



Université de Lille

Ecole doctorale Sciences de la Matière, du rayonnement et de l'environnement

Thèse de Doctorat

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Présentée pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Lille

En cotutelle de



Université Abderrahmane Mira de Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Présentée par

Liza OUARABI

Analyses métagénomiques de l'écosystème microbien vaginal pour étudier sa spécificité et sa dynamique

Soutenue le 10 Décembre 2020, devant le jury composé de

Mr ATMANI Djebbar	Professeur (Université de Bejaia)	Président
Mme LUCAU Anca	MCF-HDR (Université de Lille)	Directrice de thèse
Mme BENDALI Farida	Professeur (Université de Bejaia)	Co-directrice de thèse
Mr DRIDER Djamel	Professeur (Université de Lille)	Co-encadrant
Mr HOUALI Karim	Professeur (Université de Tizi-Ouzou)	Rapporteur
Mme CONNIL Nathalie	MCF-HDR (Université de Rouen)	Rapporteur
Mr IDOUI Tayeb	Professeur (Université de Jijel)	Examineur
Mme DELCENSERIE Véronique	Professeur (Université de Liège)	Examinatrice

Année Universitaire : 2020/2021

Je dédie ce travail de thèse aux deux piliers de ma vie : mes parents.

Papa, Mama, vous êtes mes phares dans la nuit quand je m'égare. Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance.

A mes sœurs, Lydia et Lylia, pour être à la fois mes amies, mes confidentes et ma source de réconfort lorsque la vie se complique.

Ma petite cerise Anya qui a égaillée nos vies

A mes amis de toujours

Amanda et Ritchy : vous étiez là depuis le début sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui

Mira : A nos fou rires, nos aventures, nos week-end, nos plans sur la comète à tous ces trains ratés

A Mouna et Martial, pour avoir été là et joué le rôle de parents, amis et conseillers quand tout m'éloignait des miens.

A Nani, qui est passé du statut de camarade à celui d'ami pour devenir un véritable frère.

Faire cette thèse à tes côtés presque en binômes a été un privilège et une merveilleuse aventure.

A Dada Ahcene, cette étoile dans le ciel qui veille sur moi depuis ma première année de thèse.

Thanmirth nwen.

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira-Bejaia (équipe : Interactions microbiennes, Biofilms et Probiotiques) et dans le cadre d'une convention de cotutelle, j'ai eu l'opportunité de réaliser une bonne partie du travail au niveau du Laboratoire Régional de l'Institut Charles Viollette (Université de Lille, France) à l'aide d'un financement via le programme de mobilité PROFAS B+ durant 14 mois.

Je tiens en tout premier lieu à présenter l'expression de ma profonde gratitude et mes remerciements les plus sincères à ma directrice de thèse **Pr BENDALI Farida**, pour m'avoir transmis son amour de la recherche et inculqué les valeurs de la thèse et du travail d'équipe.

Travailler à vos coté durant mes quatre années de thèse en plus de ma deuxième année de Master a été très formateur pour moi tant sur le plan académique que personnel. Merci d'avoir cru en moi lorsque moi-même je doutais de mes capacités. En espérant encore bénéficier de votre expérience et savoir-faire.

Je remercie également **Dr Anca LUCAU**, ma co-directrice de thèse pour m'avoir accueillie au sein de son unité de recherche à l'Université de Lille mais aussi pour tout le savoir qu'elle m'a transmis de par ses formations et conseils tout au long de mon séjour.

Je tiens à exprimer également mes plus chaleureux remerciements au **Pr DRIDER Djamel** mon co-encadrant de thèse qui m'a accueilli les bras grands ouverts au sein du Laboratoire Régional de l'Institut Charles Viollette (Université de Lille, France), votre aide et votre engagement si précieux, ont profondément contribué à ma formation et mon évolution. Un grand Merci Monsieur pour tout ce que vous avez fait pour moi et pour votre implication dans l'aboutissement de ce projet de thèse. J'espère avoir la chance de travailler encore avec vous dans un avenir proche.

