérance de lactose	30
6.2 Effets sur le système immunitaire	30
6.3 autre effets bénéfiques des probiotiques	30

Chapitre III : La cavité vaginale de la femme

1. L'écosystème vaginal	32
2. Anatomie et physiologie de l'appareil génital féminin	32
2.1 Les organes génitaux internes et externes	32
2.1.1 Les organes génitaux internes	32
2.1.2 Les organes génitaux externes	33
3. Le pH vaginal	33
4. La microflore vaginale	33
4.1. Flore bactérienne dominante.	34
4.2. Flore bactérienne intermédiaire	34
4.3. Equilibre de la microflore	35
4.4. Le déséquilibre de la microflore vaginale	35
5. Evolution de la microflore vaginale normale	36
5.1. Dès les premières semaines de vie à la petite enfance	36
5.2. Au moment de la puberté	37

5.3. Chez les femmes adultes	37
5.4. Chez les femmes enceintes	37
5.5. La ménopause	37
6. Action des lactobacilles vis-à-vis des germes pathogènes	38
6.1. Inhibition de la croissance du pathogène	38
6.1.2. Par production de peroxyde d'hydrogène	39
6.1.3. Par production de bactériocines	40
6.1.4. Par production de l'enzyme arginine désaminase	41
6.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène	42
6.2.1. Par compétition directe avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales vaginales	42
6.2.2. Par adhérence à la fibronectine humaine	42
6.2.3. Par les biosurfactants	43
7. Inhibition de l'expansion du pathogène : Co-agrégation	43
8. Développement des probiotiques au niveau vaginal	44
9. l'efficacité des probiotiques dans le traitement et la prévention des infections vaginales	44
9.1 Probiotiques et vaginose bactérienne	44
9.2 Probiotiques et vulvo-vaginite candidosique	45
Partie expérimentale	
1. Objectif	47
2. Lieu de travail	47
3. Matériels et Méthodes	47
3.1. Appareillages et autres	47
3.2. Milieux de culture	48
3.3. Les Réactifs et les produits chimiques	48
3.4. Méthodes	49
3.4.1. Protocole de prélèvements	49
3.4.2. Technique d'ensemencement et de purification des souches bactériennes	49
3.4.3. Conservation des souches	50
3.4.3.1. Conservation de courte durée	50
3.4.3.2. Conservation de longue durée	50
4. Pré-identification des bactéries lactiques isolées	50

4.1. Recherche de la catalase	50
4.2. Examen microscopique	51
5. Identification biochimique des souches isolées	51
5.1. Etude du type fermentaire	51
5.2. Identification des bactéries à l'aide de galerie API20E	51
5.3. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées	52
5.3.1. Étude du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques	52
5.3.2. Résistance aux différentes concentrations de NaCl	53
5.3.3. Résistance aux différents pH	53
5.3.4. Analyse des caractères de surface cellulaire	53
5.3.4. a. Hydrophobicité de la surface cellulaire	53
5.3.4.b. Test d'auto agrégation	54
5.3.4.c. Test de la co-agrégation	54
5.4. Étude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées	54
6. Adhésion in vitro au tissu épithélial	55

Résultats et discussion

1. Site de prélèvement	56
2. Isolement et purification des souches bactériennes	57
3. Identification physiologique et biochimique des souches	57
3.1. Etude morphologique	57
3.1.1. Examen macroscopique et microscopique	57
3.1.1.a. Caractérisation macroscopique	57
3.1.1.b. Caractérisation microscopique	58
3.2. Test respiratoire	63
4. Identification biochimique des souches isolées	66
5. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées	70
5.1. Etudes du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques	70
5.2. Tests de survie des bactéries lactiques	72
5.2.1. Résistance aux différentes concentrations de NaCl	72
5.2.2. Résistance aux différents Ph	73
5.3. Analyse des caractères de surface cellulaire	75
5.3.a. Hydrophobicité de la surface cellulaire	75
5.3.b. test de l'auto- agrégation	76

5.3.c. Test de la co-agrégation	78
5.4. Etude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques	80
Pouvoir acidifiant	
6.L'adhésion <i>in vitro</i> au tissu épithélial	81
Conclusion	84
Référence bibliographique	
Annexe	

Résumé

La microflore vaginale joue un rôle important pour la santé ; composé essentiellement de bactéries créant un film protecteur, 90% des bactéries lactiques sont des Lactobacilles qui sont totalement dépendants de l'imprégnation œstrogénique, c'est -à-dire de la sécrétion d'œstrogènes, hormones sexuelles féminines produits principalement par les ovaires. L'objectif de cette étude était la mise en évidence du potentiel probiotique des bactéries lactiques isolées de la cavité flore vaginal et plus particulièrement les Lactobacilles aussi l'étude de caractérisations biochimiques.

L'identification des 21 souches isolées et purifiées à partir de différentes patientes de la Wilaya de Tébessa a été réalisée par des tests morphologiques, physiologique et biochimiques ainsi que l'exposition de souches lactiques aux différents tests de sélection du pouvoir probiotiques. En effet, des capacités adhésives considérables (hydrophobicité, auto-agrégation et Co-agrégation) ont été notées pour la majorité des souches testées.

D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques. Les résultats du test d'adhésion aux cellules épithéliales ont montré que nos souches possèdent un pouvoir adhésif très remarquable.

A travers les résultats obtenus, nous concluons les souches lactiques possèdent un potentiel probiotique et jouent un rôle important dans la protection de l'écosystème vaginal

Mots-clés : Flore vaginale, Lactobacilles, Bactérie lactique, Hydrophobicité, Auto-agrégation, Probiotique, Co-agrégation 'écosystème vaginal.

Abstract

The vaginal microflora plays an important role in health; Composed essentially of bacteria creating a protective film, 90% of lactic acid bacteria are Lactobacilli which are totally dependent on estrogen impregnation, the secretion of estrogens, female sex hormones produced mainly by the ovaries. The objective of this study was to highlight the probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from the vaginal flora cavity and more particularly the Lactobacilli also the study of biochemical characterizations.

The identification of the 21 strains isolated and purified from different patients of the Wilaya of Tébessa was carried out by morphological, physiological and biochemical tests as well as exposure of lactic strains to the various probiotic power selection tests. Indeed, considerable adhesive capacities (hydrophobicity, self-aggregation and Co-aggregation) were noted for the majority of the strains tested.

According to the results of the study of the technological aptitudes, there are variations between the strains as much at the level of the acidifying activity. However, the strains had good technological features. The results of the epithelial cell adhesion test showed that our strains have a very remarkable adhesive power.

Through the results obtained, we conclude that lactic pacifiers have a probiotic potential and play an important role in the protection of the vaginal ecosystem.

Keywords: Vaginal flora, Lactobacilli, Lactic acid bacteria, Hydrophobicity, Self-aggregation, Probiotic, Vaginal ecosystem co-aggregation.

ملخص

تلعب البكتيريا المهبليّة دورًا مهمًا في الصحة؛ تتكون أساسًا من البكتيريا التي تخلق طبقة واقية، 90٪ من بكتيريا حمض اللاكتيك هي العصيات اللبنية التي تعتمد كليًا على تثريب الأستروجين، أي إفراز أوستروجينات، الهرمونات الجنسية الأنثوية التي ينتجها المبيض بشكل أساسي. كان الهدف من هذه الدراسة هو تسليط الضوء على قدرة بكتيريا حمض اللاكتيك المعزولة من تجويف الفلور المهبليّة وعلى وجه الخصوص العصيات اللبنية وكذلك دراسة الخصائص الكيميائية الحيوية.

تم التعرف على السلالات الـ 21 المعزولة والمنتقاة من مختلف المرضى بولاية تبسة عن طريق الاختبارات المورفولوجية والفسولوجية والكيميائية الحيوية وكذلك تعرض سلالات اللاكتيك لمختلف اختبارات اختيار قوة الكائنات الحية المجهرية. في الواقع، لوحظت قدرات لاصقة كبيرة (كره للماء، والتجميع الذاتي والتجميع المشترك) لغالبية السلالات التي تم اختبارها

وفقًا لنتائج دراسة القدرات التكنولوجية، هناك اختلافات بين السلالات بقدر ما تكون على مستوى نشاط التحميض. ومع ذلك، فإن السلالات لديها ميزات تكنولوجية جيدة. أظهرت نتائج اختبار التصاق الخلايا الظهارية أن سلالاتنا تتمتع بقوة لاصقة ملحوظة للغاية، من خلال النتائج التي تم الحصول عليها، نستنتج أن العصيات اللبنية لها إمكانات بروبيوتيك وتلعب دورًا مهمًا في حماية النظام البيئي المهبلي

الكلمات المفتاحية: الفلور المهبليّة، العصيات اللبنية، بكتيريا حمض اللاكتيك، كره الماء، التجميع الذاتي، البروبيوتيك، التجميع المشترك للنظام الإيكولوجي المهبلي

Liste des Tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire.	12
02	Familles et principaux genres des bactéries lactiques.	13
03	Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques.	23
04	Les différents critères de sélection des probiotiques.	24
05	Les effets bénéfiques des probiotique.	31
06	Pourcentage des différentes espèces qui constituent la flore vaginale saine.	34
07	Facteurs exogènes et endogènes du déséquilibre de la microflore vaginale saine.	36
08	Proposition de critères de sélection des probiotiques à application vaginale.	44
09	Caractérisation des patientes et l'âge de chaque femme.	57
10	Caractéristiques phénotypique (macro-et microscopiques) des isolats lactiques.	60
11	Profils biochimiques des souches isolées.	66
12	Résultats des différentes testes d'identification des souches isolées.	69
13	Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques.	72
14	Les caractéristiques physiologiques des souches isolées.	75
15	Pourcentage d'hydrophobicité des isolats lactique.	77
16	Pourcentages d'auto-agrégation des souches lactique.	78
17	Pourcentage de la co-agrégation entre les souches lactiques vaginales et les souches pathogènes.	80
18	Evolution de pH et de l'acidité (en °D) des isolats testés au cours du temps.	82
19	Adhésion des ferments mixtes et souches pures aux cellules épithéliales	84

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	Arbre phylogénétique consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences du gène 16S rRNA	09
02	Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques.	11
03	La forme Cocci et la forme bacilles des bactéries lactiques observées en microscope électronique à transmission	13
04	Morphologie en microscopie électronique de <i>Pediococcus</i> sp M Photo Sylviane Lemmariner.	14
05	<i>Pediococcus damnosus</i> .	15
06	<i>Leuconostoc lactis</i> observé microscope électronique à transmission (x 10000).	16
07	<i>Oenococcus Oeni</i> observé microscope électronique.	16
08	Bactéries Gram positives <i>W. viridescens</i> sous microscope optique en coloration de Gram à 1000 augmentations.	17
09	<i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i> observé au microscope électronique.	18
10	Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.	20
11	Les mécanismes d'action de probiotiques.	27
12	Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le Traitement des infections entériques.	28
13	Abiotiques des probiotiques.	28
14	Effets bénéfiques sur la santé de la consommation de probiotiques.	29
15	Appareil reproducteur féminin.	32
16	Variation de la muqueuse vaginale au cours de la vie.	36
17	Mécanismes mis en jeu par les lactobacilles vaginaux pour inhiber les pathogènes.	38
18	Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles.	39
19	Modes d'action d'H ₂ O ₂ et ses dérivés sur les pathogènes.	40
20	Mode d'action de peroxydes d'hydrogène et des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes.	40
21	Effets des lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase.	41
22	Mécanisme d'inhibition de la fixation des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion des lactobacilles à l'épithélium vaginal.	42

23	Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par adhésion des lactobacilles à la fibronectine.	43
24	Quelques aspects microscopiques des bactéries lactiques isolées après coloration de Gram (X100) et le résultat des tests de la catalase.	49
25	Différents aspects phénotypiques des bactéries lactiques après mise en culture sur gélose (MRS et M17).	62
26	Résultat du type fermentaire pour les isolats (test production du CO ₂).	63
27	Caractérisation biochimique par la galerie Api 20 de quelques souches.	67
28	Activité antibactérienne des bactéries lactiques par la méthode de spot vis-à-vis des souches pathogènes.	70
29	Résultats des test physiologiques.	73
30	Photo microscopie des cellules épithéliales d'origine animales (cellule épithéliale de poulet).	75

Introduction

Les microbes ont longtemps été mal considérés de par l'impact historique de certains agents infectieux sur le développement des institutions humaines. Des frontières entre nations ont été modifiées suite à des maladies microbiennes. Des agents infectieux ont mis fin à des royaumes et en ont créé d'autres.

Cependant de nombreux microorganismes cohabitent depuis toujours avec l'Homme, et celui-ci les utilise depuis longtemps, parfois sans le savoir. Depuis leur découverte « scientifique » par Pasteur, l'Homme a appris à contrôler les microorganismes pathogènes et à utiliser plus rationnellement ceux qui pouvaient lui être utiles. Les plus connus sont les levures et les bactéries lactiques.

Le terme bactéries lactiques est intimement associé aux bactéries impliquées dans la fermentation des aliments pour l'homme et l'animal. Voilà au moins 4000 ans que l'homme se sert des bactéries lactiques pour la fermentation des aliments. Sans en comprendre les bases scientifiques, l'Homme a utilisé les bactéries lactiques pour produire des aliments fermentés, qui se conservent mieux que la denrée d'origine, et présentant un goût et une texture différents. Une grande variété de produits végétaux ou animaux sont ainsi fermentés par des bactéries lactiques et/ou d'autres microorganismes de type GRAS (« Generally Recognized As Safe »).

Les bactéries lactiques sont aujourd'hui employées sous forme de ferments concentrés dans les industries de fermentation, dont l'une des plus importantes est l'industrie laitière. L'isolement et la sélection des microorganismes de leurs milieux naturels sont parmi les méthodes les plus employées par les microbiologistes pour l'obtention des cultures pures destinées à des fins scientifiques et/ou industrielles.

L'utilisation maîtrisée de ces bactéries dans ces industries nécessite une préalable connaissance de leurs principaux processus métaboliques, de leurs interactions avec les autres microorganismes, et de leurs mécanismes de défense. Une large gamme d'activités métaboliques et propriétés sont recherchées chez ces bactéries pour un usage industriel, telle que l'acidification, la protéolyse, la production de polysaccharides...etc. Ces bactéries sont utilisées en particulier dans l'industrie agroalimentaire car elles jouent un rôle très important dans plusieurs processus tel que le traitement des matières premières, dans la fabrication des additifs alimentaires, et dans d'autres procédés **(Singleton, 2005)**

La recherche sur les bactéries lactiques et leur caractérisation a énormément modifié la fabrication des produits laitiers fermentés ; la capacité de manipuler et de contrôler ces microorganismes a atteint un tel niveau qu'il était inimaginable d'y penser il y a

Introduction

quelques années (**Eijsenk, 2002**). Ces recherches ont permis aux microbiologistes et aux industriels de choisir les meilleures souches et d'améliorer la productivité, la qualité et la sûreté des produits finaux (**Rabah, 2010**).

Plusieurs souches de bactéries lactiques sont utilisées comme des probiotiques, qui confèrent des effets bénéfiques sur la santé humaine. La sélection de ce type de souches est basée sur des critères, parmi, leur capacité à adhérer aux parois vaginales ce qui exclut la concurrence

des agents pathogènes, leur aptitude à l'auto-agrégation et la co-agrégation, ce qui permet de former une barrière qui empêche la colonisation par des pathogènes (**Fuller, 1989 ; Lee et al., 1999**).

Dans certains écosystèmes alimentaires, les bactéries lactiques probiotiques constituent la microflore dominante. Ces organismes sont capables de produire des composés antimicrobiens contre la flore concurrenante, elles colonisent de nombreux produits alimentaires et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (**Hassan et Frank, 2001 ; Parada et al., 2007**). Cependant, le choix de la matrice alimentaire qui va véhiculer ces probiotiques ainsi que la méthode de conservation resteront un terrain d'investigation.

Ce travail comporte deux parties d'investigations complémentaires :

- ✓ Une première partie relative à l'étude bibliographique comprenant trois chapitres dont le premier ; Généralité sur les bactéries lactiques, le second présente des généralités sur les probiotiques et le troisième présente la cavité vaginale.
- ✓ Une deuxième partie expérimentale présentant le matériel utilisé et les méthodes.

En outre, dans cette partie, nous présentons les résultats obtenus et discussions. Enfin une conclusion générale résume les différents résultats obtenus et les perspectives de ce travail.

Partie I : Etude bibliographie

1. Historique ou découverte

Décrites pour la première fois par Orla-Jensen au début du XX^{ème} siècle, les bactéries lactiques sont de très anciens micro-organismes découverts dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années, avant l'apparition de l'oxygène dans l'atmosphère ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie (**Quiberoni et al., 2001**). Elles sont très anciennes et sont apparues avant les cyanobactéries photosynthétiques (**Quiberoni et al., 2001 ; Drider et Prevost, 2009**). Il y a près de 3 milliards d'années (**Tailliez, 2001**). Les bactéries lactiques sont utilisées depuis des millénaires dans l'alimentation humaine (**Penaud, 2006**).

La première culture bactérienne pure sera d'ailleurs une culture de *Bacterium lactis* probablement des *Lactococcus lactis*, obtenue et décrite par Joseph Lister en 1873. Metchnikoff isole en 1904 le « bacille bulgare » (*Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) présent dans le yaourt. Il étudie les propriétés acidifiantes des bactéries du yaourt et il développera l'idée que les bactéries contenues dans les laits fermentés ont un effet bénéfique sur la santé (**Samot, 2012**). Il plaidera en faveur de l'introduction de produits laitiers fermentés dans le régime alimentaire et en 1905, les premières entreprises fabricant du yaourt à partir des souches de l'Institut Pasteur voient le jour (**Penaud, 2006**).

De nos jours Les bactéries lactiques représentent le deuxième plus grand marché de production de biomasse, après les levures. Principalement utilisées lors d'applications dans l'industrie alimentaire, comme la fabrication des fromages, des laits fermentés, de certains légumes et produits carnés fermentés et de certains vins, elles interviennent aussi dans l'industrie chimique pour la production d'acide lactique et de biopolymères et acquièrent, depuis quelques années, un rôle croissant en santé animale et humaine (**Streit, 2008**).

Historiquement, les premiers genres à être décrits sont *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ; les genres ci-après : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* sont considérés comme les principales bactéries lactiques du point de vue technologique (**Guiraud et al., 2003 ; Limsowtin et al., 2004**).

2. Généralité et définition des bactéries lactiques

Les bactéries lactiques sont un grand groupe des micro-organismes non pathogènes, unicellulaire procaryotes, hétérotrophes et chimio-organotrophes. Elles peuvent avoir différentes formes : sphériques (coques/genre *Streptococcus* et *Lactococcus*...), en bâtonnets (bacilles/genres *Lactobacillus*) ou encore ovoïdes (*Leuconostoc* *ssp.*) (Luquet et corrieu, 2005 ; Galvez et al., 2011).

Ce sont des bactéries à Gram positif dont le teneur en guanine et cytosine (G+C) est inférieur à 50%. Elles sont non pigmentées, généralement immobiles et non sporulantes, dépourvues de catalase (certaines souches possédant une pseudo-catalase) et d'oxydase, aéro anaérobie facultative ou micro-aérophiles, à métabolisme fermentaire strict, acido-tolérantes et capables de croître à des températures comprises entre 10°C et 45°C et à des pH allant de 4,0 à 5,5 (Corrieu et luquet, 2008 ; Galvez et al., 2011).

Ces bactéries exigeantes ne possèdent pas de cycle de Krebs, ni de cytochromes, ni nitrate réductase, ni porphyrines (composants de la chaîne respiratoire). (Abid, 2015 ; Adeyemo et al., 2017).

L'acidité produite par les bactéries lactiques joue un rôle dans la conservation de l'aliment en inhibant la croissance de très nombreuses bactéries pathogènes (Ait abdelouaheb, 2001).

Les nombreux genres et espèces qui constituent ce groupe présentent une grande diversité de caractéristiques physiologiques. Cela se traduit par l'existence entre genres, espèces et au sein des espèces, de nombreuses souches possédant des propriétés technologiques différentes (Salminen et al., 2004 ; Fröhlich et könig, 2009 ; Pringsulaka et al., 2011).

Les bactéries lactiques colonisent de nombreux produits alimentaires comme les produits laitiers, la viande, les végétaux et les céréales et font partie de la flore intestinale et vaginale humaine ou animale (Dortu et thonart, 2009). Les bactéries lactiques ont la réputation d'avoir des exigences nutritionnelles nombreuses et complexes rendent parfois leur culture fastidieuse en laboratoire.

Elles ont en général une faible capacité de biosynthèse et de nombreuses auxotrophies ont été décrites en ce qui concerne acides aminés, peptides, vitamine, sels, acides gras, bases purique ou pyrimidique et les glucides fermentescibles et cofacteurs (Dellaglio et al., 1994).

3.Habitat

Les bactéries lactiques sont des micro-organismes ubiquitaires, et on les trouve dans différentes niches écologiques comme les végétaux (les plantes et les fruits intacts ou en décomposition), le lait et les produits laitiers, les viandes et les poissons fermentés, l'eau et les eaux usées, les jus, l'ensilage et les cavités (buccale, génitale, intestinale et respiratoire) de l'homme et des animaux (**Drouault et corthier, 2001**) (**Jean louis, 2007**).

4.Taxonomie et caractère distinctifs

La taxonomie a longtemps reposé sur les critères morphologiques et biochimiques permettant de différencier les espèces et de caractériser des variants au sein d'une même espèce. Ces tests sont :

- Le type de gram, la morphologie et la disposition cellulaire.
- Les différents métabolismes glucidiques, protéiques, lipidiques, le caractère fermentaire.
- La croissance des cellules sur des milieux hostiles.

4.1. Caractères morphologiques

L'étude de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire dans l'identification des bactéries auxquelles nous nous intéressons. La détermination de la morphologie comporte deux aspects : macroscopique et microscopique.

➤ **Macroscopique** : concerne essentiellement les caractéristiques des colonies après cultures sur milieux solides. Chez les bactéries lactiques, ces colonies sont de formes circulaires, à contour régulier, à surface lisse, de couleur blanche avec un aspect laiteux. Leur diamètre est compris entre 0,5 et 1,5mm.

➤ **Microscopique** : l'observation microscopique des bactéries lactiques après coloration simple ou différentielle révèle deux formes majeures coques (0,5 à 2 μm de diamètre) ou bâtonnets (0,5 à 2 μm de diamètre ; 1 à plus de 10 μm de long) (**Dellaglio et al., 1994**). Elles sont toutes à Gram positif et généralement immobiles. Leur mode d'association est très hétérogène (cellules isolées, paires, tétrades, amas irréguliers, longues ou courtes chaînettes) mais spécifique à chaque genre bactérien.

4.1.1. Caractères biochimiques et physiologiques

Les bactéries lactiques sont caractérisées par un ensemble de traits biochimiques et physiologiques communs qui leur sont propres et permettent ainsi de les distinguer des autres groupes bactériens.

Ces bactéries ne possèdent pas de voies fonctionnelles pour la synthèse de l'hème (**Bolotin et al., 2001 ; Duwat et al., 2001 ; Miyoshi et al., 2003**), c'est pour cette raison qu'elles sont habituellement considérées comme déficientes pour l'activité catalase héminique dont le substrat est le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Par contre, si de l'hémine est incluse dans le milieu qui est incubé en aérobiose, certaines bactéries lactiques (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides* ou *Pediococcus acidilactici*) développent une activité catalase. Par ailleurs, la majorité des bactéries lactiques sont pourvues d'une pseudo catalase à manganèse appelée aussi superoxyde dismutase (SODs) dont les substrats sont les radicaux libres O₂ (**Desmazeaud, 1983**). Cette enzyme est codée par le gène *soda* (**Bolotin et al., 2001 ; Miyoshi et al., 2003**). En outre, les bactéries lactiques ne liquéfient pas la gélatine et ne produisent pas d'indole ni d'hydrogène sulfureux. Elles sont asporulantes, ne se développent pas en présence de 6.5 % de NaCl, ou lorsque le pH est supérieur à 9.6 (**Dellaglio et al., 1994**).

4.2. Caractère moléculaire

La classification moderne des bactéries lactiques est basée sur l'analyse des protéines et des acides nucléiques. Le ribotypage et l'ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) (**Grimont et Grimont, 1986 ; Gurtler et al., 1991**) sont des approches moléculaires qui ciblent l'étude de l'opéron ribosomique « *rrn* » dont l'organisation génétique « ARNr 16S - ARNr 23S - ARNr 5S » est similaire à celles décrites généralement chez les Eubactéries. Néanmoins, le nombre de copies de l'opéron *rrn* est variable ; ainsi, six copies sont identifiées chez l'espèce *Lactococcus lactis* (**Le Bourgeois et al., 1995**). Le gène qui code pour l'ARNr 16S (*rrs*) possède l'ensemble des propriétés requises pour servir d'outil couvrant tous les niveaux taxonomiques, du règne à l'espèce et dans certains cas, à la sous espèce.

Ce gène *rrs* représente l'outil de choix pour les études phylogénétiques car il est constitué de régions variables qui présentent la particularité d'être composées de domaines conservés flanquant des domaines plus variables entre espèces bactériennes. Au sein d'une même espèce, les régions variables de l'ADNE 16S d'une zone codante sont généralement conservées. Ainsi, les régions variables VT à V3 de l'ARNr 16S sont spécifiques à l'espèce. Un pourcentage d'identité supérieur à 57% intra espèce de l'ARNr 16S étudiée et celles contenues dans les banques de données permet de décrire (**Goebel et Stackebrandt, 1994**).

Ces analyses ont significativement changé la taxonomie de ces bactéries. Selon plusieurs travaux de phylogénie (**Stiles et holzapfel, 1997 ; klein et al., 1998 ; Axelsson, 1998**), les bactéries lactiques appartiennent au phylum des Firmicutes, classe des *Bocilli*, ordre des *Lactobacillales*. Dans cet ordre, les gènes orthologues couvrent en moyenne 86% de l'ensemble des génomes bactériens (**Makarova et koonin, 2007**) ce qui explique d'ailleurs leur évolution. L'ordre de Lactobacillale regroupe six familles (*Aerococcaceae, Carnabacteriaceae, Enterococcaceae, Lactobacillaceae, Leucocaceae et Streptococcaceae*), formées de plusieurs genres dont 15 seulement forment le groupe lactique (*Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Enterococcus, Denococcus, Lactobacillus, Carnobacterium, Weissella, Aerococeus, Allolcoccus, Dolosigranulum, Globicatella, Terragenococcus et Vogococcus*) (**Holzappel et al., 2001**). Il faut noter que seulement les neuf premiers genres sont utilisés à grande échelle dans l'industrie alimentaire et sont répertoriés comme microorganismes GRAS (Generally Recorded As Safe) Avoir fes travaux plus récents (**Ennahar et al., 2003; kakarova et koonin, 2007**), 15 nouveaux genres sont inclus dans le groupe lactique (*Abiotrophia, Dolosicocus, Ermococcus, Faklamia, ignavigranum, Alkalibacterium, Allofustis, Atopobacter, Paralactobacillus, Oscillospira*) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy>).