Je souhaite également remercier l'ensemble des membres du jury : **Pr ATMANI Djebbar** (U. Bejaia), pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury, **Pr IDOUI Tayeb** (U. Jijel), **Pr HOUALI Karim** (U. Tizi-Ouzou), **Dr DELSCENSERIE Véronique** (U. Liège, Belgique) ainsi que **Dr CONNIL Nathalie** (U. Rouen, France) pour avoir accepté d'évaluer ce travail et de nous faire part de leurs précieuses remarques.

Mes sincères remerciements vont à tous les membres du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, enseignants-chercheurs, ingénieurs et doctorants pour leur aide et pour l'ambiance agréable de travail que nous avons partagé. Je remercie également le Directeur de laboratoire actuel, **Pr KECHA Mouloud** et le **Pr BENALLAOUA Said** Directeur du laboratoire durant

mes trois premières années de thèse pour m'avoir permis de réaliser ce travail dans de très bonnes conditions.

Ma reconnaissance va également au **Dr OUARABI Brahim** (gynécologue-obstétricien), notre partenaire depuis cinq ans, sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Merci de nous avoir procuré tous ces prélèvements mais aussi de nous avoir ouvert les portes de votre établissement hospitalier et de m'avoir fait part de votre expérience de médecin durant ma thèse.

Je remercie également toute l'équipe du Laboratoire régional de l'Institut Charles Viollette (Université de Lille, France) qui m'ont chaleureusement accueilli (thésards, chercheurs, ingénieurs et techniciens) et particulièrement **Dr BELGUESMIA Yanath** et **Dr LADJOUZI Rabia** pour leur aide et soutien sans faille dans la réalisation de ce travail.

Je ne remercierais jamais assez cette petite famille que je me suis faite durant ce parcours.

Désiré MADI MOUSSA, Dahlia DAHER, Rezak MENDIL, Amandine WATRIN, Audrey ETIENNE, Harmony ALVES, Mouna AMBLI, vous resterez à jamais dans mon cœur.

Mes sincères remerciements à tous les enseignants de l'Université de Bejaia qui ont contribué à ma formation durant ces trois cycles universitaires (LMD).

A: Absorbance

ACP: Analyses en Composantes Principales

ANOVA: Analyses of Variance

ARNr: Acide Ribonucléique Ribosomique

CST: Community State Type

CVV: Candidose Vulvo-Vaginale

DGGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

HPV: Human Papilloma Virus

HSV: Herpes Simplex Virus

IMC: Indice de Masse Corporelle

IS: Indice de Shannon

IST: Infection Sexuellement Transmissible

ITS : Internal Transcribed Spacer

J: Jeunes

L.: *Lactobacillus*

LAB: Lactic Acid Bacteria

M: Ménopausées

NCBI: National Center for Biotechnology Information

OTU: Operational Taxonomic Units

qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction

RISA : Ribosomal Intergenic Spacer Analysis

T-RFLP : Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism

VB: Vaginose Bactérienne

VIH: Virus de l'Immunodéficience Humaine

WGS : Whole Genome Sequencing

Diagramme de Venn : Un diagramme de Venn est une illustration d'une relation simple utilisée en probabilités pour représenter l'univers des données avec lesquelles une analyse commence et les sous-ensembles, unions et intersections que l'on peut faire dans ces données (**Hughes, 2016**).

Dysbiose : Définie comme une modification du microbiote entraînant un déséquilibre entre les bactéries commensales et pathogènes (**Moreno et al., 2018**).

Eubiose vaginale : état d'un microbiote considéré à l'équilibre, « normal », présumé remplir toutes les conditions pour faire bénéficier de ses effets la physiologie de l'hôte (métabolisme, immunité, effet barrière) (**Weissenbach et Sghir, 2016**).

Exposome : Selon plusieurs définitions, le concept d'exposome fait référence à la totalité des expositions provenant de diverses sources externes et internes, y compris les agents chimiques, les agents biologiques, les rayonnements et les expositions depuis la conception jusqu'à la fin de la vie (**Vineis et al., 2020**).