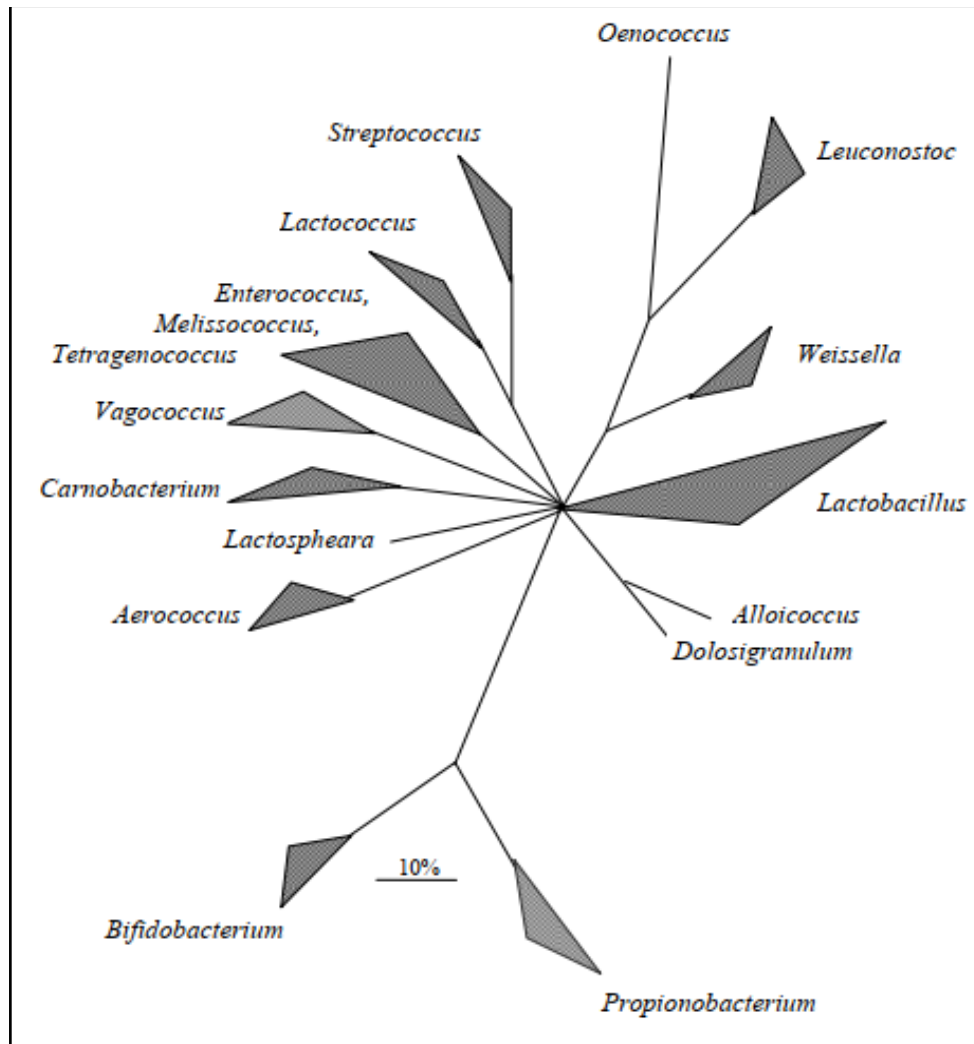


Figure 01 : Arbre phylogénétique consensus, basé sur l'analyse comparative des séquences du gène 16S rRNA, montrant la majorité de groupe phylogénétique des bactéries lactiques à faible pourcentage molaire dans leurs ADN en Guanine et Cytosine (mol% G+C) et les genres Gram positif non reliés *Bifidobacterium* et *Propionibacterium* (Holzapfel et al., 2000).

4.1.3. Caractères immunologiques

Les bactéries lactiques peuvent être sensibles à leurs propres substances de défense comme la bactériocine, elles se prémunissent à l'aide d'une protéine qualifiée « d'immunité ». C'est une lipoprotéine d'immunité codée par le gène LanI : Cette protéine s'attache à la surface externe de la membrane et interagit avec la bactériocine afin d'empêcher son insertion dans la membrane et ainsi former des pores. La structure de ces protéines est très variable (Dortu, 2008 ; Mameche, 2008).

4.2. Taxonomie

La classification phénotypique des bactéries lactiques est fondée sur la morphologie, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la croissance à différentes températures, le mode de fermentation des sucres, la capacité de croissance à différentes concentrations de sel, la tolérance aux pH acides et alcalins, la configuration de l'acide lactique, l'hydrolyse de l'arginine et la formation d'acétone. Néanmoins, ces méthodes conventionnelles ont leurs limites, notamment dans le cas de variations du phénotype par la présence ou l'absence d'un plasmide codant pour des fonctions métaboliques. Par conséquent, les méthodes moléculaires s'avèrent indispensables car elles sont plus fiables pour une classification couvrant des niveaux d'identification allant de la famille à l'espèce. De plus, les informations obtenues avec les méthodes moléculaires sont utiles pour le concept de phylogénie (**Zakhia et lajudie, 2006**).

5. Métabolisme fermentaire

Les bactéries lactiques sont un groupe hétérogène de microorganismes produisant de l'acide lactique comme produit principal du métabolisme fermentaire, ne possèdent pas de système respiratoire fonctionnel. Avec les hexoses, il existe deux voies de fermentation basiques.

La voie homofermentaire : est constituée de la voie de la glycolyse (également appelée voie d'Embden-Meyerhof) : l'acide lactique est le seul produit de la fermentation du glucose (deux molécules de lactate par molécule de glucose).

La voie hétérofermentaire facultatif : la fermentation du glucose aboutit à la formation d'acide lactique ou de l'acide lactique et de l'acide acétique

La voie hétérofermentaire strict : (également appelée voie des pentoses phosphocétolase, ou voie des 6- phosphogluconates) : elles produisent, en plus de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'éthanol et des quantités importante du CO₂ (**Sayadogo, 2004**).

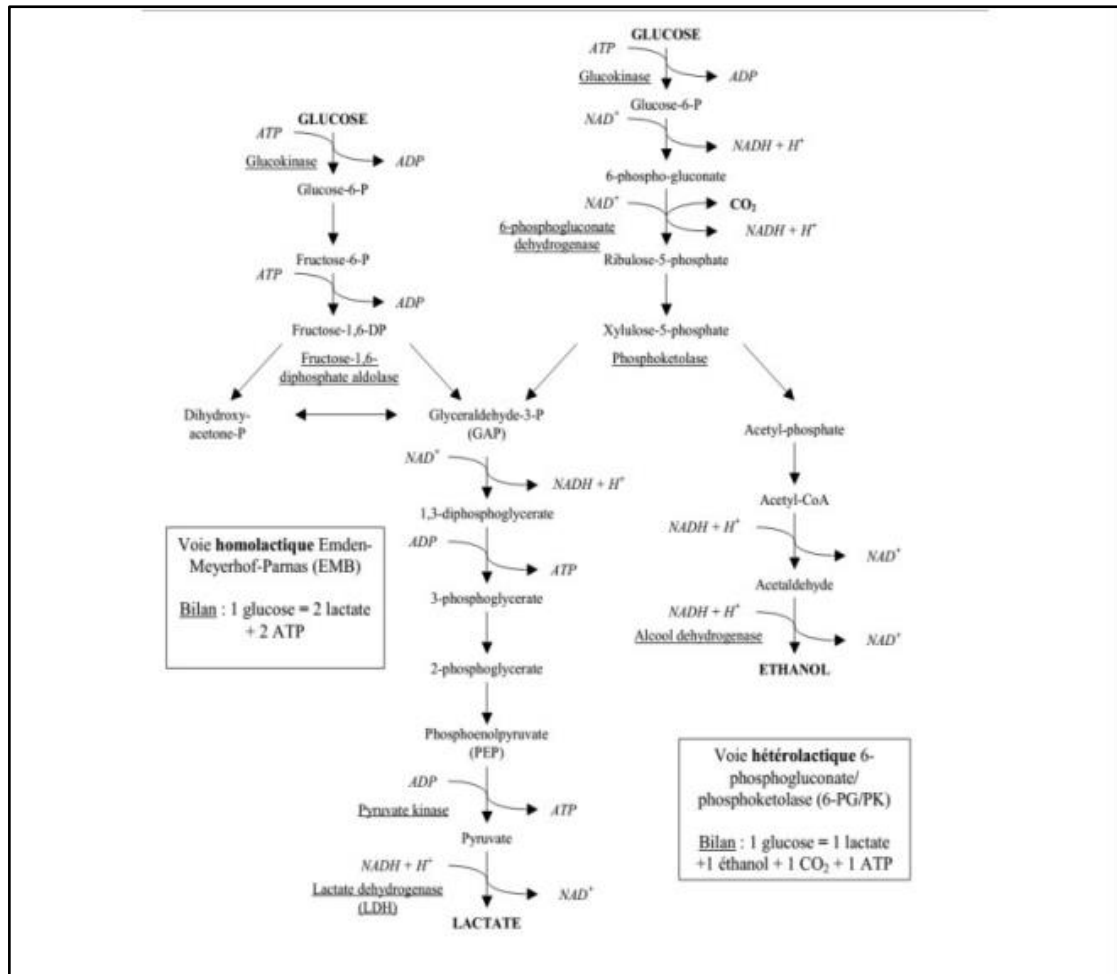


Figure 02 : Principales voies cataboliques du glucose chez les bactéries lactiques (Dellaglio et al., 1994)

Le genre *Lactobacillus* a été subdivisé par ORLA-JENSEN en trois groupes et cette classification est encore utilisée en milieu industriel (Tamime, 2002 ; Guiraud et rosec, 2004).

- Groupe I « *Thermobacterium* » comprend les *lactobacilles* homofermentaires thermophiles qui se développent à 45°C mais pas à 15°.
- Groupe II « *Streptobacterium* » regroupe les *lactobacilles* homofermentaires mésophiles et peuvent être occasionnellement hétérofermentaires en fonction du substrat.
- Groupe III « *Betabacterium* » ce sont des *lactobacilles* hétérofermentaires.

Tableau 01 : Classification des lactobacilles selon les paramètres métaboliques et du type fermentaire (Haydersah, 2010)

	I Homofermentative		II Heterofermentative	
Glucose fermented to lactic acid	≥ 85%		50%	
Formation of CO ₂ , acetic acid and ethanol	-		+	
CO ₂ formed from glucose	-		+	
Thiamine required for growth	-		+	
Fructose di-phosphate aldolase present	+		-	
Orla-Jensen, 1919	"Thermobacterium"	"Streptobacterium"	"Betabacterium"	
	Obligate homofermentative	Facultative Obligate heterofermentative	heterofermentative	
Rogosa, 1970	IA	IB	II	
Growth at 45°C	+	d		
Growth at 15°C	-	d		
Ribose fermented	-	+	+	
CO ₂ from gluconate	-	+	+	
Rogosa, 1974			II	III
Acidophilic			-	+
Ethanol tolerant			-	+
Most carbohydrates fermented			+	-
Sharpe, 1979			IIA	IIIB
Aerobic species	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>	<i>L. fructivorans</i>
	<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. coryniformis</i>	<i>L. buchneri</i>	<i>L. hilgardii</i>
	<i>L. helveticus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. confusus</i>	
	<i>L. jensenii</i>	<i>L. homohiochii</i>	<i>L. fermentum</i>	
	<i>L. salivarius</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. viridescens</i>	
Anaerobic species	<i>L. ruminis</i>	<i>L. yamanshiensis</i>		
	<i>L. vitulinus</i>			
Kandler and Weiss, 1986	Group I	Group II	Group III	
Hexose almost exclusively to lactic acid	+	+	-	
Hexose fermented to lactic-, acetic acid, ethanol, CO ₂	-	-	+	
Lactic-, acetic-, formic acid, ethanol under glucose limitation	-	d	+	
Pentose phosphoketolase	-	+	+	
Gluconate fermented	-	+	+	

6. Les différents genres

La classification actuelle des bactéries lactiques fait apparaître douze genres qui incluent dans le tableau suivante 02

Tableau 02 : Familles et principaux genres des bactéries lactiques (Leonard,2013)

Familles	Principaux genres
<i>Lactobacillaceae</i>	<i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Pediococcus</i> sp
<i>Leuconostocaceae</i>	<i>Leuconostoc</i> sp., <i>Oenococcus</i> sp., <i>Weissella</i> sp
<i>Streptococcaceae</i>	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactococcus</i> sp
<i>Carnobactériacea</i>	<i>Carnobacterium</i> sp
<i>Entérococcaceae</i>	<i>Enterococcus</i> sp., <i>Tetragenococcus</i> sp., <i>Vagococcus</i>
<i>Aerococcaceae</i>	<i>Aerococcus</i> sp

6.1. Le genre *Lactobacillus*

Principale groupe de la famille *Lactobacillaceae*. Les *Lactobacilles* représentent un genre important des bactéries lactique tant au niveau industriel qu'au niveau de la flore commensale infantile. Les membres de ce genre sont généralement en forme de bâtonnets (bacilles fins et allongés, parfois incurvés) organisés en chaînette, bien que des *cocobacilles* ou coroniformes. Elles sont immobiles à l'exception de certaines souches qui sont mobiles grâce aux flagelles péritriches (De vos et al., 2009), dépourvus de catalase et de cytochrome (Khalid et marth, 1990 ; Leclerc et al., 1994). Les lactobacilles ont des exigences nutritionnelles très complexes en acide aminés, vitamine, acide gras, nucléotide, glucides et en sels minéraux. Elles se développent à une température située entre 30 et 40°C. (Wilson et al. 2008). Le milieu de culture favorable pour leur croissance est le milieu MRS avec un pH 6.2.

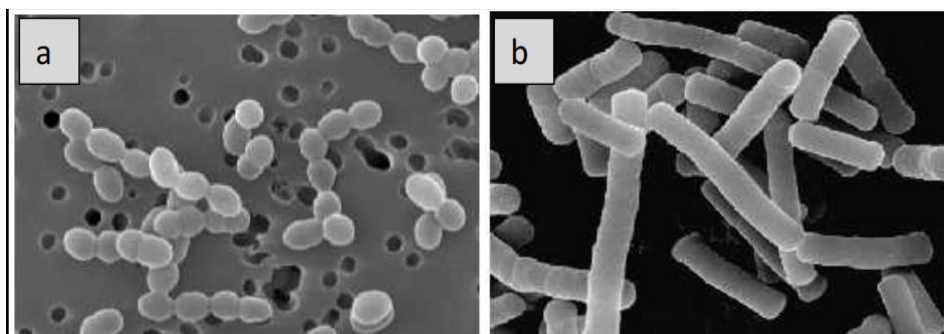


Figure 02 : (a) la forme Cocci, (b) la forme bacille des bactéries lactiques observé au Microscope électronique à transmission (Makhloufi, 2012).

L'hétérogénéité des espèces est illustrée par le contenu en G + C qui peut varier de 32 à 53 % (Schleifer et Stackebrandt, 1983 ; Pilet m-f. et al., 2005).

6.2. Le genre *Pediococcus*

Les espèces genre *Pediococcus* sont mésophiles leur métabolisme est homofermentaire, ne produisent pas de CO_2 à partir du glucose, le plus souvent incapables d'utiliser le lactose, et leur développement nécessite la présence de divers facteurs de croissance. Poussant à un pH de 5 mais ne poussant pas à 9. Leur température optimale de croissance varie de 25°C à 35°C. Ils ne sont pas en mesure de réduire le nitrate (Holzapfel et al 2009 ; Lahtinem et al, 2012).

Actuellement, le genre *Pediococcus* comprend 11 espèces : *P. acidilactici*, *P. argentinicus*, *P. cellicola*, *P. clausenii*, *P. damnosus*, *P. ethanolidurans*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, *P. siamensis* et *P. stilesii* (Zhang et cai, 2014).

Ils possèdent un pourcentage en G+C de l'ADN compris entre 35 et 44%, Certaines espèces se distinguent par leur capacité à se développer à des teneurs en sels très élevées, comme *Pediococcus halophilus*, renommé *Tetragenococcus halophilus* et *Tetragenococcus muriaticus* qui tolère jusqu'à 18% de NaCl (Pilet et al., 2005).

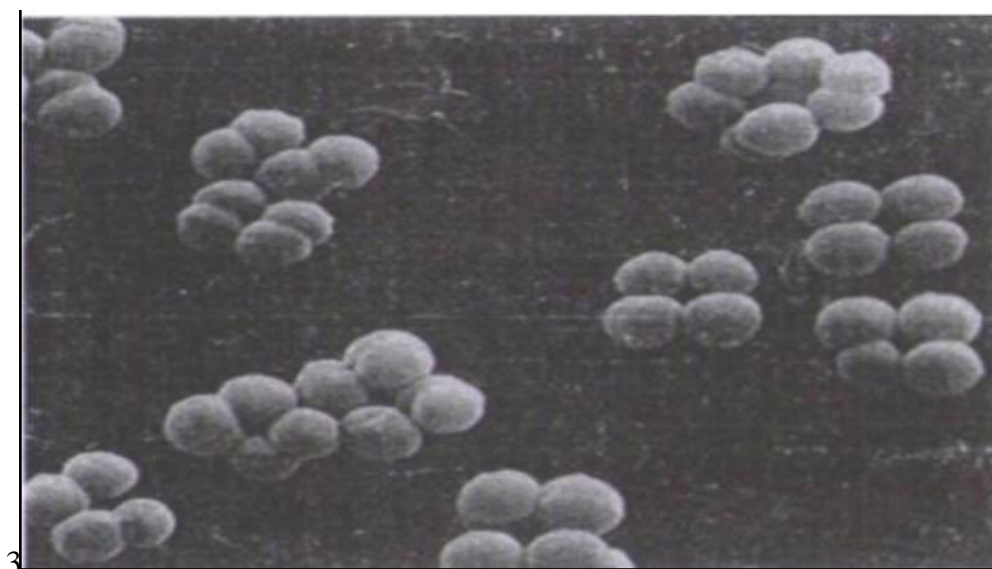


Figure 03 : Morphologie en microscopie électronique de *Pediococcus sp M*
Photo Sylviane Lemmariner (Université de Caen).

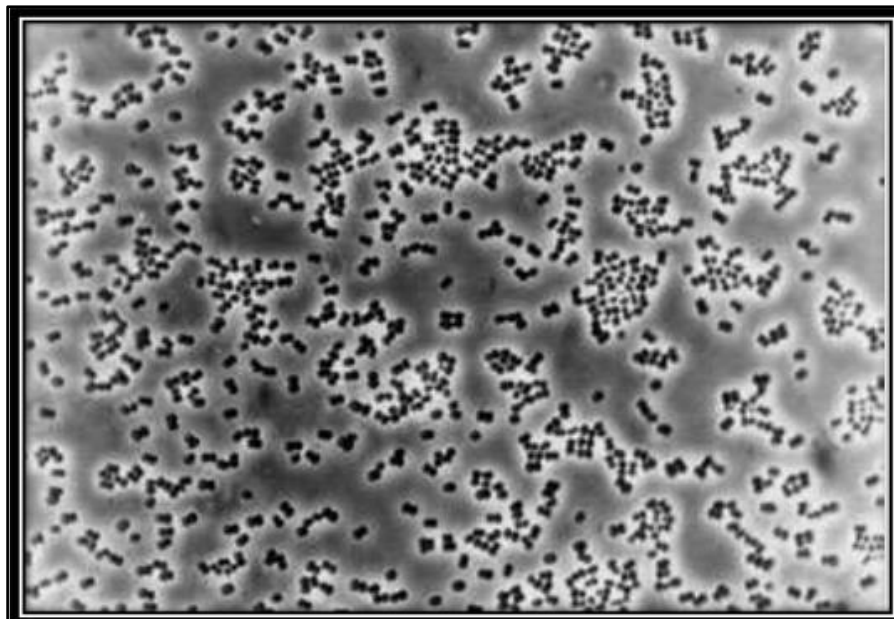


Figure 04 : *Pediococcus damnosus* (Holzapfel et al. 2009).

6.3. Le genre *Leuconostoc*

Leuconostoc fait partie de la famille des *Leuconostocaceae* qui rassemble deux autres genres (*Weissella* et *Oenococcus*).

Les cellules de *Leuconostoc* sont des coques en paires ou en chaînette mésophiles, qui possèdent un caractère hétérofermentaire marqué, avec production de l'acide lactique (isomère D), de CO₂ et d'éthanol après la fermentation de glucose. Les caractéristiques telles que l'hydrolyse de l'esculine, la formation de dextrans (α , 1-6 glucanes); un composé capsulaire synthétisé pendant la fermentation de saccharose, un disaccharide composé de glucose et de fructose, les conditions de croissance (toujours lente), la capacité à croître à différents pH (6 et 7, Certaines peuvent croître à pH de 4.5) et différentes températures (température optimale de croissance se situe entre 20°C et 30°C mais Certaines sont capables croître à 5), l'assimilation de citrate et/ou malate permettent la différenciation entre les genres *Leuconostoc* et *Weissella* (Pilet et al., 1998; Ho et al., 2007). Elles sont généralement capsulées, cette propriété entraîne fréquemment l'apparition d'une viscosité dans leur milieu de culture. Les *Leuconostoc* sont utiles dans la fabrication de certains fromages où ils facilitent l'ouverture de la pâte par la production de CO (Perry et al., 2004). Ce genre comprend plusieurs espèces comme : *Ln. mexenteroides*, *Ln. desetranicum*, *Ln. amelibiosum*, *In argentinum* et *Ln cremoris* (Corricu et al, 2008).

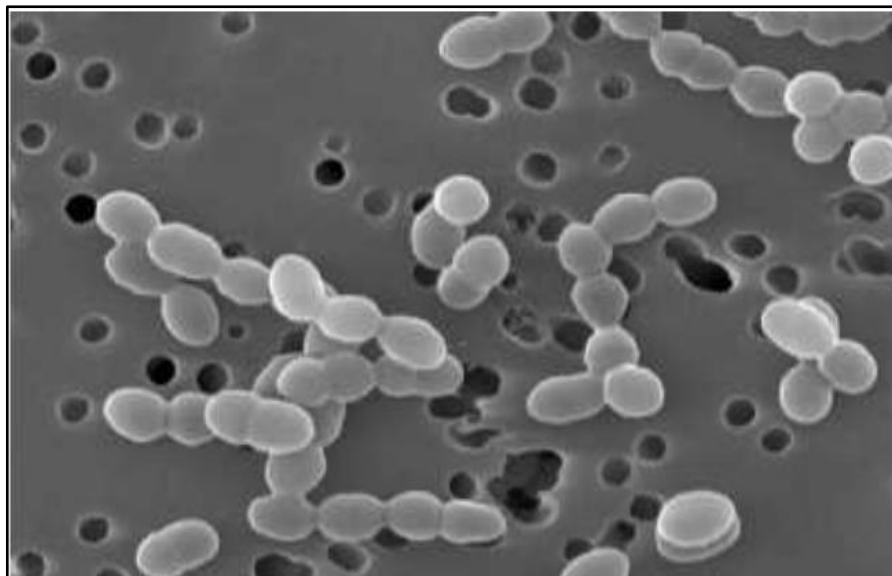


Figure 05 : *Leuconostoc lactis* observé microscope électronique à transmission (x 10000). (Bouadjaib, 2013).

6.3.1. Le genre *Oenococcus*

Ce sont des bactéries immobiles, asporulées de forme ellipsoïdale à sphérique, avec un arrangement en paires ou en chaînes, non hémolytiques et généralement non protéolytiques. Elles exigent un milieu riche en acides aminés et en facteurs de croissance. Leur température optimale est de 20°C à 30°C, acidophiles poussant à un pH initial de 4,8. Elles ont pour habitat le vin : par conséquent elles tolèrent l'éthanol et se développent dans des milieux contenant 10% d'éthanol (Bjorkroth et Holzappel: 2006, Zhang et Cai., 2014).



Figure 06 : *Oenococcus Oeni* observé microscope électronique (Wikipédia).

6.3.2. Le genre *Weissella*

Les cellules de ce genre sont ovoïdes ou de courts bâtonnets à extrémités rondes qui s'associent en paires ou en courtes chaînes. Elles sont hétérofermentaires et sont

généralement immobiles, non sporulés. La température optimale de croissance est de 15°C, mais quelques espèces peuvent croître entre 42°C et 4°C (Lahtinen et al. 2012 ; Bjorkroth et Holzappel, 2006).

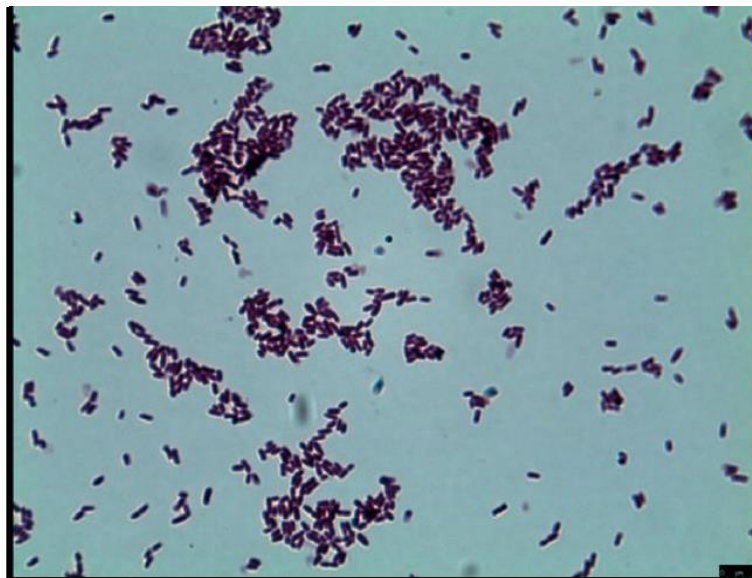


Figure 07 : Bactéries Gram positives *W. viridescens* sous microscope optique en coloration de Gram à 1000 augmentations (Wikipédia).

6.4. Le genre *Lactococcus*

Les cellules de *Lactococcus* sont sphériques ou ovoïdes, isolées, en paires ou en chaînes. Elles sont non hémolytiques, aéro-anaérobies facultatives à micro-aérophile. Elles sont toutes mésophiles, la température optimale de croissance varie de (10 à 40°C), certaines peuvent croître à une température inférieure à 7°C après une incubation de 10 à 14 jours. Elles se développent, généralement, à 4% d'NaCl à l'exception de *Lc. lactis* subsp. *cremoris* qui tolère seulement 2% de sel. Les *lactococci* sont des bactéries homofermentaires qui produisent de l'acide lactique L (+) à partir de glucose. Ils croissent bien à des valeurs proches de la neutralité dans les milieux tamponnés, mais ils s'arrêtent de croître lorsque le pH atteint 4.5 (Zhang et Cai, 2014).

Ils jouent un rôle irremplaçable en assurant le développement de la structure et du goût. Ils peuvent également être utilisés dans la conservation de charcuteries, de fruits, de légumes et de céréales (Dellaligo et al, 1994).



Figure 08 : *Lactococcus lactis* subsp *lactis* observé au microscope électronique (Pot, 2008).

7. Domaine d'utilisation des bactéries lactique

Grâce à leurs effets bénéfiques, les bactéries lactiques sont utilisées dans plusieurs secteurs d'activités, notamment dans le domaine de l'agriculture, de la santé et de l'industrie agroalimentaire.

Dans le domaine de l'agriculture, les bactéries lactiques sont utilisées comme agents biologiques de conservation du fourrage par fermentation acidifiante. L'utilisation des bactéries lactiques dans les ensilages, permet de limiter ou d'inhiber certaines voies métaboliques indésirables telles que l'acétogénèse et la protéolyse, conduisant à l'amélioration de la qualité nutritive du fourrage. Ainsi, on a pu observer chez le bétail une augmentation de 5 à 11 % des performances zootechniques telles que la digestibilité, le gain de poids ou la production laitière (Salawu et al, 2001 ; Khuntia et Chaudhary, 2002). L'étiologie des effets bénéfiques engendrés par les souches lactiques dans les ensilages reste encore très peu élucidée mais des équipes suggèrent un effet probiotique affectant favorablement l'écosystème et le pH ruminal (Weinberg et al, 2004 ; Gollop et al, 2005).

Dans le domaine de la santé, certaines bactéries lactiques spécifiques sont utilisées comme probiotiques c'est-à-dire des micro-organismes vivants dont l'application à l'homme ou à l'animal exercent un effet bénéfique sur ce dernier par amélioration des propriétés de la flore intestinale. Les espèces couramment utilisées sont *Lb.*

Acidophilus, *Lb. Casei*, *Lb. johnsonii*, *Lb. reuteri*, *Lb. delbruecki*, *sub sp bulgaricus* (**Salminen et al, 2004**). Les souches lactiques sont également utilisées dans le traitement de certaines affections telles que les diarrhées, les allergies alimentaires, l'intolérance au lactose et l'hypercholestérolémie.

Enfin en industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont employées pour aider à la fois à la fabrication et à la conservation des produits à partir de certaines matières premières telles que le lait, la viande, le poisson, les végétaux et les céréales. Eu égard à leur pouvoir acidifiant, leur capacité à améliorer la flaveur et la texture des aliments, les bactéries lactiques sont de loin des agents d'amélioration de la qualité organoleptique des aliments (**Bigret, 1989**).

Dans les produits laitiers, ces micro-organismes assurent plusieurs fonctions telles que la coagulation du lait, la formation des composés aromatiques, la protéolyse pour donner aux fromages leurs caractères rhéologiques et la production d'agents épaississants pour améliorer la texture du fromage. Pour optimiser les caractéristiques organoleptiques du lait, les bactéries lactiques sont souvent utilisées on association, C'est le cas de *Streptococcus thermophilus* et *Lb delbrueckil ssp. Bulgaricus*, utilisées dans la fabrication du yoghourt. Dans les produits carnés, les bactéries lactiques améliorent la qualité hygiénique et marchande en réduisant d'avantage les risques de croissance de microorganismes indésirables. Les bactéries lactiques favorisent en outre, l'accélération du processus de maturation et assurent une meilleure conservation de ces produits.

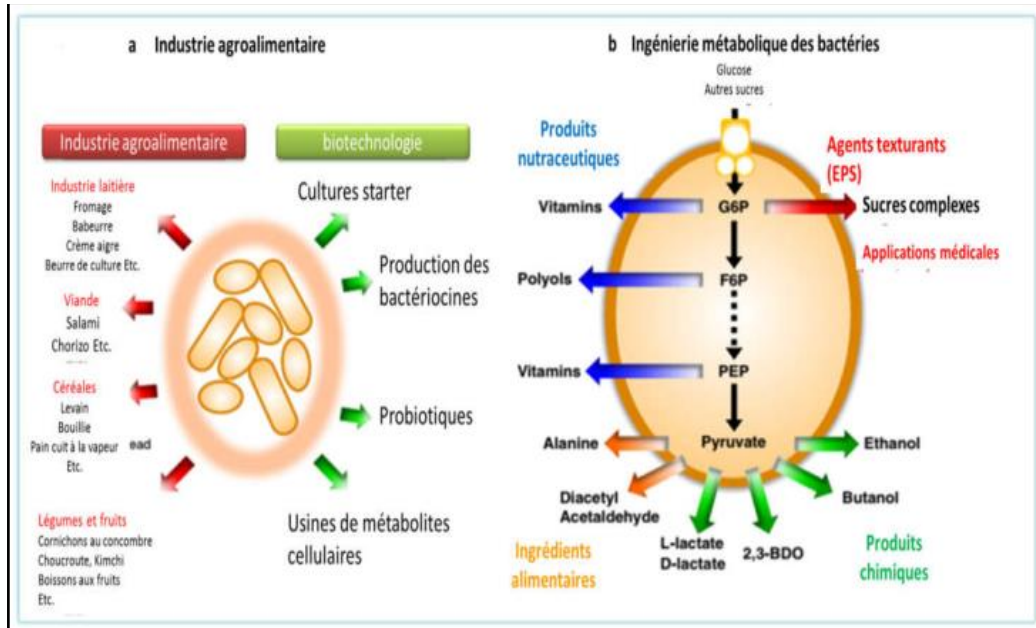


Figure 09 : Applications des bactéries lactiques dans (a) les industries agroalimentaires et (b) la biotechnologie.

Abréviations : G6P, glucose 6-phosphate ; F6P, fructose 6-phosphate, et PEP, phosphoénolpyruvate.

1. Historique

Le concept de 'probiotique' a pour la première fois été établi au début du XXe siècle grâce aux recherches d'Elie Metchnikoff (**Metchnikoff, 1907**). Il est l'un des premiers scientifiques à s'intéresser aux cultures lactiques. En 1908 Metchnikoff reçut le prix Nobel suggérant que la bonne santé est longévité des paysans bulgares dues à leur consommation de différents produits laitiers fermentés. Pour ses travaux entre les bactéries intestinales et le système immunitaire diminuait la « putréfaction » et les activités toxiques microbiennes. Ainsi proposé l'ingestion de bactéries lactiques pour réduire les désordres intestinaux et améliorer l'hygiène digestive, Avant ces humeurs, publié (la prolongation de la vie) qui a décrivaient la relation entre intestine humaine et les habitudes alimentaires. Il a conclu grâce à notre apport alimentaire en modifiant la flore intestinale humaine simplement. Il proposa une théorie selon laquelle le mécanisme « d'auto-intoxication » intestinal des bactéries autochtones pouvait être modulé par l'ingestion de bactéries (**Metchnikoff, 1907**). Établit alors un régime alimentaire à base de lait fermenté afin de modifier la flore du colon humain.

Le terme probiotique est introduit par Werner Kollath par opposition aux antibiotiques (**Mermouri, 2018**) Sa première définition en 1965 par Stillwell et Lilly (**Lilly et Stillwell, 1965**) pour décrire les substances produites par un microorganisme et par la stimulation de croissance d'autres microorganismes. En 1991, Fuller redéfinit les probiotiques comme étant des préparations microbiennes vivantes utilisées comme additif alimentaire et qui ont une action bénéfique sur l'hôte en améliorant la digestion et l'hygiène intestinale (**Fuller, 1991**). Aujourd'hui, selon la définition adoptée par le groupe de travail mixte formé par l'Organisation des Nations Unies (ONU) pour l'agriculture et l'alimentation et l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS) (**Rapport FAO/OMS, 2002**).

2. Définition

Le terme « probiotiques » fut introduit dans la littérature en 1965 (pro : qui est positif et bios : vie, en opposition à antibiotiques (**Larguèche, 2012**)). Les probiotiques sont actuellement définis comme des « microorganismes vivants (bactéries ou levures) ajoutés aux produits alimentaires comme les yaourts lorsqu'ils sont consommés en quantités adéquates, ont un effet bénéfique sur la santé de l'hôte » (**FAO/OMS, 2001**).

Ce sont des acteurs incontournables de développement et d'innovation dans les domaines des industries alimentaires et médicales. Ces microorganismes, généralement des bactéries, influencent la santé humaine et animale et protègent par exemple de certaines infections intestinales, participent à la digestion et influencent le système immunitaire.

La souche probiotique utilisée, son conditionnement (poudre, yaourt, boisson, crème de la peau) et son mode d'administration, et aussi pour la dose. L'adéquation entre les tests in vitro et in vivo doit être démontrée en termes de prédictibilité. Ils peuvent être présents ou introduits dans certains aliments (compléments alimentaires) ou dans certains médicaments (Laffargue,2015).

Les Principaux microorganismes probiotiques connus sont des bactéries lactique (*Lactobacilles*, *Bifidobactéries*, et *entérocoques*) et des levures (*Saccharomyces boulardii*) (Ouwehand et al., 2002). Les probiotiques sont disponibles sur le marché sous forme de produits ou suppléments alimentaires, ou encore de produits pharmaceutiques. L'intérêt de certaines souches probiotiques est soutenu par de nombreuses publications scientifiques, souvent d'excellente qualité, mettant en avant leurs effets bénéfiques pour l'hôte, notamment sur les fonctions immunologiques, digestives, métaboliques, respiratoires et même psychologiques. Les probiotiques peuvent, en effet, contribuer à limiter le développement de certaines maladies telles que les allergies, le syndrome du côlon irritable, les diarrhées, certaines infections et maladies auto-immunes, l'obésité ou le diabète type 2(Senderset al, 2013).

3.Classification des probiotiques

Les probiotiques sont présents naturellement dans notre corps, et dans notre alimentation, Il existe en effet différentes souches de probiotiques qu'il est possible de renforcer en fonction des symptômes de chaque personne. Il est d'en prendre sous la forme de compléments alimentaires

3.1. Les bactéries lactiques

En à trois genres :

- **La Première : Genre *Lactobacillus***
- **La deuxième : *Streptococcus***
- **Le Troisième : *Bifidobacterium***

3.2. Les bactéries non lactiques

Il s'agit notamment de la souche *Escherichia coli* Nissle 1917 et de bactéries sporulées dont *Bacillus subtilis*, au Phylum des Firmicutes est retrouvé au sein de la Classe des

Bacilli l'ordre des Bacillales, famille des **Bacillaceæ** (**The universalproteinpesource. bacillus. uniProt.**<http://www.uniprot.org/taxonomy/1386>).

3.3 Les levures Classe des *Saccharomycotina*

Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques (**Bernier, 2010**).

Tableaux 03 : Principales espèces microbiennes utilisées comme probiotiques (**Bernier, 2010**).

Genre	Espèce
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. Casei</i> <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. reuterii</i> , <i>L. Plantarum</i> <i>L. Sporogenes</i>
<i>Bifidobactérium</i>	<i>Bifidobacterium B. longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus</i> <i>L. cremoris</i> , <i>L. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus</i> <i>E. faecium</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i> <i>S. thermophilus</i>
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus</i> <i>P. acidilactici</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus B. subtilis</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. clausii</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. pumilus</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyce S. cerevisiae</i> <i>S. cerevisiae var boulandi</i>

4. Les différents critères de sélection des souches probiotiques

L'étude pharmacologique a trois objectifs : décrire leur pharmacocinétique jusqu'aux cibles, identification des constituant actif de micro-organismes en transit, démontrer les effets spécifiques bénéfiques ou néfastes (Marteau et seksik, 2005)

La sélectionnées des souches probiotiques nécessite certaines propriétés quelques soi fonctionnelles, sécuritaires ou bien technologiques (FAO/OMS, 2001 ; FAO/OMS, 2002 ; Tannock, 2003 ; WGO, 2008 ; Vasiljevic et shah, 2008). Donc Les différents critères de sélection sont :

Tableaux 04 : Les différents critères de sélection des probiotiques.

<p>Critères fonctionnels</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Tolérance à enzymes gastriques et aux acidités. - Tolérance à enzymes digestives et aux le bilan. - Production de substances antimicrobiennes et antagonisme vis-à-vis des pathogènes. - Effets sur la santé documentés. -Immun modulation.
<p>Critères de sécurités</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Souche pour l'usage humain d'origine humaine (Isolée du tractus intestinal d'un homme sain) ou alimentaire. -Une Souche dans une collection de cultures Internationalement reconnu. - Souche caractérisée par des techniques Phénotypiques et génotypiques. - Pas de transmission possible de gènes de Résistance aux antibiotiques
<p>Critères technologiques</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini. -Non modification des propriété organoleptiques du produit fini.

4.1. Critères fonctionnels

4.1.1 Survie au cours du transit digestif

Suppose qu'ils puissent résister à plusieurs barrières physiologiques, à la sécrétion d'acide gastrique, à la colonisation bactérienne digestive, aux acides biliaires, aux peptides antimicrobiens du mucus et ceux sécrétés par certaines cellules intestinales (immunoglobulines à sécrétions, lactoferrine, lysozymes, etc.) (Wehkamp et al., 2007).

4.1.2 Adhésion aux cellules intestinales et/ou au mucus

Ce critère est l'un des critères de sélection les plus importants. Elle permet d'augmenter le temps de rétention des probiotiques dans l'intestin pour mieux résister aux mouvements péristaltiques intestinaux (Izquierdo, 2009). Selon plusieurs études pharmacocinétiques cliniques, la culture probiotique doit être continuellement ingérée pour qu'un effet probiotique exogène continu soit obtenu (Marteau et rambaud, 1998).

4.1.3 Colonisation

Les probiotiques transitent dans le tube digestif jusque dans les selles, parfois sans avoir adhéré ou s'être multipliés (Robin et rouchy, 2001). Ayant une durée de persistance élevée sont à privilégier pour les souches. Les probiotiques font Une consommation régulière de semble donc indispensable pour un effet bénéfique persistant (AFFSSA, 2005 ; Marteau et seksik, 2005).

4.1.4 Aptitude de produire des différents effets bénéfiques sur homme

Les souches faisant l'objet d'études sont sélectionnées en laboratoire pour leurs aptitudes fonctionnelles comme leur activité enzymatique, leur aptitude à moduler le système immunitaire (Affssa, 2005). Donc en à différents degrés de preuves à l'appui de la vérification de ces effets bénéfiques. Au premier temps, plusieurs études in-vitro efficaces doivent être conduites pour déterminer les effets bénéfiques potentiels des probiotiques sur l'humain. Si les résultats sont convaincants, ils devront être confirmés par des essais cliniques randomisés chez l'Homme, en double aveugle contre placebo, menés sur des populations cibles en nombre suffisant pour être statistiquement significatifs.

4.2 Critères technologiques

Les caractéristiques des souches ne doivent pas être altérées durant les procédés de production du probiotique. Ainsi les souches probiotiques doivent rester stables lors de la conservation du produit et fournies en dosage approprié jusqu'à la date de péremption. Des études doivent donc être menées pour déterminer la date d'utilisation des produits à base de probiotiques sans diminution ou perte de leurs propriétés bénéfiques (Affssa, 2005).

4.3 Critères de Sécurité

4.1.1. Identification de la souche

Les probiotiques sont identifiées à partir des méthodes fiables de détermination du génotype et phénotype. La souche bactérienne est alors identifiée par un code alphanumérique et est nommée selon les règles du code international de nomenclature des bactéries (Colarelli, 2010).

4.1.2. Innocuité

Les probiotique présenter une totale innocuité pour le consommateur, c'est-à-dire être non toxique et exempt de toute pathogénicité (World Gastroenterology Organisation Global Guidelines, "Probiotics and prebiotics." 2008).

Pour chaque souche potentiellement probiotique, il faut étudier tout effet indésirable possible comme la résistance aux antibiotiques, les activités métaboliques nocives, la production de toxines, le potentiel infectieux, l'activité hémolytique. Une grande partie des microorganismes sont d'usage courant en agroalimentaire depuis des années. Leur consommation de longue date sans risque établi pour l'Homme est la meilleure preuve de leur sûreté. Il a alors été dressé une liste de souches historiquement sécuritaires on parle de souches à statut QSP (QualifiedPresumption of Safety) in Europe on GRAS (Generally Recognized as Safe) aux Etats-Unis.

• Profil d'antibiorésistance

Il est important de s'assurer que la souche ne soit pas résistante aux antibiotiques et qu'elle ne pourra pas induire de résistance (transfert de gènes de résistance comme les plasmides ou transposons).

• Substance antimicrobienne

Les souches produisant des enzymes qui modifient Chimiquement la structure des antibiotiques ou qui développent une antibiorésistance Par mutation en présence du médicament ou qui produisent des substances Antimicrobiennes sont interdites en utilisation probiotique.

• Activités métaboliques

Les souches produisant des métabolites (D-lactate, De conjugaison de sels biliaires.) qui peuvent causer des problèmes dans la physiologie humaine ne doivent pas être utilisées.

4.1.3. Origine

Les probiotiques sont bien adaptées à leur environnement. La muqueuse intestinale et la microflore partagent des épitopes antigéniques communs sans doute responsable de la tolérance immunologique de l'hôte. Toutes. En faveur d'une origine humaine comme facteur favorable pour une souche probiotique.

5. Les mécanismes d'action des probiotiques

Les mécanismes d'action des probiotiques sont complexes : ils vont de la concurrence entre bactéries pour les points de fixation à la paroi intestinale, jusqu'à la modulation du système immunitaire (Ng al 2009)

Les probiotiques inhibent la pathogénicité des agents microbiens par plusieurs mécanismes directs ou indirects. (SaizVieco, 2019)

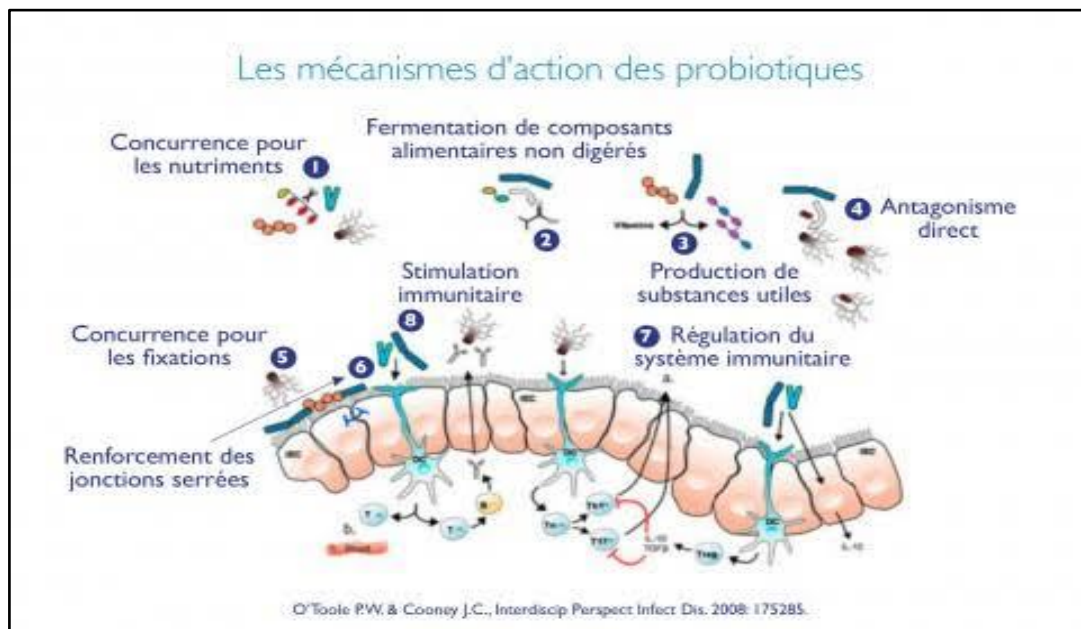


Figure 11: les mécanismes d'action des probiotiques

1. Inhibition de l'adhésion des pathogènes.
2. Production de substances antimicrobiennes
3. Stimulation et modulation de l'activité du système immunitaire intestinale
4. Renforcement de l'effet barrière de l'épithélium intestinal

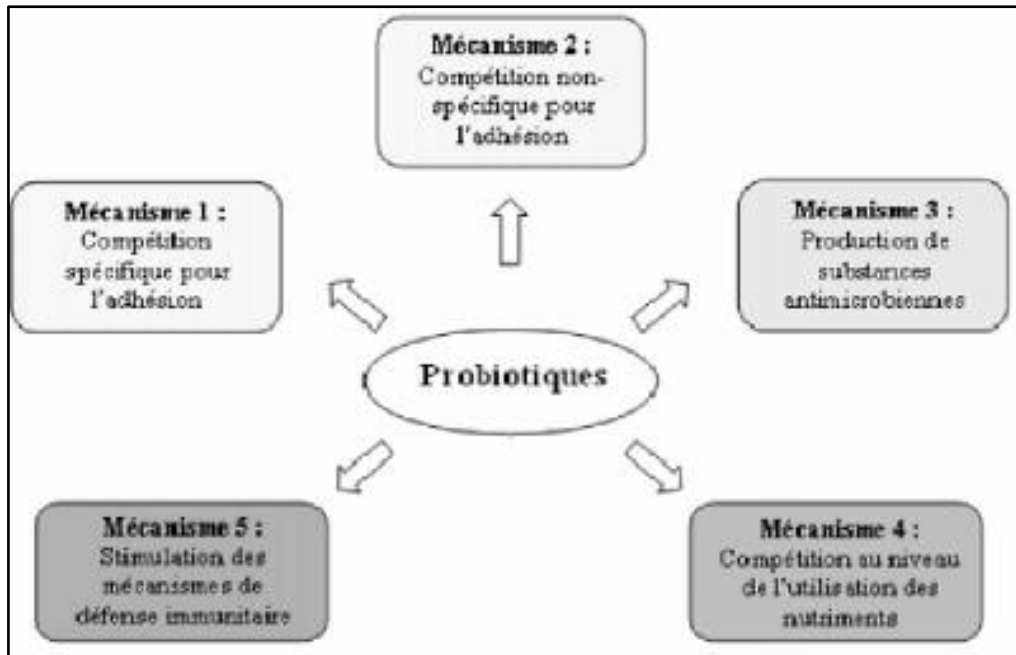


Figure 12: Mécanismes d'action proposés des micro-organismes probiotiques dans le Traitement des infections entériques (Calder et kew, 2002 ; Kaur et al., 2002).

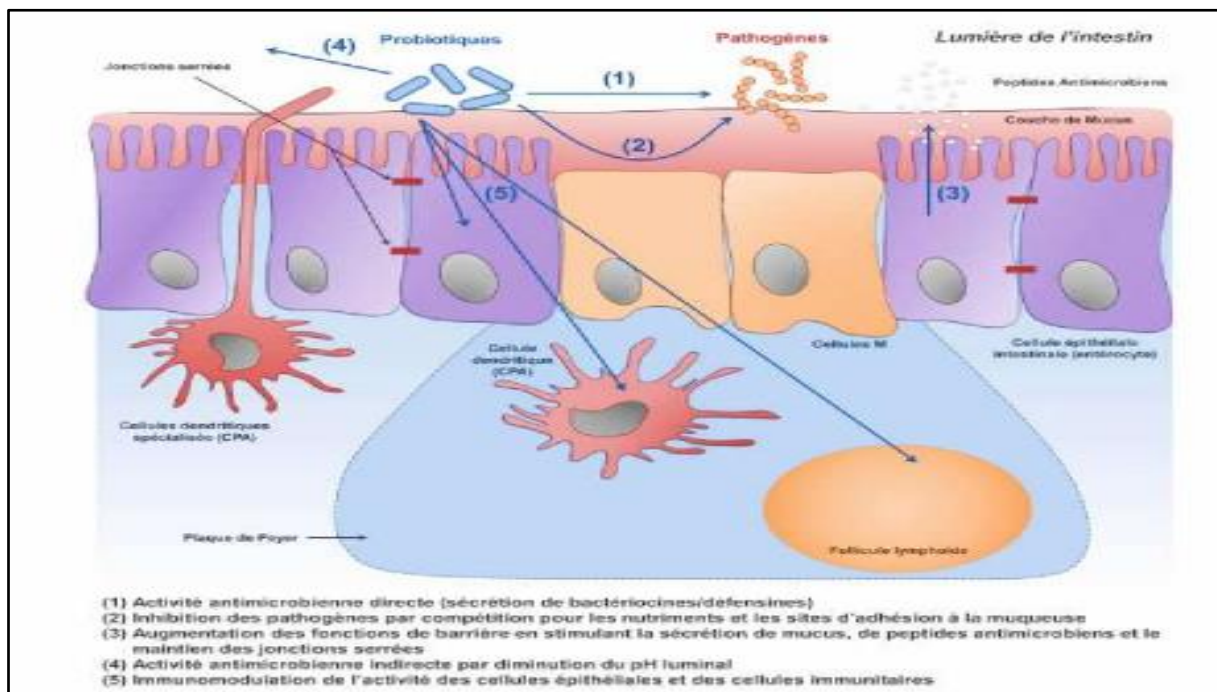


Figure 12 : Abiotiques des probiotiques. (Villeger,2014)

6.Effets des probiotiques sur La santé humain

- Les probiotiques agissent à trois niveaux de l'intestin :
- ❖ Au niveau de la flore intestinale.
- ❖ Aux barrières intestinales.
- ❖ Au système immunitaire au niveau de l'intestin.

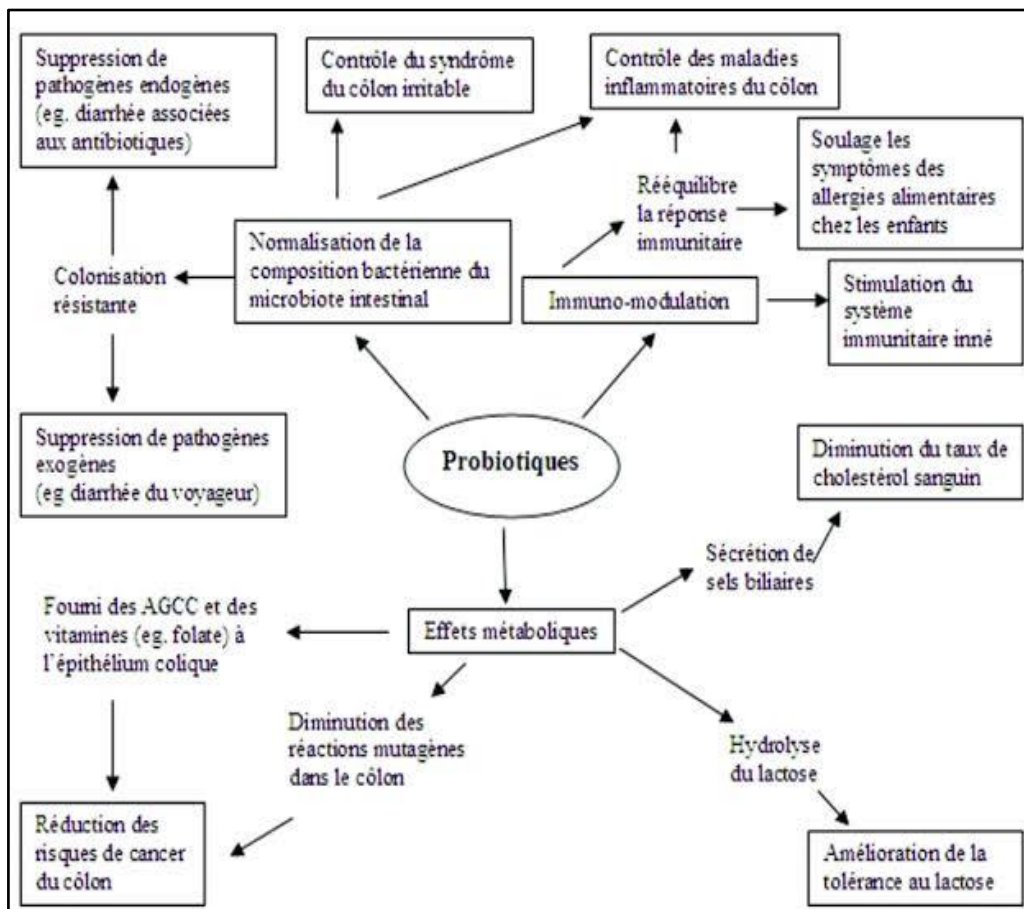


Figure 14 : Effets bénéfiques sur la santé de la consommation de probiotiques

- Plusieurs effets bénéfiques des proclitiques sur la santé humain, attribués à l'ingestion des probiotiques ont été prouvés scientifiquement et d'autres nécessitent encore des études plus approfondies à partir l'homme.

6.1 L'élimination ou diminution d'intolérance de lactose

-L'absence de synthèse de la lactase ou B-galactosidase causé
-L'intolérance au lactose à partir les cellules épithéliales de l'intestin, le lactose est responsable de troubles intestinaux chez les personnes déficientes en cette enzyme. La B-galactosidase Produisant par les bactéries lactiques qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Aussi leur utilisation des probiotique facilite la digestibilité du lactose chez les personnes atteintes d'intolérance. **(Chemlal-Kheraz, 2013)**

6.2 Effets sur le système immunitaire

Les bactéries lactiques capables d'agir positivement sur le système immunitaire, par la réponse immunitaire innée et adaptative. Les probiotiques renforcent l'immunité lorsqu'elle est faible, Ils diminuent la suractivation du système immunitaire, notamment dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin, les probiotiques augmentent la fonction de barrière de la muqueuse intestinale, par exemple en accentuant la production de mucus ou des anticorps de type IgA Aussi ont des effets antimicrobiens directs, en prenant la place des bactéries pathogènes (phénomène de compétition) et en empêchant leur adhésion aux parois intestinales **(SaizVieco, 2019)**.

Les probiotiques jouent un rôle régulateur de l'immunité, Réduction du risque d'Infection des voies respiratoires supérieures et infections connexes, et de cancers, et les maladies des voies urinaires. Aussi, contribuer à la santé ou au confort intestinal, prévenir ou soulager ballonnements et flatulences, renforcer la barrière ou l'immunité intestinale **(chemlal-Kheraz, 2013)**.

6.3 autre effets bénéfiques des probiotiques

- Réduction du risque de Maladie des voies urinaires et Certains cancers.
- Diminuent des diarrhées.
- Réduction du risque de Coronaropathie.

Tableaux 05 : les effets bénéfiques des probiotique (Bouridane et al,2012).

<i>Lactobacillus Reutei</i>	Coloniser le tractus intestinal, le Raccourcissement de la diarrhée à rotavirus, Équilibrer la flore intestinale.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Amélioration immunitaire, les effets microbiote intestinale
<i>Lactobacillus rhamnosus DR10</i>	Amélioration immunitaire, adhérence à la muqueuse, les effets de microbiote, amélioration de la condition des personnes âgées
<i>Bifidobacteriumlactis HN019</i>	Amélioration immunitaire, équilibrée la flore intestinale
<i>Combinaison proclitique (VSL3)</i>	Effet positif de la maladie inflammatoire d'intestine et le syndrome de Côlon irritable, traitement et la prévention de la pochète, la prévention et la réduction de la diarrhée
<i>Escherichia coli NISSLE</i>	Effet positif dans la maladie intestinale inflammatoire
<i>Pronostique mixte VSL3(L.bulgaricus, L plantarum,S.themophilus, B. Longum, B. Infatis, et B.brève).</i>	Effet positif dans la maladie du côlon irritable
<i>S. Boulardii</i> (souvent inscrit en tant que non pharmacétique dans les aliments)	La prévention de la diarrhée associée aux antibiotiques, traitement de la colite à clostridium difficile

1. L'écosystème vaginal

Un écosystème biologique complexe composé par des éléments abiotique (sécrétion vaginale) et biotique représenté par (les cellules épithéliales vaginales et ça flore commensale), s'interagissent entre eux (interactions hôte- microbe et interactions entre les espèces microbiennes (**Redondo-lopez et al., 1990 ; Merk et al., 2005**).

2. Anatomie et physiologie de l'appareil génital féminin

Est constitué de deux types d'organes : les organes génitaux externes (la vulve), et Les organes génitaux internes (les ovaires et les voies génitales qui comprennent l'utérus, les trompes de Fallope et le vagin), situés à l'intérieur de la cavité pelvienne (**Marieb ,2005**).

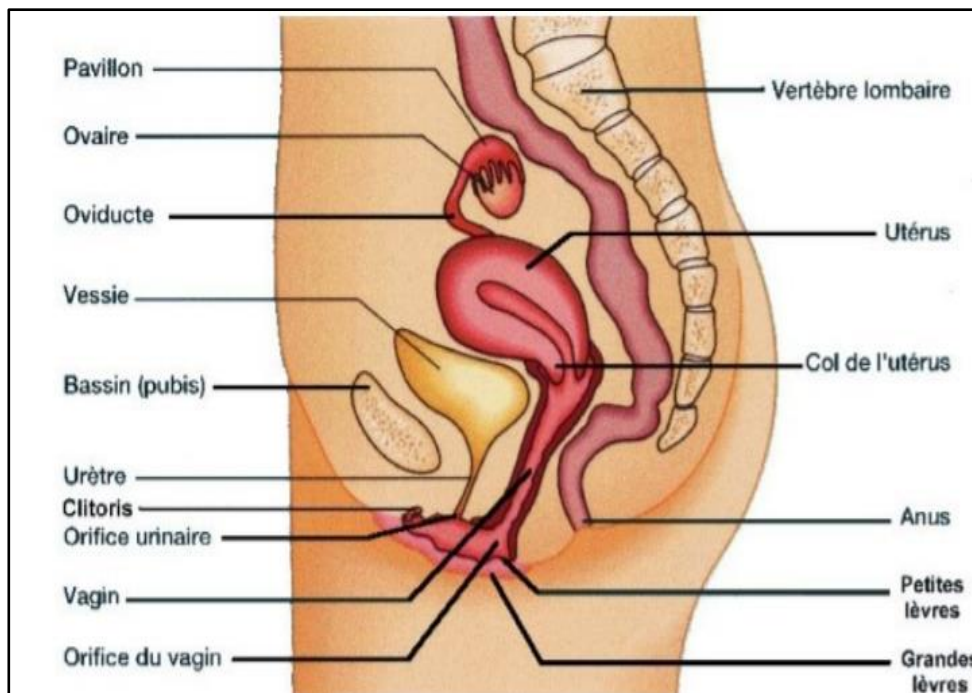


Figure 15 : Appareil reproducteur féminin (**Appareil génital ww3.ac-poitiers.fr**).

2.1 Les organes génitaux internes et externes

2.1.1 Les organes génitaux internes

A) Les ovaires

Sont des organes pairs situés de part représente la glande génitale féminine. Il est constitué d'un cortex, qui Contient les gamètes en voie de formation et région médullaire plus profonde (**Vacheret, 2017**).

B) Trompes utérines

Appelées aussi trompes de Fallope forment la portion initiale des voies génitales de la femme relie chaque ovaire à l'utérus de long 10 cm. (**Elaine, 2005**).

C) Le vagin

Le vagin, C'est un organe féminin de la copulation, musculo-membraneux souple élastique et contractile. (**Bernard blanc, 2000**), C'est une cavité contenant une flore microbienne normale (**Bergogne-bérézin, 2007**).

✓ Anatomie du vagin

Le vagin est un organe impair et médian, entièrement sous – péritonéal, il est contenant la vessie et l'urètre en avant et le rectum en arrière. Il se fixe en haut sur le col utérin qui fait saillie dans sa cavité. La frontière avec la région vulvaire en bas est marquée par l'hymen (**Chometteg, 1999 ; et Lahlidi, 1986**).

2.2 Les organes génitaux externes**A) les grandes lèvres**

Recouverte de poils de chaque côté de la vulve où la peau est rose et humide (**Rousseau, 2002**).

B) les petites lèvres

Qui sont des replis cutanés. De part et d'autre.

C) Le vestibules vagin

Situées dans les petites lèvres maintiennent avec leur sécrétion l'humidité du vestibule vaginal (**Menche,2014**).

3.Le pH vaginal

La paroi du vagin est composée de trois couches : musculuse, l'adventice, et la muqueuse qui est lubrifiée par les glandes vestibulaires ou glandes de Bartholin. Les cellules épithéliales libèrent le glycogène, qui est ensuite transformé en acide lactique par les bactéries résidentes du vagin au cours d'un métabolisme Sous l'influence des œstrogènes (**Marieb, 2005**).

Le pH vaginal est l'un des facteurs qui régulent l'équilibre de la microflore vaginale (**Sánchez-borrego et al., 2014**). Normalement entre 3,8 et 4,5. (**Bergogne-bérézin ,2007**). Varie au cours de la vie d'une femme : de 7 chez les jeunes filles, à 3,8-4,4 chez les femmes en âge de procréer, à 6,5-7 chez les femmes ménopausées sans traitement hormonal, et à 4,5-5 chez les femmes ménopausées sous hormonothérapie.et Un pH de 3,8 à 4,4 considéré comme équivalent à un vagin sain (**Daniels son, 2011**).

4. La microflore vaginale

Le vagin est colonisé par une large gamme de microorganismes, appelée le microbiote vaginal. Ce dernier présente les mécanismes de défense les plus importants pour la fonction de reproduction, le maintien de l'environnement sain et la prévention de la prolifération des microorganismes étrangers dans le vagin (Sobel, 1999 ; Linhares et al., 2010 ; Macphée et al., 2010).

Tableau 06 : Pourcentage des différentes espèces qui constituent la flore vaginale saine (Hickey et al., 2012 ; Li et al., 2012).

Espèces	Pourcentage dans la flore vaginale %
<i>Lactobacillus spp</i>	88
<i>Streptococcus groupe B</i>	18
<i>Escherichia coli</i>	16
Autres bactéries à Gram-négative	2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	18
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	38
<i>Mycoplasma hominis</i>	6
<i>Candida albicans</i>	12
<i>Prevotella spp</i>	28
Cocci Gram-positif Anaérobie	42
<i>Bacilles</i> Gram-négatif Anaérobie	12
Bacteroides	10

4.1. Flore bactérienne dominante

La flore de Doderlein C'est la flore bactérienne vaginale dominante. Cette microflore est composée d'une à plusieurs espèces de lactobacilles (bactéries en forme de coccobacille Gram positif ou de bacille appartenant au groupe des bactéries lactiques) (Reid et Boocking, 2003).

4.2. Flore bactérienne intermédiaire

Parallèlement à ces lactobacilles, on peut observer dans la flore vaginale des espèces issues des flores digestives et oropharyngées de l'homme. La flore bactérienne qui colonise les voies génitales il y a des *Streptococcus agalactiae* (principal agent d'infections materno-foetales qui colonise le vagin de 10 à 20% des femmes en âge de procréer), *Escherichia coli*, *Proteus*, *Morganella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Providencia*, et *Serratia*. On retrouve aussi des bacilles à gram négatif aérobies stricts tels que *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, des staphylocoques et de nombreuses bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Clostridium*, *Veillonella*, *Mobiluncus*.) (Balaka et al, 2008).

4.3. Equilibre de la microflore

Le vagin est un carrefour reliant une zone septique, à une zone stérile, l'utérus, à l'anus avec la peau pour voisin immédiat : une microflore d'origines intestinale et cutanée peut donc s'y installer (Berrebi et ayoubi ,1999) Cette microflore vaginale permet de s'échapper aux cellules immunitaires et aux attaques antimicrobiennes, forme des biofilms bactériens qui lui facilitent l'accès aux nutriments, et lui assurent un meilleur contrôle de la multiplication bactérienne (Reid, 2001).

4.4. Le déséquilibre de la microflore vaginale

✓ Facteurs de déséquilibre

La microflore normale contient généralement par les *Lactobacillus*, mais ils coexistent avec des autres espèces dont des pathogènes potentiels. Une rupture de cet équilibre peut être un facteur important qui induit des infections (Maggi et al, 2000) Les causes de déséquilibre sont multiples :

- iatrogènes par des traitements aux antibiotiques
- pathologiques dans le cas de patientes immunodéficientes ou diabétiques.
- physiques dues à une mauvaise hygiène intime, certaines habitudes sexuelles, et l'utilisation de spermicides...etc.
- hormonales (Barbes et boris, 1999).

Tableau 07 : Facteurs exogènes et endogènes du déséquilibre de la microflore vaginale saine (Marelli et al, 2004).

Facteurs endogènes	Facteurs exogènes
<ul style="list-style-type: none"> - Variation des niveaux hormonaux « d'œstrogène » -Teneur en glycogène -Le pH vaginal -Période de menstruation -Grossesse -Ménopause -Maladies comme le diabète et l'immunodéficience 	<ul style="list-style-type: none"> -Habitudes sexuelles -Mauvaise hygiène intime, -Stress iatrogènes : induit par des traitements aux antibiotiques, par des corticoïdes ou des immunosuppresseurs et par la radiothérapie, utilisation des Spermicides.

5. Evolution de la microflore vaginale normale

La flore vaginale est évolutive et subit de nombreuses modifications en fonction de l'âge (figure 16).

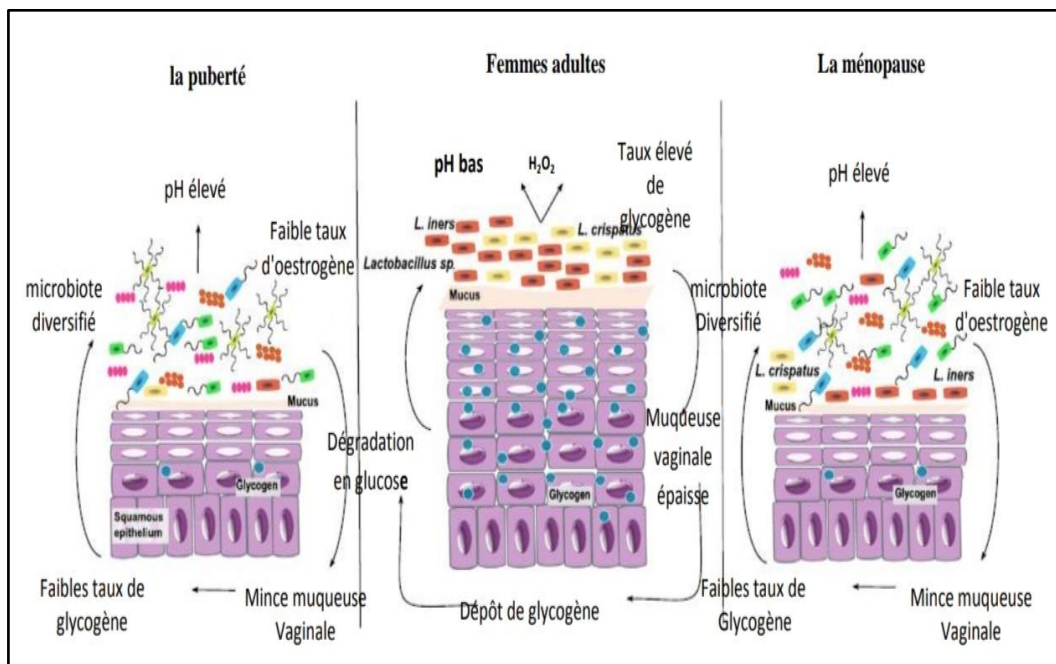


Figure16 : Variation de la muqueuse vaginale au cours de la vie (Petrova et al ,2013).

5.1. Dès les premières semaines de vie à la petite enfance

La colonisation initiale se produit à la naissance, lorsque le nouveau-né est d'abord exposé au tractus vaginal de sa mère lors d'un accouchement par voie basse, ou par contact

cutané du nourrisson avec ses proches et son environnement. Dans les 2 à 4 premières semaines de vie, l'enfant bénéficie des taux d'estrogènes maternelles ce qui induit un épaissement de l'épithélium vaginal, donc ce processus régule le dépôt de glycogène dans les cellules épithéliales qui est fermenté par les bactéries indigènes conduisant à un abaissement de pH vaginal (Turovskiy et al 2011).

La microflore vaginale des filles prépubères est typiquement caractérisée par la faible fréquence des *lactobacilles* (MacPhee et al, 2010).

5.2. Au moment de la puberté

Dans le début de la puberté, des plusieurs changements au niveau de la vulve et le vagin se produisent et qui sont induites par des glandes surrénales et les gonades de maturation. Au cours de la maturation, le développement folliculaire provoque la production d'estrogènes à des taux élevés conduisant encore une fois à un épaissement de la muqueuse vaginale et une augmentation de la production du glycogène, substrat de fermentation (Turovskiy et al, 2011), au moment de la puberté ont montré il y a une augmentation des lactobacilles vaginaux avec l'âge, ce qui suggère que le changement du microbiote vaginal se produit progressivement (Macphee et al, 2010).

5.3. Chez les femmes adultes

La flore vaginale chez les femmes adultes saines est généralement dominée par le genre *Lactobacillus* (Petrova et al 2013) les résultats des études montrés qu'il n'y a pas de différence notable entre la composition qualitative et quantitative de la flore microbienne des adolescentes avec celle des femmes adultes (Yamamoto et al, 2009). Le cycle menstruel modifie la composition de la flore vaginale à la fin des menstruations, le taux d'estrogènes augmente, la muqueuse vaginale s'épaissit et la production de glycogène s'élève, et permettant ainsi de nouveau aux lactobacilles dominants au sein de l'écosystème vaginal (Turovskiy et al, 2011).

5.4. Chez les femmes enceintes

La microflore vaginale varie pendant la grossesse selon l'âge gestationnel et la proximité du col de l'utérus, elle est aussi moins diversifiée et moins riche en général. (Aagaardk et al, 2012).

Les changements de la flore vaginale sont également fréquents, caractérisés par une réduction de la diversité globale, accompagnés d'une augmentation des *Lactobacillus*, bactérioidales, clostridiales, et actinomycétales (Petrova et al, 2013).

5.5. La ménopause

Une réduction spectaculaire de la production d'œstrogène donner une séchage et l'atrophie de l'épithélium vaginal. Le glycogène contenu dans l'épithélium vaginal baisse, conduisant ainsi à une augmentation du pH vaginale a causé lorsque les taux d'œstrogènes diminuent, Le pH vaginal élevé, favorise la croissance des plusieurs bactéries pathogènes, en particulier les bactéries entériques qui à ce stade colonisent cette cavité (**Turovskiy et al, 2011**).

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

Les lactobacilles occupent un rôle important dans la protection de l'écosystème vaginal.

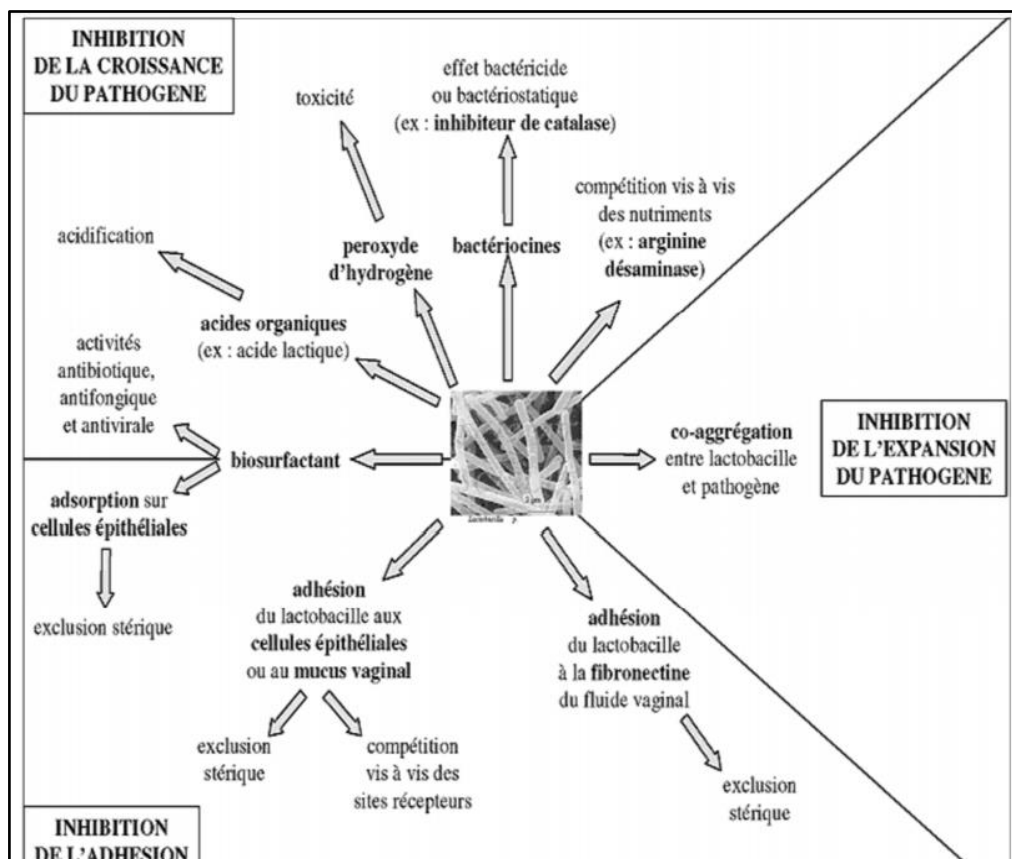


Figure 17 : Mécanismes mis en jeu par les lactobacilles vaginaux pour inhiber les pathogènes (**Lepargneur, 2002**).

6.1. Inhibition de la croissance du pathogène

6.1.1 Par production d'acides organiques

Les acides organiques pour inhibent l'activité enzymatique cellulaire des pathogènes acide sensible peuvent diffuser passivement à travers la membrane sous leur forme non dissociée. Et acidifient le cytoplasme après dissociation. (**Boskey, 2001**).

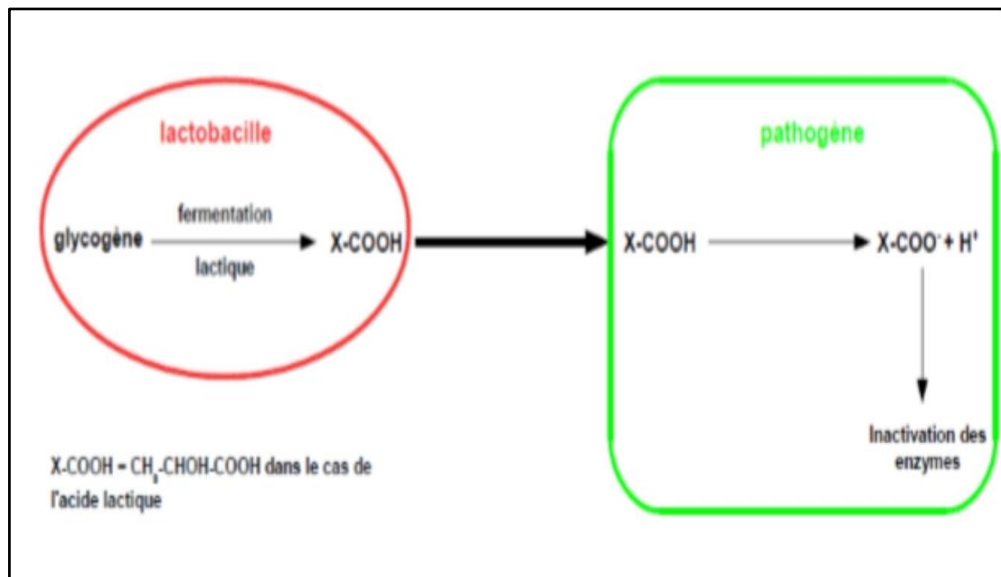


Figure 18 : Mode d'action sur les pathogènes des acides organiques produits par les lactobacilles (Boskey, 2001).

6.1.2. Par production de peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène par les lactobacilles représente avec la production d'acide lactique, un des mécanismes de défense les plus importants contre l'invasion de la cavité vaginale par des micro-organismes pathogènes.

La plupart des lactobacilles sont capables de produire du peroxyde d'hydrogène, qui a un potentiel toxique sur d'autres bactéries (Nader-macías et Juárez Tomás, 2015 ; Lepargneur, 2002). L'effet antimicrobien est basé sur ses propriétés oxydantes qui se traduisent par des changements irréversibles dans la membrane cellulaire microbienne (Merki, 2004).

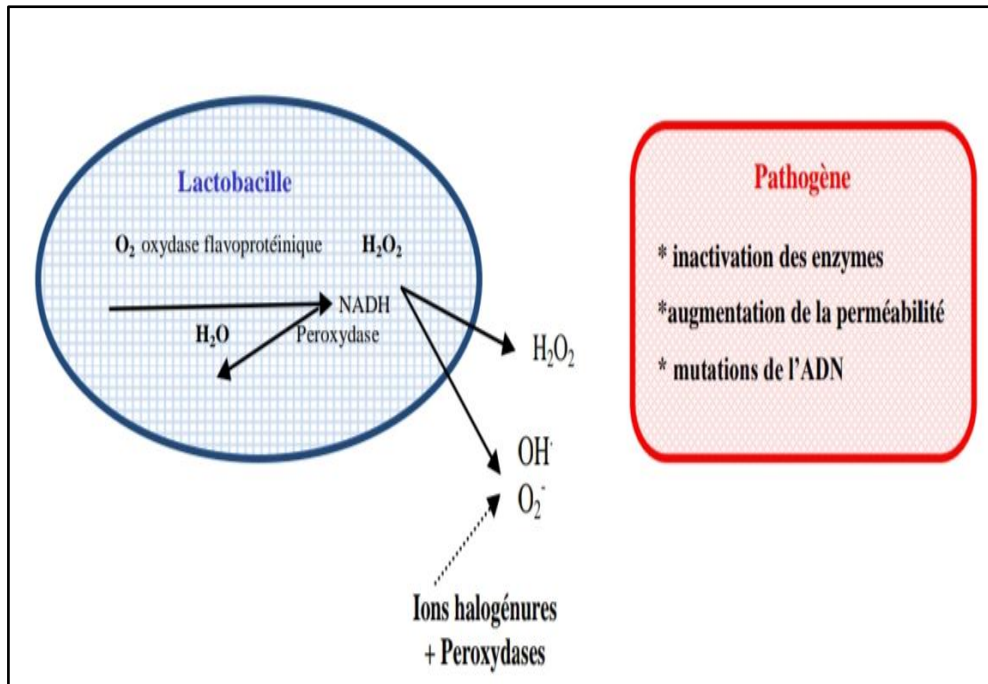


Figure 19 : Modes d'action d'H₂O₂ et ses dérivés sur les pathogènes (Lepargneur et rousseau,2002).

6.1.3. Par production de bactériocines

Les bactériocines sont des substances antimicrobiennes, de nature protéique, bactéricide restreint, elles sont actives aux milieux neutres ou acides (Pascual et barberis, 2011) produisent par certains Lactobacillus avec une spectre d'action plus large. Elles s'ancrent sur la paroi avec une formation des pores et induisent ainsi la fuite du contenu cytoplasmique (Ocana et nader-macias,2004).

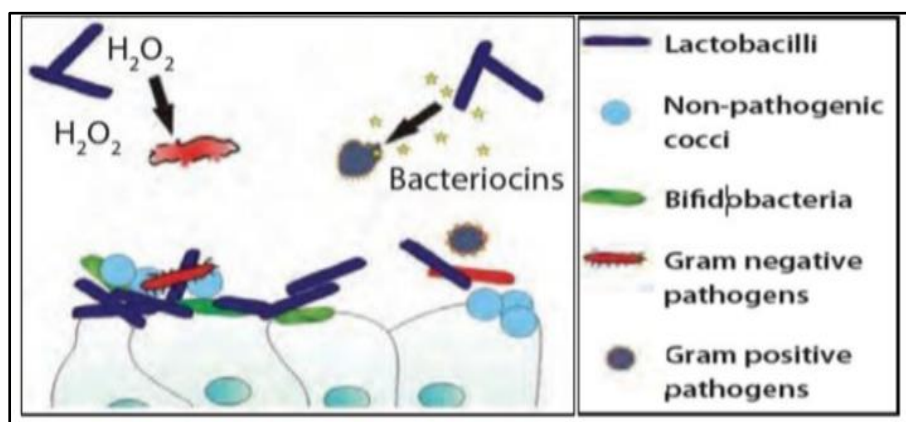


Figure 20 : Mode d'action de peroxydes d'hydrogène et des bactériocines produites par les lactobacilles sur les pathogènes (De Vos et al., 2012).

6.1.4. Par production de l'enzyme arginine désaminase

Les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de certains pathogènes par une compétition nutritionnelle par exemple dans le cas des souches possédant une activité arginine désaminase. Donc empêche l'action de l'arginine décarboxylase puis la décarboxylation des acides aminés menant à la synthèse de polyamines qui contiennent des propriétés néfastes sur l'écosystème vaginal. En effet, les polyamines entraînent l'alcalinisation du milieu vaginal, la présence de germes anaérobies de la flore, donnent une mauvaise odeur (odeur de poisson), donc destruction de l'intégrité de la muqueuse vaginale puis l'inhibition de la réponse immunitaire et inflammatoire et enfin l'altération du transport des antibiotiques.

Formation de citrulline et d'ammoniac empêchent la prolifération des bactéries pathogènes anaérobies en les privant d'arginine, la citrulline et l'ammoniac sont source de carbone, d'énergie et d'azote pour les lactobacilles et contribuent donc à maintenir un écosystème vaginal en bonne santé (Lepargneur, 2002).

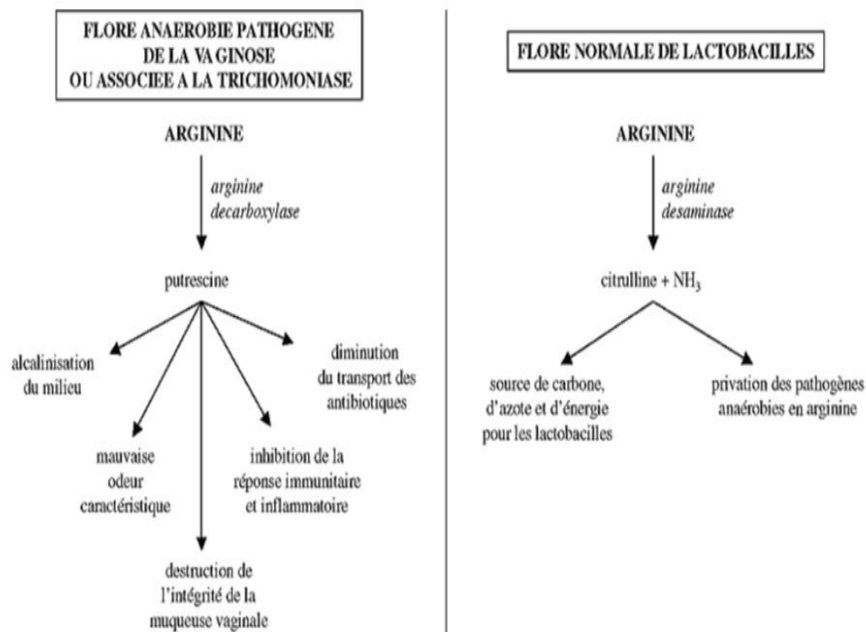


Figure 21 : Effets des lactobacilles possédant l'enzyme arginine désaminase (Lepargneur, 2002).

6.2. Inhibition de l'adhésion du pathogène

6.2.1. Par compétition directe avec les récepteurs membranaires des cellules épithéliales vaginales

Ces mécanismes de d'adhésion se font généralement de deux façons spécifiques par l'intermédiaire des adhésines et les sites récepteurs de l'épithélium et exclusion par encombrement stérique (**Gagnon,2007**).et de façon non spécifique par des différentes interactions physico-chimiques (forces électrostatiques, forces de Van Der Waals, liaisons hydrogènes...) (**Reid, 2001**).

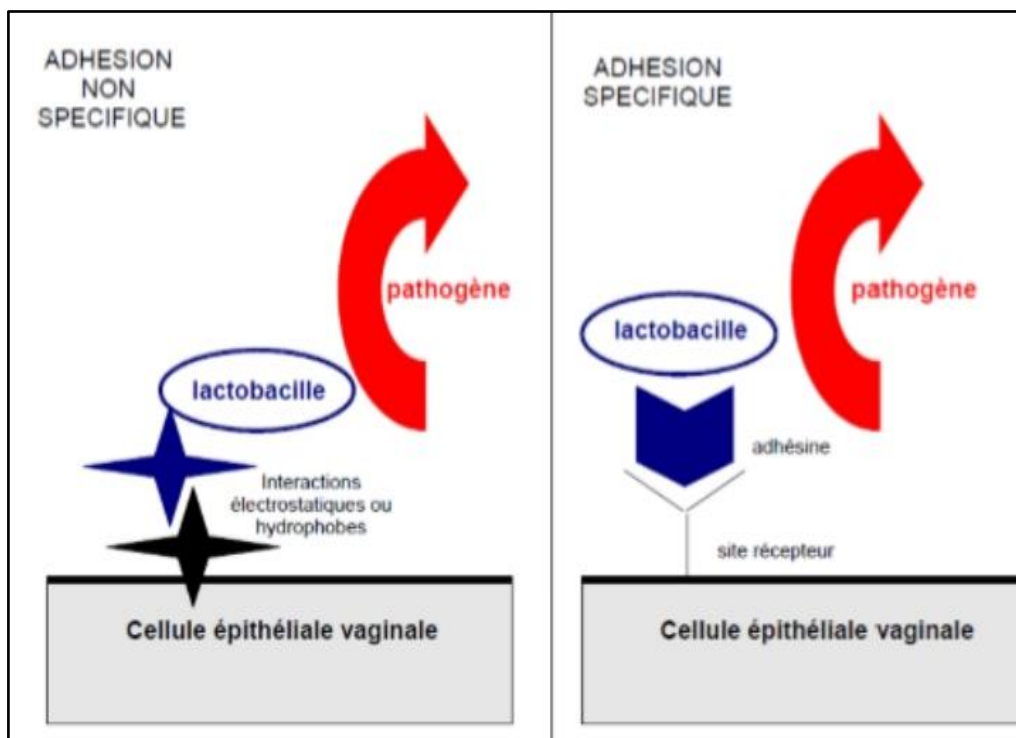


Figure 22 : Mécanisme d'inhibition de la fixation des pathogènes par un effet barrière dû à l'adhésion des lactobacilles à l'épithélium vaginal (**Lepargneur,2002**).

6.2.2. Par adhérence à la fibronectine humaine

La fibronectine dont le rôle dans l'adhérence bactérienne est important (**Lepargneur et Rousseau, 2002**) Sous forme fibrillaire dans qui recouvre les surfaces des muqueuses et des cellules Sous forme soluble dans les fluides physiologiques par exemple le fluide vaginal.

En effet, les lactobacilles se fixent sélectivement à la fibronectine et empêchent la fixation des pathogènes par encombrement stérique (**Rousseau, 2002**)

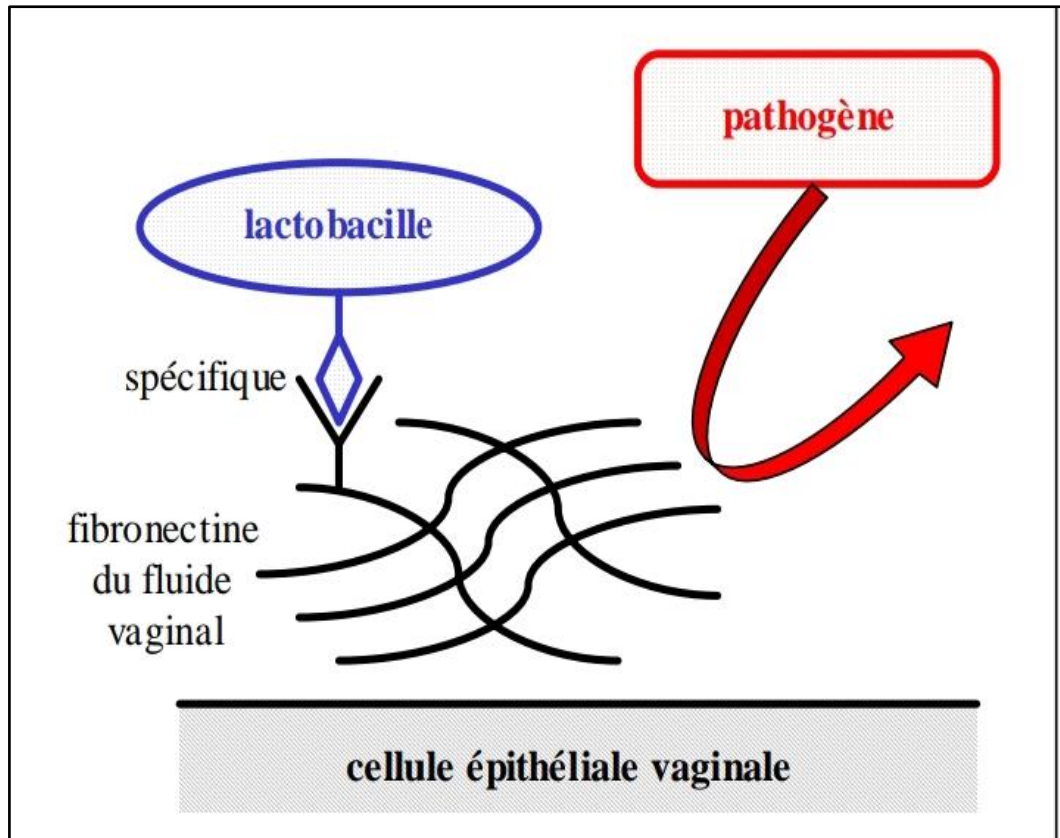


Figure 23 : Mécanisme d'inhibition de l'adhésion des pathogènes par adhésion des lactobacilles à la fibronectine (Lepargneur, 2002).

6.2.3. Par les biosurfactants

Sont des molécules amphiphiles jouant un rôle important de biosurfactant à la surface de la muqueuse en renforçant les interactions entre la muqueuse vaginale et la flore -sources carbonées hydrophobes favorisent la croissance des lactobacilles -possèdent une activité antimicrobienne avec des effets antibiotiques, antiviraux et antifongiques (Lepargneur , 2002 ; Spurbeck , Arvidson, 2011).

7. Inhibition de l'expansion du pathogène : Co-agrégation

La co-agrégation des lactobacilles est un mécanisme par lequel les premiers bloquent l'adhérence des deuxièmes sur les cellules de l'épithélium vaginal.

Ce mécanisme favorise un « microenvironnement » autour du pathogène dans lequel les substances inhibitrices produites par les lactobacilles, peuvent être concentrées. (Spurbeck, 2011 ; Cngof, 2007).

8. Développement des probiotiques au niveau vaginal

Plusieurs études ont montré l'efficacité des souches de lactobacille exogènes au niveau vaginal contre la vaginose bactérienne, les infections urinaires, et les vaginites.

Tableau 08 : Proposition de critères de sélection des probiotiques à application vaginale. (MacGroarty, 1993 ; Parent *et al*, 1996).

CRITERES DE SECURITE	<p>Souche isolée du vagin d'une femme saine</p> <p>Historique de non pathogénicité</p> <p>Pas de transmission possible de gènes de résistance aux antibiotiques</p> <p>Pas de dégradation excessive du mucus</p>
CRITERES FONCTIONNELS	<p>Adhésion aux cellules vaginales et persistance dans le vagin</p> <p>Production de substances antimicrobiennes (notamment peroxyde d'hydrogène) et antagonisme vis-à-vis des pathogènes (notamment compétition d'adhésion)</p> <p>Effets sur la santé documentés</p>
CRITERES TECHNOLOGIQUES	<p>Stabilité au cours des procédés de production et dans le produit fini</p> <p>Conservation des propriétés probiotiques après production</p> <p>Relargage rapide des souches en dehors de la matrice après introduction dans le vagin</p>

9. l'efficacité des probiotiques dans le traitement et la prévention des infections vaginales

9.1 Probiotiques et vaginose bactérienne

Majorité des *Gardnerella vaginalis*, présent dans la vaginose bactérienne, est sensible aux acides organiques et/ou au peroxyde d'hydrogène sécrétés par les lactobacilles vaginaux. Ainsi la seule mesure consiste à rééquilibrer la flore, ce qui suggère que les probiotiques ont un intérêt (Faure *et al*, 2013).

9.2 Probiotiques et vulvo-vaginite candidosique

Candida albicans est inhibé par le peroxyde d'hydrogène qui produit par les lactobacilles. La recolonisation vaginale par l'utilisation de *Lactobacillus* acidophiles permettrait de restaurer le pH vaginal donc l'activation de la croissance normale de la flore bactérienne. Des études ont montré que les lactobacilles peuvent inhiber la croissance de *C. albicans* (Faure et al, 2013).

Partie II : Etude expérimentale

1.Objectif

Notre travail vise à étudier les caractéristiques des bactéries lactiques isolées de la cavité vaginale, en particulier les lactobacilles, L'objectif de cette étude s'articule des points suivants :

- ✓ On isole et identifie des bactéries lactiques de la cavité vaginale de la femme enceinte.
- ✓ L'étude des activités antibactériennes des bactéries lactiques isolées à l'égard des bactéries pathogènes pour déterminer leur potentiel antagoniste.
- ✓ Exposition des souches lactiques isolées aux différents tests de sélection des souches à pouvoir probiotiques.

2. Lieu de travail

De l'intégralité ce travail a été réalisée au niveau de deux laboratoires : le laboratoire de Microbiologie appliqué de la Faculté des sciences de la nature et de la vie de l'Université de Tébéssa) et le laboratoire de bactériologie de l'hôpital khaldi Abd al Aziz. Ce modeste travail s'est déroulé en 5 mois (décembre, Avril 2022).

3. Matériels et Méthodes

3.1. Appareillages et autres

Notre étude a nécessité l'utilisation des appareils, de la verrerie et d'autres matériels dont ils sont cités au-dessous :

- Autoclave ;
- Agitateur électrique ;
- Bain Marie ;
- Balance ;
- Vortex ;
- Centrifugeuse électrique ;
- Étuves ;
- Plaque chauffante.
- Microscope optique ;
- PH mètre ;
- Réfrigérateur ;
- Burette ;
- Spectrophotomètre.

***Verreries**

Bécher, éprouvette, des flacons en verre de 250 ml, pipettes graduées, pipettes pasteur, un jar d'anaérobiose, Erlenmeyer, Tubes à essai stérile, lame et lamelles.

***Autres matériels**

Anse de platine, Bec bunsen, Boîtes de Petrie, écouvillon, pied à coulisse, pince, portoir de tube, spatule, tube Eppendorf.

3.2. Milieux de culture

***Milieux d'isolement et de purification**

Les genres étudiés sont mis en évidence sur leurs milieux.

- **Milieu M17** : (gélose et bouillon) préconisé par Terzani et Sandine (1975) est employé pour la recherche des lactocoques. L'ensemencement est réalisé en surface (**Amrouche, 2003**).

- **Milieu MRS** : (gélose et bouillon) (Man Rogosa et Sharpe) est le plus connu pour la recherche et l'isolement des lactobacilles (composition en annexe). L'ensemencement est effectué en surface (**Leveau et al, 1991**).

-**bouillon nutritif** : est un milieu à usage général utilisé pour la culture d'une grande variété de microorganismes non fastidieux dont les besoins nutritionnels sont inexistantes. Ce milieu a été utilisé pour le repiquage et l'enrichissement des souches pathogènes.

3.3. Les Réactifs et les produits chimiques

• Les réactifs spécifiques pour révélation des réactions du système API 20E sont :

Réactif de Kovacs, réactif de voges Proskauer (VP1 et VP2) et réactif TDA.

• Les colorants de Gram (violet de gentiane, Lugol, fuchsine).

• L'eau oxygénée, huile d'immersion, huile de paraffine, alcool

-Indicateurs de pH (NaOH, HCl)

-L'eau distillée

-L'eau physiologiques stérile

-L'antibiotique de vancomycine

-Solution NaCl

-Xylène

-Phénolphtaléine

-Tampons

-Lait écrémé

3.4. Méthodes

3.4.1. Protocol de prélèvements

Le prélèvement est effectué par la sage-femme ou la gynécologue sous spéculum stérile (**Figure 24**), après avoir répandu aux conditions suivantes : Pas d'antibiothérapie, de toilette intime, ni introduction des produits intravaginaux (**Kerangal, 1999**). Un écouvillon stérile est introduit dans l'exocol et l'endocol en effectuant un mouvement rotatoire.

Le site de prélèvement doit être déterminé qu'en fonction d'un diagnostic médicale précis au préalable et d'une manière à éviter toute contamination par la partie basse de l'appareil génital et Les prélèvements sont transportés au laboratoire de l'université dans le bouillon nutritif.

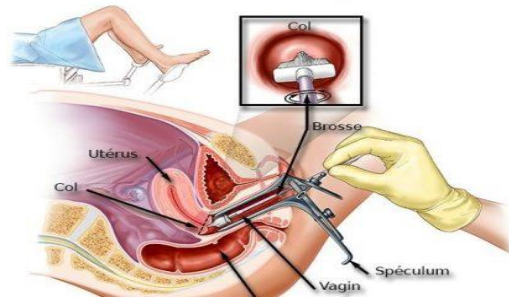


Figure 24 : Méthode d'un prélèvement sous spéculum (**Terese, 2009**)

3.4.2. Technique d'ensemencement et de purification des souches bactériennes

Dans des boîtes de Petri contenant chacune un des milieux sélectifs pour les germes recherchés, on dépose quelques gouttes du prélèvement. L'ensemencement est réalisé avec une anse de platine par la méthode de stries pour obtenir une souche pure et sur tout en respectant les précautions de stérilisation, puis nous incubons les boites dans une étuve.

- Pour les géloses MRS modifié additionné de vert de bromocrésol et cystéine et l'antibiotique vancomycine (LAMVB) et M17, l'incubation se fait à 37°C pendant 48h, en utilisant la jarre à bougie pour créer l'anaérobiose. Les colonies obtenues après incubation sont examinées macroscopiquement (aspects des colonies).

Après isolement des colonies d'aspects morphologiques différents (taille, couleur, surface, profondeur...) sont repiquées sur milieu MRS et M17, incubées à 37°C afin d'assurer de la pureté des cultures. La purification des souches sur milieu gélosé se fait par la méthode de stries suivi d'une observation microscopique (Lairini et al., 2011).

3.4.3. Conservation des souches

Pour assurer une bonne continuité du travail, les isolats doivent être conservées dans des conditions adéquates. La conservation était réalisée par deux méthodes, une conservation à courte et une autre à longue durée :

3.4.3.1. Conservation de courte durée

Chaque souche estensemencée sur gélose MRS et M17 inclinée en tube. Après incubation à 37 °C pendant 24 h. Les cultures sont conservées à 4 °C pendant plusieurs semaines. Mais un repiquage périodique reste nécessaire (Badis et al., 2004).

3.4.3.2. Conservation de longue durée

En micro tube ^Eppendorf^ contenant de 400 ml de MRS bouillon stérile puis en prenant des colonies des souches et incubé à 37°C. Une deuxième conservation est réalisée dans les mêmes conditions par culture dans le milieu MRS additionné de 20% de glycérol stérile et congelées à -20°C (Badis et al., 2004).

4. Pré-identification des bactéries lactiques isolées

Les colonies subissent deux tests comme une pré-identification le premier test est la coloration de Gram et le deuxième est la recherche de l'enzyme catalase.

4.1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme catalysant la décomposition de peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène selon la réaction suivante :



❖ Principe

Le test consiste à déposer sur une lame une goutte d'eau oxygénée (10 volumes) dans laquelle sera dissocié un petit prélèvement de la colonie. La souche examinée est dite catalase positive si un dégagement gazeux est observé (L'apparition de bulles d'air indique une réponse positive) et le contraire indique l'absence de l'enzyme catalase (Marchal et al., 1991).

4.2. Examen microscopique

Après l'examen macroscopique des colonies sur gélose, et dans le but d'écartier tout ce qui ne peut pas être une bactérie lactique, les isolats ont été soumis à la coloration de Gram. Celle-ci permet de différencier les bactéries à Gram positif de celles à Gram négatif, les bâtonnets, les coques et de nous renseigner sur le mode d'association (**Larpent et Larpent, 1990**).

❖ **Principe**

La coloration de Gram consiste à déposer quelques gouttes de violet de gentiane sur un frotti fixé pendant 1 minute, après rinçage, on redépose du Lugol pendant 1 minute, les bactéries sont décolorées à l'alcool 95° puis on rince avec de l'eau distillée. Enfin, quelques gouttes de fuchsine de Ziehl sont versées sur la lame qu'on laisse agir 20 secondes. La lame est lavée à l'eau distillée. Après séchage, on passe à l'observation microscopique (**Larpent et Larpent, 1990**).

Seuls les isolats catalase négatifs et Gram positifs sont retenus pour une identification.

5. Identification biochimique des souches isolées

❖ **Étude biochimique**

5.1. Etude du type fermentaire

Pour dégrader les sucres les bactéries empruntent soit une voie homofermentaire soit une voie hétérofermentaire, dans ce dernier cas elles fermentent le glucose en produisant de l'acide lactique, de l'éthanol, de l'acétate et du CO₂ comme le montre la réaction (**De Roissart et Luquet, 1994**).



Les souches sontensemencées dans des tubes contenant 10 ml de milieu MRS et une cloche de Durham, puis incubées à 30 °C pendant 48 heures. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham montre que la voie de dégradation du sucre est hétérofermentaire, sinon la voie est homofermentaire.

5.2. Identification des bactéries à l'aide de galerie API20E

API® 20 E™ est un système standardisé pour l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques miniaturisés, ainsi qu'une base de données.

Principe

Dans l'API 20E il y'a 20 micro-tubes (mini chambre ou puits) contenant des milieux déshydratés, généralement il détecte une activité enzymatique. Les tests conventionnels inoculés avec une suspension bactérienne saline reconstitue les milieux.

Incubez le plateau à 37°C pendant 24 heures, se traduit par des virages colorés

Spontané. Après incubation ajouter les réactifs comme suit :

Les réactifs à ajouter aux API 20E

Puits	Réactif
TDA	Une goutte de réactif TDA
IND	Une goutte de réactif de Kovacs
VP	Une goutte de VP1 puis VP2

Lecture de la galerie API 20E se fait en fonction des variations des couleurs (positives ou négatives), et leur utilisation le plus pour l'assimilation des sucres pour les bactéries lactiques, à l'aide du tableau de lecture.

5.3. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

5.3.1. Étude du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques

Les différentes méthodes décrites pour la détection des métabolites à activité antimicrobienne des bactéries lactiques sont basées sur le principe que ces substances peuvent diffuser dans un milieu de culture solide ou semi solide qu'on inocule préalablement avec la souche cible. La production de ces substances est détectée par le pouvoir inhibiteur du filtrat de la bactérie lactique testée sur la croissance du germe cible (**Labioui et al., 2005**).

❖ **Méthode de diffusion en puits sur gélose**

Cette méthode a été testée par la méthode des spots, Les boîtes de Petri ont été pré remplies avec la gélose ATB puisensemencé par écouvillonnage des souches indicatrices (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*). Des puits de 6 mm de diamètre sont ensuite creusés dans la gélose puis ajouté 100 µl de surnageant natif de la culture des souches lactique. Les boîtes sont laissées par la suite à une température de 4°Cpendant 30 minutes puis incubées à 37°Cpendant 24 heure. L'Activité antibactérienne se révèle par l'apparition des zones d'inhibition autour des puits. Après quoi, les boîtes ont été examinées s'il y a l'apparition de zone d'inhibition autour des puits, les diamètres de ces zones d'inhibition apparus sont mesurés ont millimètre.

5.3.2. Résistance aux différentes concentrations de NaCl

Les souches sélectionnées ont été à raison de 50 µl dans des bouillons MRS (1ml) additionnés de 4%,6.5% et 10% de NaCl. Une série de cultures témoins a été préparée en parallèle contenant le bouillon MRS sans sel inoculée de 50µl de chaque souche test.

L'incubation a été faite à 37 °C pendant 48h en anaérobiose (**Badis et al., 2005**). L'aptitude à croître dans ces différentes concentrations de sel a été évaluée par mesure de présence ou absence de trouble.

5.3.3. Résistance aux différents pH

Pour étudier l'influence du pH sur la croissance des souches isolées, deux milieux de MRS bouillon ont été préparés à différents pH (2 et 9), 1ml de ces milieux a étéensemencé par la solution bactérienne jeune de chaque souche. Le témoin (MRS) a été préparé en parallèle. La croissance des souches a été suivie par la mesure de trouble après incubation à 37°C en anaérobiose.

5.3.4. Analyse des caractères de surface cellulaire

5.3.4. a. Hydrophobicité de la surface cellulaire

L'adhésion microbienne à des solvants a été mesurée selon la méthode de **Jacobs et Chenia, (2009)**. Pour la réalisation d'un solvant utilisé : le xylène, Les bactéries ont été récoltées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10minute, lavées deux fois et remises en suspension. La densité optique initiale de la suspension a été ajustée approximativement à 600nm (DO initiale). Ensuite 1.5 ml de solvants a été ajouté doucement à 1,5 ml de suspension bactérienne, les deux phases ont été mélangées par un vortex pendant 2 minutes, après 30 min la phase aqueuse a été récupérée, et on procède à la mesure de la densité optique finale (DO finale). La différence de la densité est considérée comme une mesure de l'hydrophobicité de la surface cellulaire (H %), elle est calculée par l'équation suivante :

$$\% \text{ d'hydrophobie} = [(DO_0 - DO_{30}) / DO_0] \times 100$$

- DO₃₀ : désigne la valeur de la DO mesurée après 30 minutes.

5.3.4.b. Test d'auto agrégation

Les essais d'auto-agrégation ont été réalisés selon la méthode de Kos et al, (2003), les bactéries ont été cultivées à 37°C pendant 24h dans le bouillon MRS, les cellules ont récoltées par centrifugation à 6000 rpm pendant 10min, lavées 2 fois par l'eau physiologique et remises en suspension pour obtenir une DO initiale, puis incubation à 37°C en anaérobiose pendant 1 heure T= 60 min, Le pourcentage d'auto-agrégation a été exprimé selon la formule suivant :

$$\% \text{ d'auto-agrégation} = [(DO_0 - DO_{60}) / DO_0] \times 100,$$

- DO₀ : la DO initiale
- DO₆₀ : désigne la valeur de la DO mesurée après 1h.

5.4.3.c. Test de la co-agrégation

Après centrifugation (6000 rpm pendant 10 minutes) des cultures jeunes des souches probiotiques cultivées sur MRS bouillon et celles des souches indicatrices (*E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Bacilles*) sur BHI à 37°C pendant 24h. Les cellules ont été récoltées après Centrifugation (6000 rpm pendant 10 minutes) puis lavées deux fois, et re-suspensionnées dans de l'eau physiologique stérile. La densité optique des suspensions cellulaires mesurées à une longueur d'onde de 600 nm. Le degré de la co-agrégation a été déterminé par des lectures d'absorbance à 600nm de cultures combinées (500µL de cellules BL avec 500µL de cellules pathogènes) incubées à 37°C pendant t=1h. La co-agrégation a été déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Co-agrégation \%} = ((\text{DOBL} + \text{DOPath}) / 2 - \text{DOBL+Path} / (\text{DOBL} + \text{DOPath}) / 2) \times 100,$$

DOBL : la DO initiale des bactéries lactiques.

•DOPath : la DO initiale des microorganismes pathogènes.

• DOBL+Path : la DO de la culture combinée BL+ pathogènes.

.5.4.4. Étude de quelques aptitudes technologiques des bactéries lactiques isolées

Pouvoir acidifiant

L'étude des aptitudes technologiques constitue un bon critère de sélection des différentes souches identifiées. Selon Champagne et Moineau (2003) plusieurs tests peuvent être réalisés. L'acidité est une notion très importante pour l'industrie, car elle permet de juger l'état de conservation du lait, elle est quantifiée par la mesure du pH ou par titration (acidité Dornic) (**Boudrier, 1985**).

Le pH : est déterminé en utilisant un pH mètre.

L'acidité : est effectuée en titrant 20 ml de l'échantillon par une solution de soude NaOH N/9, la phénolphtaléine (à 1%) a été utilisée comme indicateur.

L'acidité Dornic est une expression de l'acidité développée dans un lait par transformation du lactose en acide lactique sur lait écrémé à un pH 6.5. Les cultures jeunes de 24h des bactéries lactique a été utilisée pour inoculer 10% du milieu au lait écrémé et incubé à 37°C pendant 24h à 48h. Le pH a été mesuré après 2 h, 6 h 24 h et 72 h à l'aide d'un pH mètre.

• **Détermination de l'acidité titrable**

Le dosage de l'acidité au cours de la croissance des bactéries lactiques dans le lait écrémé été effectué en utilisant une solution de NAOH (N/9) en présence de l'indicateur Phénolphtaléine (**Accolas et al., 1977**). On commence par la préparation de lait écrémé à 10% dans des flacons de capacité 250mL. Après stérilisation et refroidissement à la température d'ensemencement, chaque flacon estensemencé par une culture lactique. Après incubation à 37°C, à un

intervalle du temps 2 h, 4h, 6 h, 24 h et 72 h ; 10 ml du lait préalablement mélangé avec soin est prélevé puis titrer à l'aide d'une burette remplis par la soude Dornic(N/9) en présence de 2 à 3 gouttes de phénolphaléine (solution à 1% dans l'alcool éthylique à 95°C), jusqu'au virage de la couleur au rose pâle persistant au moins 10 secondes (**LARPENT, 1997**). L'acidité titrable mesurée est assimilée à des degrés Dornic (°D).

L'acidité est déterminée par la formule :

$$\text{Acidité (°D)} = V \text{ NaOH} \times 10$$

6. Adhésion *in vitro* au tissu épithélial

Pour étudier la capacité des lactobacilles probiotiques de s'adhérer à l'épithélium intestinal du poulet. Pour se faire, la méthode décrite par **Lin et al. (2007)**. Par trois étapes, a été impliquée :

- **Préparation des cellules épithéliales**

Avant de mettre en œuvre le test d'adhésion, un segment de l'iléum, ainsi qu'un segment de la muqueuse d'un poulet ont été ouverts et lavés avec du tampon stérile (PBS pH 7.2), puis tenus dans ce tampon à 4°C pendant 30 min pour être lavé. Par la suite, les tissus ont été repris, ouverts et laissés au repos pendant 5 min. Les cellules ont été récupérées en grattant la surface tapissant l'intestin (muqueuse) par une lame stérile. Des dilutions décimales ont été réalisées jusqu'à 10⁻⁴, cette suspension cellulaire a été examinée par microscope pour s'assurer qu'elle n'était pas contaminée et que la concentration des cellules épithéliales est approximativement de 5x10⁸ cellules/ml.

- **Préparation des cellules bactériennes**

Des cultures bactériennes jeunes sur bouillon MRS a été centrifugées à 6000 tr /10min et le culot de chaque souche a été récupéré dans 2 ml de PBS suivi d'une observation microscopique (Gx100) pour vérifier que le nombre soit approximativement de 10 cellules/ml.

- **Réalisation du test**

1ml de chaque culture standardisée est mélangé avec 1 ml de la dilution 10⁻⁴ de la suspension des cellules épithéliales déjà préparée (ou cellules de la muqueuse). Après incubation pendant 40 minutes, une préparation de frottis et une coloration au cristal violet pendant 5 min a été réalisé pour observer l'adhésion au microscope optique. Le test est considéré comme positif si le nombre de bactéries adhérees est supérieur 10 à 15.

1.Site de prélèvement

Les prélèvements effectués proviennent de femmes en activité sexuels, menstruées de 22-42ans (**tableau 09**), la majorité présente des signes d’une infection génitale qui peuvent être des pertes blanchâtres et/ou des démangeaisons (prurit) ainsi qu’une irritation vaginale. Nos prélèvements étaient choisis au hasard sans savoir l’état clinique de la femme.

Tableau 09 : Données fournies par le gynécologue sur les patientes (prélèvement)

Codification	Date de prélèvement	Age	Lieu de naissance	Durée de grossesse	N. D'accouchement	N. D'avortement	Prise d'antibiotique	Etat de santé
V1En1	12/12	37	Tébessa	9 mois	4ème	1	Non	Saine
V2En2	12/12	28	Békkaria	9 mois	4ème	0	Non	Saine
V3En3	12/12	22	Tébessa	9 mois	1ér	0	Non	Saine
V4En4	12/12	24	Ogla	9 mois	2ème	1	Non	Saine
V5Ex5	16/12	28	Tébessa	9 mois	2ème	1	Oui	Saine
V6En6	16/12	36	Békkaria	9 mois	2ème	0	Non	Saine
V6En7	16/12	33	Alger	9 mois	1ér	0	Non	Problème rénale
V7En8	16/12	38	Tébessa	9 mois	1ér	2	Non	Problème rénale
V8En9	06/01	40	Tébessa	9 mois	4ème	1	Oui	Problème rénale
V8En10	06/01	28	Tébessa	9 mois	2émé	1	Non	Saine
V9En11	06/01	37	Tébessa	9 mois	5émé	0	Oui	Problème rénale
V9En12	06/01	29	Tébessa	9 mois	1ér	0	Non	Problème rénale
V10Ex13	10/01	28	Tébessa	9 mois	1ér	0	Oui	Problème rénale
V11Ex14	10/01	36	Tébessa	9 mois	5ème	3	Oui	Problème rénale
V6En15	16/01	36	Tébessa	9 mois	3ème	1	Non	Saine
V6En16	16/01	42	Tébessa	9 mois	3ème	2	Non	Saine
V12Ex17	27/01	38	Tébessa	9 mois	3ème	0	Non	Saine
V13En18	27/01	32	Békkaria	9mois	2ème	1	Oui	Problème rénale
V13Ex19	01/02	22	Békkaria	9 mois	1ér	0	Non	Saine
V12Ex20	01/02	24	Tébessa	9 mois	1ér	0	Non	Saine
V3Ex21	07/02	26	Tébessa	9 mois	2ème	0	Non	Saine

2. Isolement et purification des souches bactériennes

Un nombre de 21 souches ont été isolées à partir de 40 échantillons et purifiées par repiquages successifs sur milieu MRS et M17. Les 21 bactéries suspectent d'être des bactéries lactiques gram positives et catalase négative.

3. Identification physiologique et biochimique des souches

Lors de cette étude nous avons Identifié les souches par les techniques phénotypiques conventionnelles basées sur les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques.

3.1. Etude morphologique

L'étude morphologique est effectuée dans un but de présomption du genre des souches isolées. Les figures montrent quelques exemples de résultats pour les aspects micro et macroscopiques des souches.

3.1.1. Examen macroscopique et microscopique

3.1.1.a. Caractérisation macroscopique

Un total de 21 souches ont été isolées et purifiées sur milieu MRS et M17. La caractérisation macroscopique, permet de décrire l'aspect des colonies obtenues sur milieux solides MRS et M17 après 48 h d'incubation à 37°C et de déterminer les critères relatifs aux colonies des bactéries lactiques (taille, pigmentation, contour, aspect, viscosité). Les caractères des colonies se diffèrent d'une souche à une autre. Les colonies formées sur milieu MRS solide des 9 souches isolées de sont de taille (d'environ 1 à 2 mm). Elles sont toutes pigmentées en vert d'eau ou vert clair, centre claire ou foncé, avec une surface lisse et un pourtour régulier et parfois irrégulier. Un autre aspect a été noté sur milieu M17 (12 souches) dont les colonies sont de taille moyenne parfois grande, crémeuses ou blanchâtres, avec une surface lisse et un pourtour régulier et aussi parfois irrégulier. Nos résultats indiquent que les cellules observées après coloration de Gram sont bleues voilettes pour tous les isolats sont de Gram positif. En étude similaire de **Drouault et Corthier (2001)**, que les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, et le test de catalase était négatif. Ces résultats concordent avec celles retrouvées par **Lairini et al., 2014**.

3.1.1.b. Caractérisation microscopique

L'observation microscopique des frottis après coloration de Gram a révélé plusieurs formes de cellules ; Cocci, bacilles de différentes tailles et ovoïdes. Ces formes sont disposées en paire, en grappe ou en chainettes plus ou moins longues. L'observation microscopique a révélé après coloration de Gram trois formes de cellules : 11 bactéries sont Cocci et 2 des Coco-bacilles et 8 des bacilles. Selon **Savadogo et Traore (2011)**, il existe deux grands groupes de bactéries lactiques morphologiquement bien distincts : les Cocci et les bacilles (**tableau 10**)

Tableau 10 : Caractéristiques phénotypique (macro-et microscopiques) des isolats lactiques

Isolat	Aspect Macroscopique					Aspect Microscopique		
	Origine prélèvement	Milieu	Taille	Pigment	Pourtour		Coloration de gram	Catalase
V1En1	V1En	M17	Petite 1mm	Blanchâtre	Régulier	Cocci en amas	Positif	Négatif
V2En2	V2En	MRS	Moyenne	Vert claire	Irrégulier	Cocci en chaînette	Positif	Négatif
V3En3	V3En	M17	Petite 1 à 2mm	Crème	Régulier	Bacile diplocoque	Positif	Négatif
V4En4	V4En	MRS	Grande entre 1 à 2mm	Verdâtre	Régulier	Bacile	Positif	Négatif
V5Ex5	V5Ex	M17	Petite 1mm	Brune	Régulier	Cocci en amas	Positif	Négatif
V6En6	V6En	MRS	Entre 1 et 2mm	Vert foncé	Régulier	Cocci	Positif	Négatif
V6En7	V6En	MRS	Moyenne 1mm	Turquoise	Irrégulier	Bacile	Positif	Négatif
V7En8	V7En	MRS	1mm	Vert d'eau	Régulier	Cocci diplocoque	Positif	Négatif
V8En9	V8En	MRS	Entre 1 et 2mm	Vert claire	Régulier	Cocci en chaînette	Positif	Négatif
V8En10	V8En	MRS	Moyenne	Vert claire	Régulier	Cocci diplocoque	Positif	Négatif
V9En11	V9En	M17	Entre 1 et 2mm	Brune	Irrégulier	Bacile	Positif	Négatif
V9En12	V9En	M17	Moyenne <1mm	Brune	Irrégulier	Cocco-bacile	Positif	Négatif
V10Ex13	V10Ex	M17	Petite <1mm	Crème	Régulier	Bacile	Positif	Négatif
V11Ex14	V11Ex	M17	Moyenne	Crème	Régulier	Cocci en petite chaînette	Positif	Négatif
V6En15	V6En	MRS	Petite	Turquoise	Irrégulier	Bacile	Positif	Négatif
V6En16	V6En	MRS	Moyenne > 1mm	Turquoise	Irrégulier	Cocco-bacile	Positif	Négatif
V12Ex17	V12Ex	M17	Grande > 2mm	Brune	Régulier	Bacile	Positif	Négatif
V13Ex18	V13Ex	M17	1mm	Brune	Régulier	Cocci en petite chaînette	Positif	Négatif
V13Ex19	V13Ex	M17	Entre 1 et 2mm	Brune	Régulier	Cocci en amas	Positif	Négatif

Résultats et discussions

V12Ex20	V12Ex	M17	Moyenne	Brune	Régulier	Cocci diplocoque, isolés en chaînette	Positif	Négatif
V3Ex21	V3Ex	M17	Grande	Blanchâtre	Irrégulier	Bacille en chaînette	Positif	Négatif

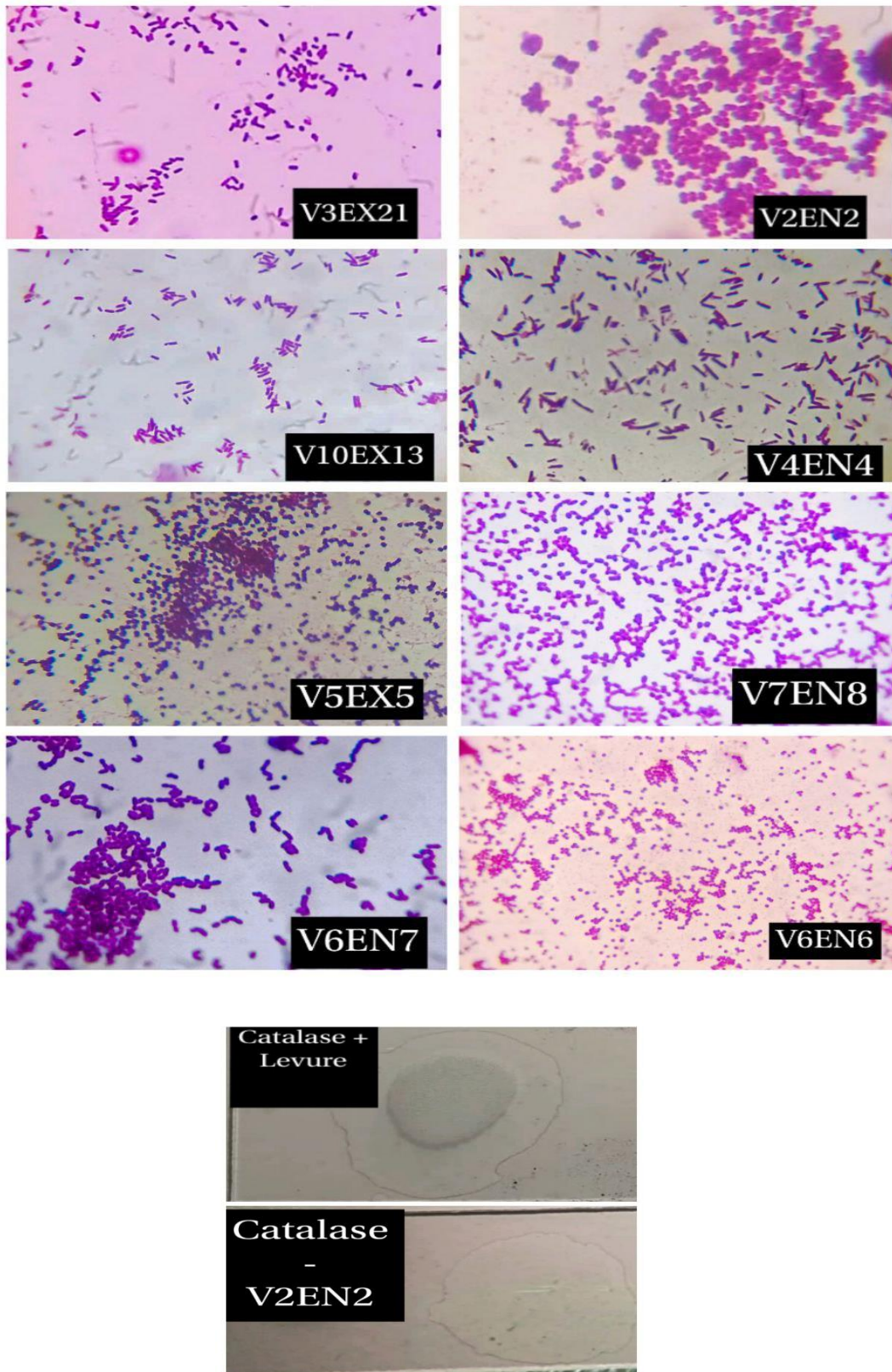


Figure 24 : Quelques aspects microscopiques des bactéries lactiques isolées après coloration de Gram (X100) et le résultat des tests de la catalase.



Figure 25 : Différents aspects phénotypiques des bactéries lactiques après mise en culture sur gélose (MRS et M17)

3. Test respiratoire

Le type fermentaire réalisé sur milieu de culture MRS liquide stérile, contenant une cloche de Durham, permet la différenciation entre deux groupes bactériens, les homo-fermentaires et les hétéro-fermentaires.

Les bactéries lactiques sont selon regroupées à trois groupes :

- Homofermentaire
- Hétérofermentaire facultatif
- Hétérofermentaire obligatoire

Ce test est important car il permet de distinguer les bactéries lactiques mésophiles des bactéries lactiques thermophiles (**Leveau et al., 1991**). L'aptitude à la culture est testée à :

- 37°C et 45°C (*lactobacilles*) sur milieu MRS (**Man et al., 1960**)
- 37°C (*leuconostocs*) sur milieu MRS
- 45°C (streptocoques, lactocoques et enterocoques) sur milieu M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**)

Les résultats obtenus ont montré que la production du gaz dans la cloche indique la souche est hétérofermentaire et dans le cas contraire elle est homofermentaire.

Selon (**Leveau et al., 1991**), L'emploi de ce test permet de diviser les souches en deux groupes : groupe des souches mésophiles et le groupes des souches thermophiles L'aptitude à la culture est testée à :

- 37°C et 45°C (*lactobacilles*) sur milieu MRS (**Man et al., 1960**)
- 37°C (*leuconostocs*) sur milieu MRS
- 45°C (*streptocoques, lactocoques et enterocoques*) sur milieu M17 (**Terzaghi et Sandine, 1975**)

La croissance est appréciée par l'apparition de trouble

D'après les résultats (**Tableau 11**), la majorité des souches testées sont signalées thermophiles, il apparaît que vingt souches sont capables de croître à 45°C donc ce sont des souches Hétérofermentaire de type thermophile, alors que le seul souche V12Ex17 est capables de pousser à des températures basse (37 et 15°C), ce qui les qualifie de se classer parmi les espèces homofermentaires de type mésophile.

Les homofermentaire sont généralement composées des genres de *lactobacillus* ce qui est corrèle avec nos résultats de (**König et al., 2009**) qui indiquent que les souches qui se

manifestées par la production de gaz au cours de la fermentation sous l'aspect microscopique se sont des bacilles

Le test n'est pas le but de l'identification seulement mais aussi c'est la valorisation de l'activité.

Les bactéries lactiques présentent des activités métaboliques assez diversifiées et une capacité d'adaptation à différents environnements. Cette diversité est responsable de leur large gamme d'applications à l'échelle industrielle (**Streit et al, 2007**)

D'autre part, selon (**Känig et al., 2009**) les homofermentaire se sont les plus adaptées à l'industrie laitière par la production de l'acide lactique massive alors que les souches hétérofermentaire sont plus adaptées à la production des boissons alcooliques

Tableau 11 : Profils biochimique des souches isolées

Tm °C	15°C		37°C		45°C	
	Gaz	Croissance	Gaz	Croissance	Gaz	Croissance
V1En1	-	-	+	-	++++	+++
V2En2	+	++	-	++	++++	-
V3En3	-	+++	++	++	+	-
V4En4	-	-	+	++	+	+
V5Ex5	-	+	+	+++	+	+++
V6Ex6	-	-	++	++++	+	++
V6En7	-	-	++++	++++	+++++	+++++
V7En8	-	+	++++	++++	++	++++
V8En9	+	-	+	++++	++	++++
V8En10	-	-	++	++++	+++	++++
V9En11	++	++	+++	+++	+++	+++
V9En12	-	+++++	++	++++	+++++	+++++
V10Ex13	+	++++	++	+++	+++++	++
V11Ex14	+	+++	+	+++	+	++
V6En15	+	-	+++	+++	+++	+++
V6En16	+	-	+++	+++	++++	++++
V12Ex17	+	+	+++	++++	-	++++
V13En18	+	++	++	++	+	++
V13Ex19	+	-	+	++++	+	+
V12Ex20	+	+	+	++	+	++
V3Ex21	+	+++	+++	+++	+	++



Figure 26 : Résultat du type fermentaire pour les isolats (test production du CO₂).

4. Identification biochimique des souches isolées

❖ Le système API 20E

On a réalisé le test d'API20E uniquement de 9 souches isolées, les résultats sont rapportés dans le tableau 12

Selon les résultats obtenus : Les glucides ont été utilisés différemment par les 09 souches.

En effet, le saccharose sont été fermenté par l'ensemble des souches V1En1, V2En2, V6En7, V6En16, V4En4, V12Ex20, V12Ex19, tandis que tous les 9 souches capable de faire la production d'acétone.

Tous les isolats capables de dégradée l'arginine par lysine de carboxylase sauf V6En7, V13En18. Donc la dégradation des sucres par les souches isolées Et moindres.

La présence de l'uréase qui provoque la réaction de transformation de l'urée en dioxyde de carbone et ammoniac

Cette enzyme est un critère biochimique de différenciation très utilisé lors de l'identification bactérienne.

Le maltose se trouve dans la bière, les céréales, les pâtes, les pommes de terre et beaucoup d'autres produits au goût sucré qui forment la dégradation de l'amidon et du glycogène avec l' α -amylase. On l'appelle également sucre de malt et il est surtout utilisé dans l'industrie pour fermenter des aliments. Il est composé de 2 molécules de glucose.

En tant qu'enzyme industrielle, l'amylase, il est utilisé par l'industrie agroalimentaire pour différentes raisons : rendre les liquides fermentés plus clairs, éliminer et transformer l'amidon, ou accélérer la levée de la pâte à pain.

La classification elle était effectuées ne pas pour l'identification mais pour la recherche d'activité enzymatique. Donc, Les souches qui donnent une activité plus enzymatique (l'équipement enzymatique) sont : V1En1, V2En2, V4En4, V6En7, V6En16 et les plus adaptés à l'industrie au niveau de 03 vagues importantes qui sont : la production des acides, la production des protéines et la production des lipides. Elles sont très importantes au point de vue technologique, et aussi un rôle de la préparation des laitages fermentés, et surtout également dans le saumurage viandes et des salaisons.

Tableau 12 : Résultats des différentes testes d'identification des souches isolées

Code des souches	ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA
V13En18	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
V12Ex20	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
V12Ex17	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
V3Ex21	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+
V4En4	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V2En2	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V1En1	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V6En16	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V6En7	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+

+ : Test positif

- : Test négatif



Figure 27 : Caractérisation biochimique par la galerie Api 20 de quelques souches

5. Étude des aptitudes probiotiques des bactéries lactiques isolées

5.1. Étude du pouvoir antagoniste des bactéries lactiques

L'évaluation du pouvoir antagoniste de 21 isolats lactiques a été étudié vis-à-vis quatre souches cibles, indicatrices, à savoir *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus*, *Escherichia coli*, et *Pseudomonas aerogenosa*, par la méthode directe (méthode de spot) (**Figure 29**) L'inhibition se traduit par la formation d'une zone claire autour des souches lactiques déposées (spot).

Ces résultats (**Tableau 13**) indiquent que les isolats lactiques sont capables de synthétiser des substances inhibitrices ayant une activité antibactérienne. Les résultats des interactions ont montré que la majorité des souches isolées possèdent un effet inhibiteur contre les pathogènes utilisées mais avec un effet plus ou moins différents.

-L'isolat V2EN2 possédant une activité antimicrobienne contre toutes les souches indicatrices, en parallèle les souches (V1En1, V4En4, V7En8, V8En10, V8En9, V9En11, V6En15, V13Ex18, V13Ex19, V12Ex20 V3Ex21) n'ont pas formés des zones claires, cela indique qu'elles ne possèdent pas une activité antimicrobienne contre eux. Selon Méthode de **Barefoot et Kaenhammer (1983)**, Dans ce test, aucune zone d'inhibition n'a été observée autour des puits, que ce soit dans le cas de l'utilisation des cultures de bactéries ou des filtrats de cultures de bactéries et ceci malgré de nombreuses répétitions.

-V5ex5 possèdent un effet inhibiteur seulement contre les *Micrococcus* se traduit par la formation des zones claires de diamètres de zones d'inhibitions de 9.2 mm, nous avons remarqué des zones d'inhibitions assez réduites de 10 mm voire même aucune inhibition, ce qui est en accord avec les travaux de **Georgieva et al. 2015**

-V11EX14 possédant une activité inhibitrice seulement contre *Micrococcus*, avec une zone claire de diamètre entre 11.8 mm et 12 mm

-La souche V6En16 possédant une activité antimicrobienne contre les souches indicatrices sauf *Micrococcus*, en contraire V12Ex17 possède un effet inhibiteur contre les pathogènes sauf *Pseudomonas*

Selon **Labioui et al., (2005)**, les bactéries Gam+ sont généralement plus sensibles à l'effet antimicrobien des bactéries lactiques que les Gram -, à l'exception de quelques

bactéries à Gram +, qui sont résistantes à l'effet antimicrobien car elles ont une membrane de composition différente de celle des cellules sensibles. Cette activité antimicrobienne ne se concorde pas avec les travaux des autres chercheurs dont **Dubois (1982) ; Hadeb (2012) ; Elmoualdi (2007)** qui ont trouvé que le spectre d'action des bactéries lactiques isolée de différents biotopes est plus important envers les Grams positif que les Grams négatif

En revanche, **Heikkila et al., (2003)** ont trouvé un effet antagoniste des bactéries isolé à partir de lait maternel plus faible dont les diamètres des zones d'inhibition entre 1 et 2 m

Tableau 13 : Spectre d'activité antimicrobienne des souches lactiques

Les souches lactiques qui contient une activité	Les souches pathogènes avec les diamètres des zones d'inhibition			
	E-Coli	Staphylococcus	Micrococcus	Pseudomonace
V2EN2	10.12	9.6	9.8	9.2
V5EX5	/	/	9.6	/
V6EN6	9.4	/	9.4	/
V6EN16	10.26	10.32	/	9.6
V11EX14	/	/	11.8	/
V12EX17	10.26	10.32	9.4	/

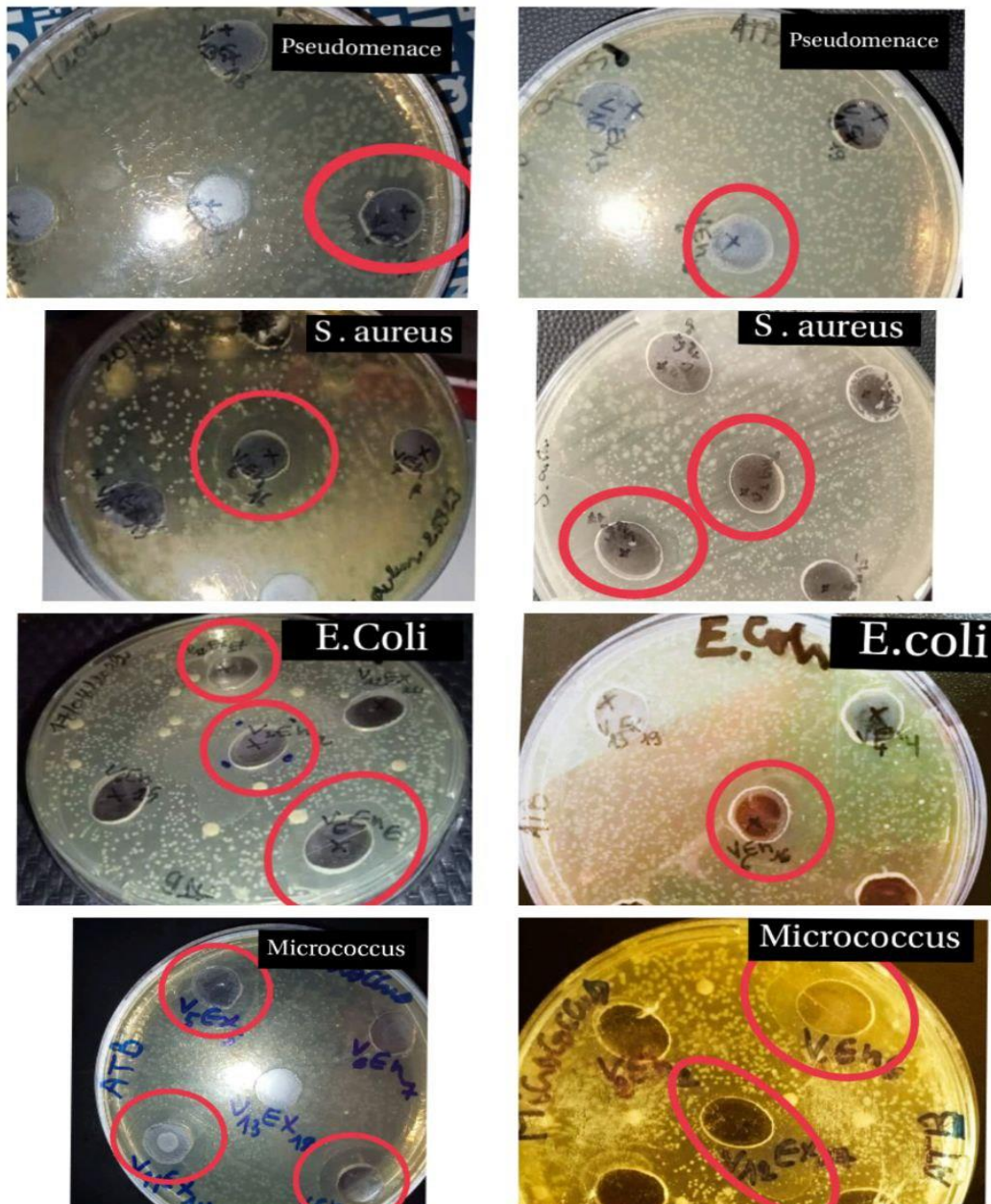


Figure 28 : Activité antibactérienne des bactéries lactiques par la méthode de spot vis-à-vis des souches pathogènes

5.2. Tests de survie des bactéries lactiques

5.2.1. Résistance aux différentes concentrations de NaCl

La croissance en présence de différentes concentrations de chlorure de sodium (NaCl) donne des renseignements précieux pour l'identification. Les cultures à tester ont été ensemencées sur des bouillons hypersalés à 4% et à 6.5% et 10% de NaCl Les résultats sont marqués dans le (**tableau 14**)

Nous avons réalisé des tests de croissance des souches en absence ainsi qu'en présence de NaCl à différentes concentrations (4%, 6.5 et 10 %).

Après incubation à 37°C pendant 24h à 48h, on observe un trouble bactérien pour certaines concentrations de sel. Cela indique que la croissance est différente d'une souche à une autre, même si celles-ci proviennent de la même source d'isolement.

Les résultats montrent que toutes les souches ont donné des résultats positifs sur le bouillon hypersalé à 4%, on remarque que les souches (V1En1, V4En4, V4Ex5, V6En6, V6En7, V8En9, V11Ex14, V6En15, V12Ex17, V12EX17, V13EX18, V13EX19 et V12EX20) sont capables de pousser et de tolérer les différentes concentrations de NaCl 4%, 6.5% et 10% sauf la souche V10Ex13 ne tolère pas à la concentration 6.5% de NaCl et les souches : (V2En2 , V3En3, V7En8, V8En10, V9En11 , V9En12, V6En16, V3Ex21) ne donne aucune croissance à 10%.

5.2.2. Résistance aux différents pH

Ce test préliminaire a été réalisé pour déterminer le degré de résistance des bactéries lactiques aux milieux acides. Le tableau présente les résultats obtenus, relatifs à la croissance de nos souches lactiques sur les milieux à pH2 et pH9. Ce test permet de distinguer les souches qui se développent ou non en milieu basique. Les bouillons MRS et M17 sont ajustés à pH 9,6 et les tubes sont incubés à 37°C pendant 48 h. (GUIRAUD, 2003)

Les résultats indiquent que toutes les souches n'étaient pas viables à pH 2 mais survivent à pH 9, tandis que la souche V10EX13 ne donne aucune croissance à pH 2 et 9. Ces résultats étaient en corrélation avec des données antérieures de **Huang et Adams, 2004 ; Klingberg et al., 2005 ; Paramithiotis et al., 2006** qui rapportaient l'absence de viabilité bactérienne à un pH=2

Tableau 14 : Les caractéristiques physiologiques des souches isolées

Codification	4%	6.5%	10%	Ph = 2	Ph = 9
V1EN1	+	+	+	-	+
V2EN2	+	+	-	-	+
V3EN3	+	+	-	-	+
V4EN4	+	+	+	-	+
V5EX5	+	+	+	-	+
V6EN6	+	+	+	-	+
V6EN7	+	+	+	-	+
V7EN8	+	+	-	-	+
V8EN9	+	+	+	-	+
V8EN10	+	+	-	-	+
V9EN11	+	+	-	-	+
V9EN12	+	+	-	-	+
V10EX13	+	-	+	-	-
V11EX14	+	+	+	-	+
V6EN15	+	+	+	-	+
V6EN16	+	+	-	-	+
V12EX17	+	+	+	-	+
V13EX18	+	+	+	-	+
V13EX19	+	+	+	-	+
V12EX20	+	+	+	-	+
V3EX21	+	+	-	-	+

Croissance (trouble) : +

pas de croissance : -

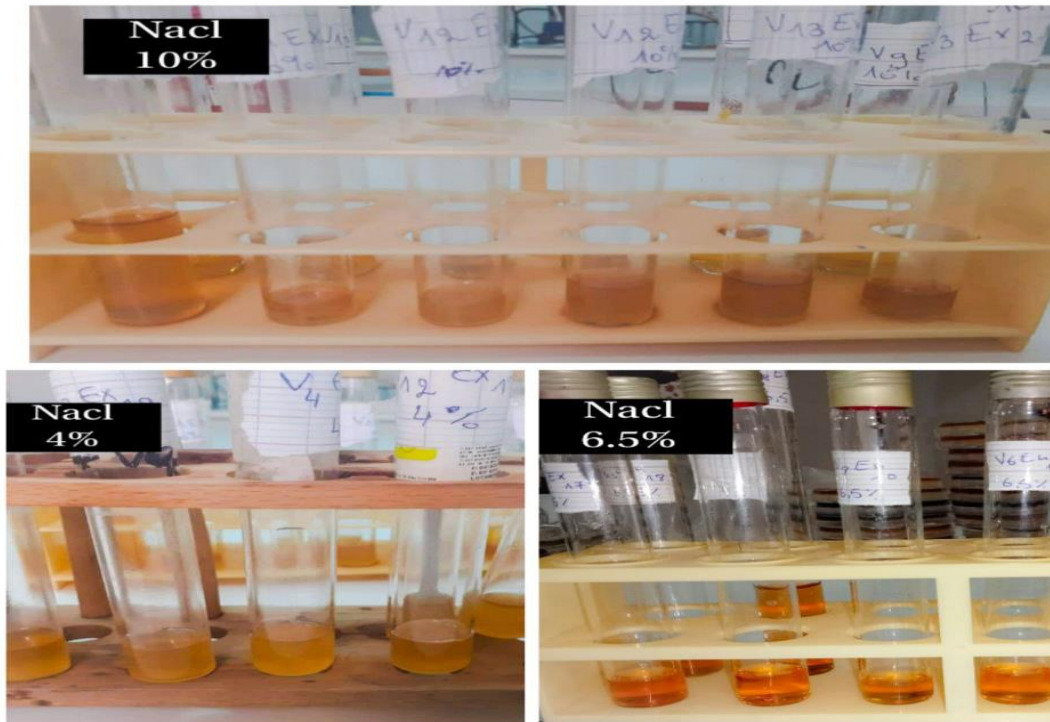


Figure 29 : Résultats des test physiologiques

5.3. Analyse des caractères de surface cellulaire

5.3.a. Hydrophobicité de la surface cellulaire

L'hydrophobicité d'une bactérie est due en grande partie à la nature des composés présents à sa surface. Pour évaluer l'hydrophobicité de la surface des bactéries une étude de l'affinité de ces souches au xylène a été Utilisée. L'hydrophobicité des cellules bactériennes a été mesurée à l'issue d'une phase aqueuse. Selon **Anwar et al., (2013)**, les bactéries sont hydrophobes si le pourcentage d'affinité au xylène est élevé ($A\% > 50$) et selon Belon-fontaine et al, hydrophile quand pourcentage est compris entre ces deux valeurs la bactérie est moyennement hydrophobe. De ce fait, l'acide lipotéichoïque est impliqué dans les interactions hydrophobes. Ces dernières jouent un rôle important dans l'adhésion de ces bactéries sur un support hydrophobe, ont rapporté que la présence de matériel protéique (Glycol) entraîne une augmentation d'hydrophobie, alors que les surfaces hydrophiles sont associées à la présence de polysaccharides. Selon **Kos et al. (2003)**, l'adhérence microbienne aux solvants reflète le caractère hydrophobe de la surface cellulaire ou hydrophile parce que les interactions électrostatiques sont absentes. Le caractère hydrophobe de surface a été déterminé afin de vérifier une éventuelle concordance entre propriété physico-chimique et la capacité d'adhérer à la muqueuse intestinale comme suggéré par **Wadstrom et al. (1987)** et **Ngwai et al. (2006)** qui ont rapporté que les propriétés physico-chimiques telles que l'hydrophobie jouent un rôle majeur dans l'interaction initiale avec le tissu hôte.

Plusieurs auteurs ont rapporté que l'hydrophobicité peut augmenter avec le taux de protéines membranaires présentes à la surface de la bactérie et diminuer par la présence de composés de nature polysaccharidique, l'hydrophobicité des bactéries peut différer entre les espèces avec la variation de l'état physiologique des cellules et la composition des milieux de culture.

Les résultats montrés dans le (**Tableau 15**) que les quatre souches des bactéries lactiques en présentant un caractère très hydrophobe sont V4Ex4, V6En7, V10Ex13, V11Ex14 Car leur affinité pour Xylène entre 80-85, et les Trois souches lactique hydrophobe sont V9En9, V12Ex17, V3Ex26, car le pourcentage d'affinité au Xylène $A\% > 50$, et les 15 souches lactique V1En1, V2En2V3En3, V5Ex5, V6En6, V6En15,

V6En16, V9En11, V8En10, V7En8, V9En12, V13Ex18, V13Ex19, V12Ex20
moyenne hydrophobe (hydrophile)

Tableau 15 : Pourcentage d'hydrophobicité des isolats lactique

Les souches des bactéries Lactiques	DO ₆	DO ₃₀	Hydrophobie
V1En1	0,055	0,080	45,45%
V2En2	0,581	0,816	40,44%
V3En3	0,124	0,111	10,48%
V4En4	0,488	0,073	85,04%
V5Ex5	0,404	0,482	19,30%
V6En6	0,208	0,235	12,98%
V6En7	0,432	0,803	85,87%
V6En15	0,406	0,445	9,60%
V6En16	0,417	0,604	44,84%
V7En8	0,334	0,214	35,92%
V8En10	0,343	0,409	19,24%
V8En9	0,449	0,804	79,06%
V10Ex13	0,439	0,804	83,14%
V9En11	0,479	0,534	11,48%
V11Ex14	0,350	0,650	85,71%
V9En12	0,454	0,431	5,06%
V12Ex17	0,344	0,554	61,04%
V13Ex18	0,420	0,263	37,38%
V12Ex20	0,374	0,200	46,52%
V13Ex19	0,403	0,510	26,55%
V3Ex21	0,540	0,866	60,37%

5.3.b Test de l'auto-agrégation

Potentiel d'auto-agrégation des cellules joue un rôle important dans l'adhésion aux cellules intestinales (**Dunne et al., 2001**), et dans la prévention de la colonisation par des agents pathogènes (**Boris et al., 1998**). L'auto-agrégation est la capacité des bactéries à interagir de manière non spécifique, condition préalable à la colonisation et à la persistance du tractus gastro-intestinal (**Del Re et al., 2000**). Les résultats sont présentés dans le (**tableau 16**)

Il s'avère que les souches (V3EN3, V6En6, V6en7, V7EN8, V8EN9, V8EN10, V9EN11, V9EN12, V12EX20, V3EX21) présentent des niveaux d'auto-agrégation

plus élevés (>80 %). Avec les souches (V1EN1, V2EN2, V4EN4, V11EX14, V6EN15, V13EX18) se situent dans intervalle [60% à 80%]

Par ailleurs, l'ensemble des souches V5EX5, V10EX13, v6en16, et V13EX19 montre une auto-agrégation modérée avec des pourcentages de 57.29%, 50%, 46.71% et 45.26% respectivement.

Nos résultats sont accordés avec **Del Re et al.,2000** qui rapportés, que les probiotiques devraient avoir un potentiel d'auto-agrégation supérieure à 40%. **Kassaa et al., 2014**, qui rapporté des valeurs d'auto-agrégation de 30 à 76% de différentes souches de *Lactobacillus*.

Une forte auto-agrégation montre le caractère hydrophobe élevé des surfaces de souches lactique tandis qu'une faible auto-agrégation montre des surfaces cellulaires hydrophiles.

Tableau 16 : Pourcentage d'auto-agrégation des souches lactiques

Codification	Do initiale	Do après un heure	% d'auto-agrégation
V1EN1	0.503	0.100	79.72
V2EN2	0.601	0.122	79.20
V3EN3	0.775	0.079	89.53
V4EN4	0.852	0.125	75.82
V5EX5	0.466	0.199	57.29
V6EN6	0.767	0.122	83.96
V6EN7	0.827	0.066	92.69
V7EN8	0.801	0.065	91.88
V8EN9	0.782	0.116	85.18
V8EN10	0.814	0.106	86.97
V9EN11	0.844	0.153	81.87
V9EN12	0.815	0.045	94.47
V10EX13	0.402	0.201	50
V11EX14	0.786	0.191	75.96
V6EN15	0.601	0.144	76.03
V6EN16	0.402	0.199	50.37
V12EX17	0.411	0.219	46.71
V13EX18	0.611	0.213	65.13
V13EX19	0.422	0.231	45.26
V12EX20	0.817	0.066	91.92
V3EX21	0.827	0.114	86.21

5.3.c. Test de la co-agrégation

La co-agrégation détermine le pouvoir des cellules de la bactérie probiotique de se lier aux cellules de la bactérie pathogène. La capacité de Co-agrégation est la faculté de former une barrière qui empêche la colonisation par des microorganismes pathogènes.

Les isolats sont potentiellement probiotiques qu'ant le pourcentage de co-agrégation est élevé en dépassant 50% de co-agrégation.

Les résultats obtenus dans (**le Tableau 17**) montrent que la co-agrégation des cellules d'un isolat qui a montré un pourcentage élevé de co-agrégation(V12Ex20) par 95,34% à la souche pathogène *E. coli*, tandis que L'isolant (V9En9) qui a exprimé un faible taux de co-agrégation (1,76%) au *Micrococcus*.

En général, les souches lactiques ont présenté une variabilité de Co-agrégation aux pathogènes sélectionnés (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *E. coli*). Les souches V3Ex21, V6En15, V9En12, V6En6, V5Ex5 ont excès les niveaux les plus élevés de co-agrégation avec *Staphylococcus*, *Pseudomonas* et *E. Coli* respectivement tandis que la co-agrégation des autres souches variait entre 1% et 95%.

Les bactéries lactiques probiotiques présentent un réel intérêt dans leur propriété à réduire l'adhésion de microorganismes aux muqueuses intestinales et vaginales (**Spurbeck et arvidson, 2008**). Elles peuvent agir sur les muqueuses en stimulant la production de mucus, entrer en compétition pour les sites d'adhésion des pathogènes ou agir directement sur le pathogène lui-même en bloquant son interaction avec l'épithélium, notamment par leur capacité d'auto- et de co-agrégation

Tableau 17 : Pourcentage de la co-agrégation entre les souches lactiques vaginales et les souches pathogènes

BL	DOBL	Pseudomonas	Micrococcus	E. coli	Staphylococcus	DOBL + pseudomonas	DOBL + Micrococcus	DOBL + E. coli	DOBL + Staphylococcus
V1En1	0,177	0,923	0,224	0,933	0,338	0,940	0,363	0,101	0,232
V2En2	0,164	0,908	0,246	0,934	0,062	0,942	0,265	0,952	0,129
V3En3	0,167	0,940	0,052	0,920	0,019	0,983	0,152	0,960	0,161
V4En4	0,813	0,994	0,167	0,944	0,022	0,998	0,193	0,979	0,047
V5Ex5	0,122	0,941	0,232	0,932	0,160	0,963	0,128	0,957	0,167
V6En6	0,148	0,908	0,246	0,932	0,356	0,965	0,068	0,959	0,069
V6En7	0,142	0,940	0,221	0,918	0,045	0,968	0,104	0,968	0,120
V6En15	0,138	0,915	0,025	0,950	0,037	0,966	0,099	0,960	0,133
V6En16	0,154	0,914	0,056	0,946	0,118	0,924	0,186	0,974	0,184
V7En8	0,158	0,900	0,022	0,969	0,139	0,930	0,146	0,976	0,168
V8En10	0,18	0,939	0,166	0,914	0,185	0,970	0,046	0,925	0,089
V9En9	0,144	0,960	0,139	0,903	0,100	0,969	0,034	0,920	0,286
V9En11	0,166	0,937	0,012	0,966	0,160	0,989	0,076	0,981	0,176
V9En12	0,148	0,927	0,001	0,943	0,107	0,945	0,023	0,951	0,211
V10Ex13	0,110	0,946	0,006	0,911	0,182	0,958	0,034	0,924	0,106
V11Ex14	0,140	0,988	0,023	0,902	0,015	0,992	0,461	0,913	0,051
V12Ex17	0,193	0,901	0,246	0,922	0,238	0,981	0,120	0,330	0,121
V12Ex20	0,152	0,946	0,076	0,958	0,046	0,956	0,210	1,059	0,176
V13Ex18	0,167	0,955	0,025	0,949	0,038	0,963	0,067	1,069	0,150
V13Ex19	0,154	0,967	0,128	0,977	0,053	0,977	0,05	1,090	0,151
V3Ex21	0,133	0,909	0,056	0,917	0,109	0,919	0,113	0,951	0,195

Co-agrégation Pseudomonas	Co-agrégation Micrococcus	Co-agrégation E. coli	Co-agrégation Staphylococcus
70,90%	81,04%	81,80%	9,90%
70,74%	46%	73,40%	14,15%
77,59%	38,3%	76,73%	73,11%
10,45%	56,13%	9,88%	88,74%
81,18%	89,79%	80,26%	18,43%
82,76%	27,68%	76,47%	72,61%
78,92%	65,48%	76,36%	28,34%
83,47%	42,69%	72,57%	52%
73,03%	21,47%	68,64%	35,29%
75,80%	35,76%	75,74%	13,13%
75,54%	85,40%	73,32%	39,24%
75,70%	1,76%	75,92%	48,18%
67,44%	86,51%	80,21%	32,33%

83,01%	98,65%	77,10%	65,49%
11,34%	3,44%	40,80%	27,39%
75,04%	55,21%	90,81%	34,11%
74,30%	7,65%	89,78%	43,85%
73,26%	3,50%	95,34%	77,77%
69,94%	30,20%	81,14%	46,34%
79,34%	63,23%	90,16%	55,88%
75,53%	19,57%	81,1%	61,15%

5.4. Etude des aptitudes technologiques des bactéries lactiques

Pouvoir acidifiant

Afin d'étudier l'activité des isolats de bactéries lactiques, l'évolution de l'acidité Dornic et du pH au cours de leur croissance dans le lait a été suivie toutes les 2h et 4h pendant 6h et après 24h et 72 h. Les résultats obtenus sont illustrés dans la Tableau D'après ces résultats (**Tableau 18**), nous observons, dans un premier temps, deux heures et 4 h après incubation, les valeurs varient entre (6.09-6.70), en parallèle les valeurs d'acidité se situant dans l'intervalle (10-70), qui explique une faible acidification. Après 6h d'incubation le pH a continué de baisser pour tous les isolats avec augmentation d'acide lactique atteignent 80°D qui explique d'une moyenne acidification, après 24h d'incubation, le pH des V1En1, V2En2, V3En3 et V5Ex5 à atteint ces valeurs 4.83,4.63,5,05 et 5,02 respectivement avec d'intervalle entre 50 à 200 °D, Cette baisse est due probablement à une contamination et multiplication microbienne juste après l'ouverture de l'emballage. Après 72 h, on remarque que l'abaissement de ph (4,06-5,58), nous assure qu'une partie du lactose du lait s'est dégradée en acide lactique, ce qui entraîne une augmentation de la concentration du lait en ions hydronium (H3O+) donc une diminution du pH, car : $pH = \log 1 / [H_3O^+]$, en parallèle l'augmentation d'acidité 80 à 413°D, qui explique d'une forte acidification.

Selon (**Zadi-Karam, 1998**), qui indiquent que Les souches de *Lactococcus lactis ssp lactis* présentent l'activité acidifiante la plus élevée par rapport aux autres espèces. Elles sont fortement acidifiantes et produisent des quantités d'acide lactique allant jusqu'à 9,7 g/l

La fonction acidifiante constitue donc la propriété métabolique la plus recherchée des bactéries lactiques utilisées dans les industries agro-alimentaires car elle est considérée comme un critère primordial de sélection des souches à intérêt. Le suivi de l'activité acidifiante des souches étudiées a été réalisé sur le milieu lait écrémé stérilisé

Tableau 18 : Evolution de pH et de l'acidité (en °D) des isolats testés au cours du temps

Les souches	PH					Acidité Dornic				
	2 heures	4 heures	6 heures	24 heures	72 heures	2 heures	4 heures	6 heures	24 heures	72 heures
V1en1	6.59	6.43	6.42	4.83	4.80	25	30	40	100	315
V2en2	6.48	6.34	6.32	4.63	4.61	35	40	60	200	270
V3en3	6.51	6.36	6.32	5.05	5.00	35	45	48	150	160
V4en4	6.49	6.39	6.34	5.56	4.94	30	35	39	70	115
V5ex5	6.5	6.45	6.42	5.02	5.01	20	25	30	90	305
V6en6	6.7	6.38	6.31	5.47	5.40	25	40	45	105	120
V6en7	6.42	6.40	6.36	5.64	5.37	20	35	42	50	107
V7en8	6.55	6.36	6.30	5.75	5.72	50	55	70	75	78
V8en9	6.47	6.37	6.35	5.72	5.46	20	40	60	80	88
V8en10	6.7	6.41	6.38	5.96	4.9	10	25	50	100	145
V9en11	6.39	6.35	6.33	6.41	5.58	40	45	52	95	102
V9en12	6.36	6.28	6.25	5.29	4.33	40	50	60	90	252
V10ex13	6.29	6.20	6.18	5.12	4.08	40	50	55	75	413
V11ex14	6.39	6.30	6.28	5.41	4.06	45	60	80	110	275
V6en15	6.41	6.40	6.37	5.36	4.26	40	30	50	80	210
V6en16	6.14	6.09	6.05	6.00	4.45	40	25	30	55	148
V12ex17	6.29	6.20	6.16	5.52	5.14	40	35	45	85	140
V13ex18	6.25	6.20	6.18	5.21	4.33	45	40	60	130	335
V13ex19	6.33	6.30	6.26	5.29	4.99	50	30	60	90	400
V12ex20	6.28	6.22	6.20	5.41	4.26	70	40	70	103	185
V3ex21	6.35	6.33	6.30	5.39	4.62	60	50	55	110	202

6.L'adhésion in vitro au tissu épithélial

L'adhésion est un processus complexe, qui peut comprendre des mécanismes ligand-récepteur non- spécifiques et spécifiques (Cayuela et al., 2014). Des facteurs tels que les protéines, les glycoprotéines, sur la surface de la paroi cellulaire des bactéries ont été impliquées dans la capacité d'adhérence, d'auto- agrégation et d'hydrophobicité. La capacité d'adhérer aux cellules épithéliales des muqueuses et des surfaces a été suggérée comme une propriété importante lors de la sélection de souches probiotiques. Les résultats obtenus sont illustrés dans les (figures 31)

Les résultats montrés que l'adhésion des souches : V8en10, V12Ex20, V13Ex18, V6En15, V9En12, V9En11, V6En7, V3En3, V7En8, V4En4, V8En9, V6En6 et V2En2 ont une capacité élevée d'adhésion aux cellules épithéliales de poulet. Après 40 min d'incubation à 37°C, les souches V2En2, V3Ex21, V13ex19, atteint une moyenne de cellules bactériennes, leur mixture a montré une moyenne maximale de 150 cellules bactériennes par cellule épithéliale. **Wang et al. (2010)** ont prétendu que les conclusions tirées des résultats des études in vitro ne peuvent être appliquées directement aux situations in vivo. Il a été montré qu'il existe une relation entre la capacité d'adhérence et la colonisation provisoire de l'intestin humain.

D'après certains auteurs, l'origine des probiotiques joue un rôle dans les capacités d'adhérences, il a été trouvé que les bactéries d'origine humaine peuvent adhérer mieux aux muqueuses intestinales de l'homme (**Gu et al., 2008**). Cependant **Kimoto-nira et al. (2009)** ont constaté que des souches de *Lactococcus* (*Lc. lactis ssp. lactis* et *Lc. lactis ssp. cremoris*) isolées de divers produits laitiers, peuvent adhérer aux cellules épithéliales intestinales humaines.

De nombreux facteurs sont susceptibles d'influer l'adhésion des bactéries probiotiques. Certains de ces facteurs sont liés au mode de culture adopté in vitro : la concentration bactérienne, la composition du tampon, le temps d'incubation et le milieu de croissance. D'autres facteurs influençant l'adhérence sont liés aux conditions in vivo : la microflore intestinale normale, la digestion et la matrice alimentaire (**Arthur et al., 2003**).

Une relation entre l'hydrophobicité et l'adhésion des lactobacilles aux solvants a été montrée par **Pascual et al. (2008)** dont la surface hydrophile chargée négativement est responsable d'une faible adhésion, mais les souches qui ont une surface hydrophobe chargé positivement adhérent fortement

Tableau 19 : Adhésion des ferments mixtes et souches pures aux cellules épithéliales

Les souches	Test
V1En1	+
V2EN2	+
V3EN3	++
V4EN4	+
V5EX5	+
V6EN6	+
V6EN7	++
V7EN8	++
V8EN9	++
V8EN10	++
V9EN11	+
V9EN12	+
V10EX13	-
V11EX14	+
V6EN15	+
V6EN16	-
V12EX17	-
V13EX18	+
V13EX19	-
V12EX20	++
V3EX21	++

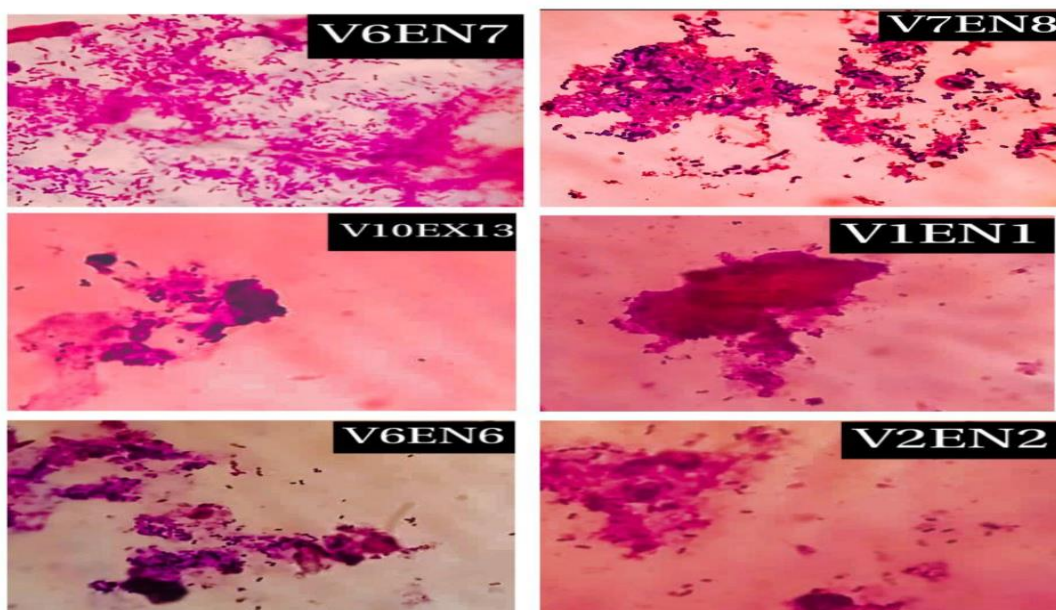


Figure 30 : Photo microscopie des cellules épithéliales d'origine animales (cellule épithéliale de poulet)

Depuis l'antiquité, les bactéries lactiques ont été utilisées pour la fabrication et la conservation d'aliments. Le but de cette étude était de mettre en place une collection de souches de bactéries lactiques isolées de la cavité vaginale dans le but d'évaluer leurs potentiels probiotiques. A l'issue de ce qui a été réalisé, vingt-huit (21) souches ont été isolées, purifiées et identifiées à partir de la cavité vaginale de la femme de la Wilaya de Tébessa.

L'identification des souches a été réalisée par la détermination des caractéristiques morphologiques, physiologiques et biochimiques. La majorité était des *Lactobacillus*. D'après les résultats de l'étude des aptitudes technologiques, nous avons pu déduire que, qu'il existe des variations entre les souches autant au niveau de l'activité acidifiante. Cependant, les souches avaient de bonnes fonctionnalités technologiques.

Pour la sélection des souches, nous avons développé une stratégie permettant d'isoler les bactéries aux propriétés probiotiques de l'écosystème vaginal, les principaux critères sont, l'effet des facteurs physiques (Température, pH et NaCl), l'adhésion aux cellules épithéliales vaginales, et la capacité d'agrégation, l'inhibition des principaux pathogènes.

Les résultats à mettre en évidence les mécanismes par lesquels nos probiotiques vaginaux jouent le rôle de protection de l'écosystème vaginal, il s'agit des mécanismes du blocage d'adhésion des pathogènes, Ainsi que, la détermination des facteurs affectant l'adhésion et l'auto agrégation par l'étude de l'hydrophobie/l'hydrophilie de la surface, l'effet des traitements physiques (température et autoclavage).

A travers les résultats obtenus, nous concluons que le test d'adhésion aux cellules épithéliales vaginales a montré que nos souches possèdent un pouvoir adhésif très remarquable, d'ailleurs l'adhérence aux CEV varie considérablement entre les souches.

Enfin notre présente étude s'inscrit dans une perspective d'une future utilisation des souches probiotiques sélectionnées dans le contrôle des infections vaginales, par conséquent d'autres études sont nécessaires pour justifier leur emploi en tant que telles. Ces études doivent être axées sur :

- Le développement de nouveaux tests suffisamment sensibles pour identifier les constituants associés à la paroi bactérienne aussi bien des cibles.
- Faire un complément de l'étude sur les propriétés technologiques de ces souches.
- Essai d'une production des souches probiotiques en fermenteur

Conclusion et perspectives

- Détermination de leur viabilité et stabilité dans les préparations pharmaceutiques.
- Effectuer des études *in vivo* avec des modèles expérimentaux sur des animaux (l'adhésion aux cellules épithéliales).

Référence bibliographique

- Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta T-A, Coarfa C, et al. A Metagenomic Approach to Characterization of the Vaginal Microbiome Signature in Pregnancy. PLOS ONE. 2012.).
- Adapté de: Mac Groarty, 1993; Parent D., Bossens M., Bayot D., Kirkpatrick C., Graf F., Wilkinson F. and Kaiser R. (1996) Therapy of bacterial vaginosis using exogenously-applied Lactobacilli acidophili and a low dose of estriol: a placebo-controlled multicentric clinical trial. *Arzneimittel- Forschung/Drug Research* 46(1):63-73.).
- Affssa (Agence Française de sécurité des produits alimentaires) "Effects of probiotics and prebiotics on flora and immunity in adults." Février 2005.
- Against vaginally acquired infections. *Future Microbiology* [en ligne], 6(5), 567-582p.
- Appareil génital ww3.ac-poitiers.fr).
- Axelsson, I. (1998). Bactéries lactiques : classification et physiologie. Dans *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, pp. 1-72. Edité par S. Salminen & A. von Wright, New York: Marcel Dekker 99.
- Bacteria." *FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY-NEW YORK-MARCEL*
- Bacteria: purification, properties and use as bio-preservatives. *Braz Arch Biotech*. Vol 50: 521-542.
- Bactéries Lactiques (*Lactobacillus* spp.), Isolées e Produits Fermentés, sur la valeur Nutritive de Fourrages Conservés par Ensilage, thèse de
- Balaka B, Agbèrè AD, Baeta S, Kessie K, Assimadi K. Flores bactériennes génitales au dernier trimestre de la grossesse. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction - Vol.32 - N° 6 - p. 555-561. 2008*).
- Barbes C. and Boris S. (1999) Potential role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care and STDs* 13(12) :747-751.) ;(Berrebi A. and Ayoubi J. (1999) Le déséquilibre de la flore vaginale. *Genesis : Gynecologie obstétrique – Endocrinologie* 44 :1-4.
- Bergogne-Bérézin E. Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnostic).
- Bergogne-Bérézin E. Flores vaginales normales, vaginites et vaginoses bactériennes : diagnosticet thérapeutique. *Antibiotiques*. 2007, 44-139.).
- Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, 1209-1234, Williams, Wilkins.

- Bernard Blanc. Pathologie de la vulve et du vagin. Tome. 2000 ; 1 : 28-30).
- Bernier L. 2010. Les probiotiques en 2010 : une revue de littérature scientifique. Angers : Thèse doctorat en Pharmacie.
- Berrebi A. and Ayoubi J. (1999) Le déséquilibre de la flore vaginale. Genesis : Gynécologie obstétrique – Endocrinologie 44 :1-4.).
- bifidobactéries, Thèse de doctorat. Université de jijel.
- Bigret M, 1989. Probiotiques - de l'empirisme à la science. Biofutur, 62-64.
- Bjorkroth J., Holzapfel W.H. 2006. GraLeucorbstoc, Orbcoccus et weissella chez les procaryotes. Vol 4. Printemps, pp. 267-319.
- Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malmarm, K., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Sorokin, A. (2001). La séquence complète du génome de la bactérie lactique Lactococcus lactisssp. lactis IL1403. Génome Res 11, 731-753.
- Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. Human Reproduction 2001; 16: 1809-13.).
- BOUADJAIB, S. (2013). Etude physico-chimique du produit laitier traditionnel du sud algérien "jben", recherche du pouvoir antimicrobienne des bactéries lactiques. Biologie, Abou BekrBelkaid Tlemcen. Master : 110.
- Chemlal-Kheraz, D. (2013). Isolement et identification phénotypique des bactéries lactiques isolées du Tilapia du Nil (Oreochromis niloticus) et mise en évidence de leur potentiel probiotique, thèse de doctorat. Université d'Oran faculté des science département de biologie,217p.
- Chometteg, Auriolm. Anatomie pathologie spéciale.1999 ; N°2 et LAHLIDI A. Anatomie topographique abdomen. 1986 ; volume 2 Edition N°1.
- Corrieu, G et Luquet, F. M. (2008). Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec & Doc, p 849.
- CORRIEU, G., LUQUET F., 2008- Bactéries lactiques de la génétique aux ferments.Ed. TEC & Doc Lavoisier. Paris.823p.
- Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterialvaginosis. Ann N YAcadSci. 2011, 48–58.)
- De Vos et al., 2012.
- DEKKER-139 : 375-396.
- Dellaglio F, 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Ed. Loriga Lavoisier, Paris, 1-37.

- Dellaglio, F, H de Roissart, S Torriani, M.K Curk, et D. Janssens. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, Édité par H Roissart, & EM Luquet. Paris : Lavoisier, 1994.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. & Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Uriage, France: Loriga.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M. C. & Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, pp. 25-116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Uriage, France: Loriga.
- Desmazeaud, M. J. (1983). L'état des connaissances en matière de nutrition des bactéries lactiques. Le lait 63, 267-316.
- Doctorat. Université de Lille école doctorales sciences de la matière, du Doctorat. Université des Sciences et de la Technologie d'Oran.
- Dortu C. et Thonart P... 2009. Les bactériocines des bactéries lactiques caractéristiques et intérêts pour la bioconservation des produits alimentaires. Biotechnol. Agron Soc. Env 13(1) : 143-154.
- DORTU, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires Wallonie-Europe. Doctorat : 155.
- DROUAULT, S. G. C. (2001). Effets des bactéries lactiques ingérées avec des laits fermentés sur la santé. Veterinary Research, BioMed Central, 32 (2), 101-117.
- MAKHLOUFI, K. M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique leuconostoc pseudomesenteroides isolée du boza, pierre et marie curie – paris. Doctorat : 229.
- MAMECHE-DOUMANDJI, A. (2008). Purification et caractérisation de bactériocine produites par des bactéries lactiques autochtones isolées, institut national agronomie. Doctorate: 111.
- Elaine N. Anatomie et physiologie humaine. PEARSON. Education 6e édition 2005.
- Ennahar, S., Cai, Y. & Fujita, Y. (2003). Diversité phylogénétique des bactéries lactiques associées à l'ensilage de riz paddy, déterminée par analyse de l'ADN ribosomique 16S, Appl Environ Microbiol 69, 444-451.
Et Rousseau, 2002 ; Deepika et Charalampopoulos, 2010).

- **FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food in Report of a Joint FAO/WHO. C. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture. Organization of the United Nations and World Health Organization: Ontario.**
- **Faure S, Pubert C, Rabiller J, Taillez J, Yvain A-L. Intérêt des probiotiques en préventif au niveau des différentes flores de l'organisme. Actual Pharm. 2013, 6-22.).**
- **Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO)/ Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Consultation mixte d'experts FAO/OMS sur l'évaluation des propriétés sanitaires et nutritionnelles des probiotiques dans les aliments, (FAO/OMS, 2001).**
- **Fuller R (1989). Probiotics in man and animal. J of Appl Bacteriol. Vol 66: 365-378.**
- **Fuller, R. (1991). "Probiotics in human medicine." Gut 32(4) : 439-442.**
- **Gagnon M. 2007. Rôle des probiotiques lors d'infections entériques d'origine bactérienne et virale. Thèse de doctorat. Université Laval. France).**
- **Galvez, A., Abriouel, H., Ben Omar, N., Lucas, R. (2011). Applications alimentaires et réglementation Dans: Drider D., et Rebuffat 5. (eds). Peptides antimicrobiens procaryotes: des gènes aux applications. Édition Springer. 253-390.**
- **Gollop N., Zakin V et Weinberg Z.G, 2005. Activité antibactérienne des bactéries lactiques incluses dans les inoculants pour ensilage et dans les ensilages traités avec ces inoculants. Tourillon de microbiologie appliquée 98, 662-666.**
- **Grimont, F. &Grimont, P.A. (1986). Modèles de restriction du gène de l'acide ribonucléique ribosomal comme outils taxonomiques potentiels. Ann Inst Pasteur Microbiol 137B, 165-175.**
- **Guiraud J.P. et Rosec J.P. 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire AFNOR 237-251.**
- **GUIRAUD J.P. et ROSEC J.P., 2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire. AFNOR. 237-251.**
- **Gurtler, V., Wilson, V.A. et Mayall, B.C. (1991). Classification des clostridies médicalement importantes à l'aide des différences de sites d'endonucléases de restriction de l'ADNr 16S amplifié par PCR. J Gen Microbiol 137, 2673-2679.**

- **Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction 2002 ; 31, N° 5 : 485-94 ; Spurbeck RR, Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. Future Microbiology 2011, vol.6(5), 567-82.)**
- **Hickeyetal., 2012; Li et al.,2012).**
- **Holzapfel W.H., Franz C.MLudwig W. et DicksL.Mr.. 2009 Genre Pediococcus. Manuel de bactériologie systématique de Bergey: Les firmicutes. Deuxième édition du tome trois. Springer.**
- **Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. & Schillinger, U. (2001). Taxonomie et caractéristiques importantes des micro-organismes probiotiques dans l'alimentation et la nutrition. Am J Clin Nutr 73, 3655-373S.**
- **Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. et Schillinger, U (2000). Taxonomy and important feature of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am J Clin Nutri, 73: 3655-3735.**
- **<https://fr.scribd.com/document/371364452/87-11-pdf>**
- **Huang, Y., Adams, M.C. (2004). In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy Propionibacterium. International Journal of Food Microbiology, 91, 253–260.**
- **Kandler O., Weiss N. (1986b): Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212A1.**
- **KHALID N.M. et MARTH F.H., 1990. Lactobacilles, leurs enzymes et leur rôle. Dans: Maturation et altération du fromage. Tour. Laiterie Sci. 73: 158-167.**
- **Khuntia A et Chaudhary L.C, 2002. Performances des veaux mâles croisés influencées par la substitution de céréales par du son de blé et l'ajout de bactéries lactiques à l'alimentation. Journal asiatique-australasien des sciences animales 15, 188-194.**
- **Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. & Reuter, G. (1998). Taxonomie et physiologie des bactéries lactiques probiotiques. Int J Food Microbiol 41, 103-125.**
- **Klingberg, T., L. Axelsson, K. Naterstad, D. Elsser and B.B. Budde, 2005. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. International Journal of Food Microbiology, 105, 419-431.**
- **König H. et Fröhlich J... 2009 Bactéries Lactiques, Biologie des Microorganismes du Raisin, du Moût et du Vin. Springer-Verlag Berlm Heidelberg.**
- **Lactobacillus -De Vos P., Garrity G.M., Jones D., Krieg N.R., Ludwig W., Rainey F.A., Schleifer K.H. et Whiteman W.B. 2009. Bergey's Manual of**

Systematic Bacteriology: The firmicutes. Deuxième édition. Tome Trois. Springer.

- **Lahtinen S., Ouwehand A.C., Salminen S. et Wright A.V 2012. Bactéries lactiques Aspects microbiologiques et fonctionnels Quatrième édition Taylor & Francis Group Boca Raton Londres New York.**
- **Larguèche, N. (2012). Identification de nouvelles souches probiotiques**
- **Le Bourgeois, P., Lautier, M., van den Berghe, L., Gasson, M. & Ritzenthaler, P. (1995). Carte physique et génétique de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363 chromosome: comparaison avec celui de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL 1403 révèle une grande inversion du génome. *Tourillon de bactériologie* 177,2840-2850.**
- **LECLERC H., GAILLARD F.L. et SIMONET M, 1994. Les grands groupes de bactéries. In *Microbiologie générale la bactérie et le monde microbien* DOIN. Paris. 445.**
- **Lee Y.K, Nomoto K, Salminen S et Gorbach S (1999). *Handbook of Probiotics*. ed. Lee, Y.K. New York: John Wiley Sons, Inc.**
- **LEONARD, I. (2013). Evaluation du potentiel bio-protecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse doctorat Sciences de l'Alimentation non publiée, Université de Bourgogne, France.**
- **LEONARD, I. (2013). Evaluation du potentiel bioprotecteur de bactéries lactiques confinées dans une matrice polymérique. Thèse doctorat Sciences de l'Alimentation non publiée, Université de Bourgogne, France.**
- **Lepargneur et Rousseau, 2002 ; Ocaña V. S., Pesce de Ruiz Holgado A. A. et Nader-Macias I.M.E. 1999. Selection of Vaginal H₂O₂-Generating *Lactobacillus* Species for Probiotic Use. *Current Microbiology*.38: 279–284.)**
- **Lepargneur J P, Rousseau V. Rôle Protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2002; 31, N° 5: 485-94).**
- **Lilly, D. M. and R. H. Stillwell (1965). "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms."**
- **Limsowtin G.K.Y., Broome M.C et Powell I.B, 2004. Bactéries lactiques, taxonomie. Dans *Encyclopédie des sciences laitières*. Roginski H. Oxford, Elsevier, 1470-1478.**

- MacPhee R.A., Hummelen R, Bisanz J.E., Miller W. L et Reid G. 2010. Probiotic strategies for the treatment and prevention of bacterial vaginosis. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 11(18):2985-2995.).
- Maggi L., Mastromarino P., Macchia S., Brigidi P., Pirovano F., Matteuzi D. and Conte U. (2000) Technological and biological evaluation of tablets containing different strains of lactobacilli for vaginal administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 50:389-395.).
- Makarova, K.S. & Koonin, E.V. (2007). Génomique évolutive des bactéries lactiques. *J Bactériol* 189, 1199-1208.
- MAKHLOUFI, K. M. (2012). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza, pierre et marie curie-paris. Doctorat: 229.
- Marelli G., Papaleo E. et Ferrari A. (2004). Lactobacilli for prevention of urogenital Infections. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 8: 87-95.; Hoesl C.E. et Al tween J.E. 2005. The Probiotic approach: An alternative treatment option in urology. *European Urology* .47: 288-296.).
- Marieb E. Anatomie et Physiologie humaine. Pearson education, 2005.).
- Marteau P. et Rambaud J-C. (1998). Probiotiques en gastroentérologie : bases rationnelles, effets démontrés et perspective. *Hépatogastro* ; 5 (4) : 267-273.
- Marteau P., Seksik P. « Probiotiques et alicaments ». In : *Bactéries lactiques et probiotiques*. Paris : Lavoisier, 2005. p. 255-289.
- Menche, N. (2014). *Biologie Anatomie Physiologie. Organes génitaux*. 5 -ème édition. 347-351p. ISBN 978-2-224-03342-2).
- Merk K, Borelli C, Korting HC. Lactobacilli-bacteria-host interactions with special regard to the urogenital tract. *Int J Med Microbiol*. 2005 ;295 :9-18. DOI : 10.1016/j.ijmm.2004.11.006).
- Mermouri, L. (2018). Étude de l'Effet de Souches Probiotiques de
- Metchnikoff, E. (1907). *The prolongation of life*, William Heinemann, London, UK.
- Microbial pathogens. *FEMS Microbiol. Rev.* 28 : 405–440.
- microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiology Review*. 37: 762–792.).

- Miyoshi, A., Rochat, T., Gratadoux, J.J., Le Loir, Y., Oliveira, S.C., Langella, P. & Azevedo, V. (2003). Stress oxydatif chez *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2, 348-359. Mohamed-Boudiaf,177p.
- Nader-Macías et Juárez Tomás, 2015 ; Lepargneur et Rousseau, 2002).
- Ng et al. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2009 ; 15(2), 300-310.
- Ocana V, Nader-Macias M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of *Lactobacillus* bacteriocin. *Methods Mol Biol* 2004; 268: 347-354.).
- Ouwehand, A. C. and S. Vesterlund (2004). "Antimicrobial components from lactic acid.
- Parada J.L, Caron C. R, Medeiros A.B. P et Soccol C. R (2007). Bacteriocins from lactic acid.
- Paramithiotis, S., Gioulatos, S., Tsakalidou, E., Kalantzopoulos, G. (2006) *Process Biochemistry*, 41, 2429-2433.
- Pascual L. et Barberis L. 2011. Prevention strategy of urogenital infections by using lactobacilli with probiotic properties. *Urinary Tract Infections*.246-264
- Penaud S. 2006. Analyse de la séquence génomique et étude de l'adaptation à l'acidité de *Lb delbrueckissp Bulgaricus* ATCC 11842. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique de Paris Grignon.
- Petrova M.I., van den Broek M., Balzarini J., Vanderleyden J et Lebeer S. 2013.Vaginal.
- Petrova M.I., van den Broek M., Balzarini J., Vanderleyden J et Lebeer S. 2013.Vaginalmicrobiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiology Review*.37: 762–792.).
 - Pilet M., Mgras C. et Federighi M 2005. Bactéries lactiques. In *bactériologie alimentaire* (Federighi M.). 2e Ed, Economica. Paris. 219-240.
- Pilet M-F., Magras Catherine et Michel Federighi, 2005. Bactéries lactiques In *Bactériologie alimentaire "compendium d'hygiène des aliments"*. FederighiM.Economica, pp: 219-242.
- Pot B., 2008. The Taxonomy of Lactic Acid Bacteria. In: *Bactéries Lactiques De la Génétique Aux ferments* (Corrieu G. Et Luquet F.M.). Tec & Doc, Lavoisier.Paris.1-106.

- Pringsulaka O., Thongnam N., Suwannasai N., Atthakor W., Pothivejkul K. et Rangsiruji A. 2011. Caractérisation partielle des bactériocines produites par des bactéries lactiques isolées à partir de produits de viande et de poisson fermentés à la thaïlandaise *Food Control* 23 : 547-551.
- Probiotiques et Prébiotiques. *World Gastroenterology*
R.J., Zhou X., Pierson J.D., Ravel J. et Forney L.J. 2012. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Translational Research*. 160 : 267-282.
- Rayonnement et de l'Environnement, France, 213p.
- Redondo-Lopez et al., 1990; Merk et al., 2005
- Reid G. (2001) Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition* 73(suppl):437-443.
- Reid G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal Clinical Nutrition*. 73 : 437-43.
- Reid G. and Bocking A. (2003) The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *American Journal of Obstetrical Gynecology* 189:1202-1208.
- Robin J. M. et Rouchy A. (2001). Les probiotiques. *Nutrithérapie info* ; 6 : 1-4.
- Saiz Vieco, N. (2019). Potentiel probiotique et activités.
- Salawu M.B., Warren E.H et Adesogan A.T, 2001. Caractéristiques de fermentation, stabilité aérobie et dégradation ruminale des fourrages de bi-culture pois/blé ensilés 124.
- Salminen S., Gerbach S., Lee Y.K. et Benno Y., 2004. Études humaines sur les probiotiques ce qui est scientifiquement prouvé aujourd'hui Dans les bactéries lactiques aspects microbiologiques et fonctionnels (Salminen S. Wnght AV et Ouwehand A) 3e Ed., Marcel Dekker, Inc. New York-515-530.
- Salminen S., Gorbach S., Yuan-Kun L et Benno Y, 2004. Études humaines sur les probiotiques : Qu'est-ce qui est scientifiquement prouvé aujourd'hui ? Dans les bactéries lactiques : Aspects microbiologiques et fonctionnels. Edssalimen, S., von Wright, A. et Ouwerhand A., New York Dekker M. pp 515-530.
- Salminen S., Wright AV. et Ouwehand A.C..2004. *Lactic Acid Bacteria Aspects microbiologiques et fonctionnels* Troisième édition Taylor & Francis Group Boca Raton Londres New York.

- SAMOT, J. (2012). Evaluation du potentiel probiotique de lactobacilles buccaux. Thèse doctorat Microbiologie-Immunologie non publiée, Université de Bordeaux.
- Sanders ME, Guarner F, Guerrant R et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*. 2013 ;62 :787-96.
- Schleifer K.H, Stackebrandt E., 1983. Molecular systematics of procaryotes. *AnnuRev. Microbiol.*, 37 : 143-187.
- Sciences exactes et sciences de la vie, 56p.
- Servin A. (2004): Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against
- Sobel, 1999a; Linhares et al., 2010; Mac Pheeetal., 2010).
- Spurbeck RR, Arvidson CG. Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiology* 2011, vol.6(5), 567-82.; CNGOF. Vaginose bactérienne 2007. [En ligne] Disponible sur : www.cngof.asso.fr/d_livres/2007_GM_141_bohbot.pdf. Consulté le 23/11/2017.)
- Stackebrandt, E. & Goebel, B.M. (1994). Note taxonomique : une place pour la réassociation ADN-ADN et l'analyse des séquences d'ARNr 16S dans la définition actuelle de l'espèce en bactériologie. *Int J SystBacterial* 44, 846-849.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H. (1997). Les bactéries lactiques des aliments et leur taxonomie actuelle. *Int J Food Microbiol* 36, 1-29.
- Streit F... 2008. Influence des conditions de récolte et de concentration sur l'état physiologique et la cryotolérance de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* CF11. Thèse de Doctorat L'Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech), Sud, Spécialité Microbiologie, p193.
- Superbeck, R.R., Arvidson, C.G. (2011). Lactobacilli at the front line of defense.
- TAMIME A.Y., 2002. Microbiologie des cultures starter. Dans: Manuel de microbiologie laitière (Robinson R.K.), 3e éd., John Wiley and Sons, Inc., New York.261-366.
- Toulouse paulsabatier faculté des sciences pharmaceutiques, p133.
- Turovskiy Y, Noll KS, Chikindas ML. The etiology of bacterial vaginosis. *J Appl Microbiol.*2011, 28-1105.).
- Turovskiy Y., Noll K.S. et Chikindas M.L. 2011. The etiology of bacterial vaginosis. *Journal of Applied Microbiology.*110(5): 1105–1128; Hickey

- Vacheret N. L'appareil génital féminin [http://www.spiral.univ-lyoun1.fr/polycops/Histologie Fonctionnelle Organes/Genital Feminin/TexteP3](http://www.spiral.univ-lyoun1.fr/polycops/Histologie_Fonctionnelle_Organes/Genital_Feminin/TexteP3). Consulté le 12Novembre 2017.).
- Villeger, R. (2014). Etude in vitro des propriétés probiotiques de bactéries du genre Bacillus : Interaction avec l'hôte et effets de l'association avec un prébiotique, thèse de doctorat. Université de Limoges, France, 276p.
- Wehkamp J., Schaubert J., Stange E.F. 2007. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Current Opinion in Gastroenterology*. 23 : 32- 38. WGO. 2008.
- Weinberg Z.G., Muck R.E., Weimer P.J., Chen Y et Gamburg M, 2004. Bactéries lactiques utilisées dans les inoculants pour l'ensilage comme probiotiques pour les ruminants. *Biochimie appliquée et biotechnologie* 118, 1-9.
- Wilson M., 2008. Bactériologies de l'Homme : une perspective écologie. Éditions Blackwell. Oxford.
- www.cngof.asso.fr/d_livres/2007_GM_141_bohbot.pdf; Lepargneur J P, Rousseau V. Rôle Protecteur de la flore de Doderlein. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 2002 ; 31, N° 5 : 485-94).
- Yamamoto T., Zhou X., Williams C.J., Hochwalt A. et Forney L.J. 2009. Bacterial Populations in the Vaginas of Healthy Adolescent Women. *Journal of Pediatric & Adolescent Gynecology*.22:11-18.).
- ZHANG H. and CAI Y., 2014. *Lactic Acid Bacteria Fundamentals and Practice*. Springer Dordrecht Heidelberg. New York London. 536p.
- Zhang H. et Cai Y. 2014. *Bases et pratique des bactéries lactiques* Springer Dordrecht Heidelberg New York Londres.
- Zhang H. et Cai Y. 2014. *Principes fondamentaux et pratique des bactéries lactiques*. Springer Dordrecht Heidelberg New York London. I 55.

Annexe

Annexe

Milieux de culture

MRS (de Man, Rogosa, Sharpe)

- Peptone 10g
- Extrait de viande 8g
- Extrait de levure 4g
- Acétate de sodium 5g
- Phosphate bipotassique 2g
- Citrate d'ammonium 2g
- Sulfate de magnésium 2g
- Sulfate de manganèse 0,05g
- Glucose 20g
- Twen80 1ml
- Cystéine 0,1g
- Eau distillée 1000ml

Bouillon MRS (Man-Rogosa-Sharpe)

- Peptone 10g
- Extrait de viande 8g
- Extrait de levure 4g
- Acétate de sodium 5g
- Phosphate bipotassique 2g
- Citrate d'ammonium 2g
- Sulfate de magnésium 2g
- Sulfate de manganèse 0,05g
- Glucose 20g
- Twen80 1ml
- Cystéine 0,1g

• Eau distillée 1000ml

Ph= 6,2

Autoclave 15min à 120C0

MRS modifié

MRS

Vert de bromocrésol

Cystéine

Vancomycine

M17

Tryptone 2,5 g.

Peptone papainique de soja 5,0 g.

Peptone pepsique de viande 2,5 g.

Extrait de viande 5,0 g.

Extrait autolytique de levure 2,5 g.

Béta-Glycérophosphate de sodium 19,0 g.

Sulfate de magnésium 0,25 g.

Lactose 5,0 g.

Agar

Lait écrémé stérile à 10%

Lait écrémé stérile en poudre

Eau distillée

BHI

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Extrait de cœur 5,00

Extrait de cervelle 12,50

Peptone 10,00

Glucose 2,00

Chlorure de sodium 5,00

Phosphate disodique 2,50

Tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) : pH = 7.2

Ingrédient Unité

NaCl 8g

Kcl 0.20g

NaH₂PO₄ 1.44g

K₂HPO₄ 0.24g

Eau distillé 1000ml

Eau physiologique

Na Cl 9 g

Eau distillée 1000 ml

Violet de Gentiane.

Violet de Gentiane 1 g

Ethanol à90%. 10 ml

Phénol 2 g

Eau distillée 100 ml

Fushine de Ziehi :

Fushine basique. 1g

• Phénol 5 g

• Eau distillé 100 ml

. Iode 1g

• Iodure de potassium 2g

• Eau distillé. 300 ml