Microbiote : ensemble de microorganismes constituant une communauté adaptée à un environnement donné (sol, eau, air ou êtres vivants). Ces communautés contiennent des microorganismes commensales, symbiotiques et pathogènes que l'on peut trouver dans et sur tous les organismes multicellulaires étudiés à ce jour, des plantes aux animaux. Le microbiote comprend des bactéries, des archées, des protistes, des champignons et des virus (**Peterson et al., 2009**).

Métagénome : contenu génétique de tout groupe de microorganismes constituant un microbiote (**Méndez-García et al., 2018**).

Œstrogènes : Les œstrogènes sont des hormones qui contrôlent le développement et le fonctionnement du système de reproduction des deux sexes. Il existe de nombreux sites cibles pour l'activité ostrogénique, allant de l'appareil reproducteur et du sein, en passant par les os, la graisse et les vaisseaux sanguins, à la vessie et au cerveau (**Milligan, 2009**).

Unité taxonomique opérationnelle (UTO) : Terme utilisé pour classer des groupes d'individus étroitement liés. Ce concept est généralement utilisé pour désigner des groupes d'organismes, regroupés par similitude de séquence d'ADN d'un gène marqueur taxonomique spécifique. Les OTU sont les unités de diversité microbienne les plus couramment utilisées, en particulier lors de l'analyse du gène ARNr 16S (**Moreno et al., 2018**).

Figure 1. Coupe sagittale de l'utérus (Biorender®).....	4
Figure 2. Représentation des genres bactériens identifiés dans le microbiote vaginal sain.	6
Figure 3. Représentation des espèces de lactobacilles identifiées dans le microbiote vaginal .	7
Figure 4. Représentation des CST dans les différents groupes ethniques.....	18
Figure 5. Régions conservées (gris) et hypervariables (bleu) de l'ADNr 16S bactérien.	34
Figure 6. Organisation de l'opéron ribosomique comprenant les régions hypervariables ITS1 et ITS2.	34
Figure 7. Indice de Shannon de la diversité bactérienne du microbiote vaginal.....	41
Figure 8. Analyse en composantes principales (ACP) de la diversité des taxons bactériens du microbiote vaginal.....	42
Figure 9. Moyenne des abondances relatives des phyla (A) et des genres (B) bactériens dans le microbiote vaginal.	43
Figure 10. Abondance relative des espèces bactériennes dans le microbiote vaginal des femmes jeunes	44
Figure 11. Abondance relative des espèces bactériennes dans le microbiote vaginal des femmes ménopausées.....	45
Figure 12. Variations de l'abondance des phyla chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M)	46
Figure 13. Variations dans l'abondance des genres bactériens chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M).	46
Figure 14. Variations de l'abondance des espèces chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M)	47
Figure 15. Représentation des moyennes et des écarts types montrant les variations de la concentration en œstradiol chez les femmes jeunes (J) et ménopausées (M).	48
Figure 16. La matrice de corrélation entre les niveaux d'œstradiol et l'abondance des lactobacilles.....	49
Figure 17. Diagramme de dispersion montrant une forme aléatoire entre les niveaux d'œstradiol et l'IMC	50
Figure 18. Identification rapide des CST par la méthode qPCR.....	51
Figure 19. Dynamique du microbiote vaginal en fonction de l'âge.	52
Figure 20. Comparaison des profils des CST sur différents groupes ethniques.....	55
Figure 21. Estimation de la biodiversité des taxons fongiques dans les mycobiotes vaginaux chez les femmes jeunes (J) et ménopausées (M).....	57

Figure 22. Abondance relative des genres fongiques enregistrée au niveau individuel (A) et en moyenne par groupe (B) dans le mycobiote vaginal des femmes jeunes (J) et ménopausées (M)..... 58

Figure 23. Abondance relative des espèces fongiques enregistrée au niveau individuel (A) et en moyenne par groupe (B) dans le mycobiote vaginal des femmes jeunes (J) et ménopausées (M)..... 58

Figure 24. Diagramme de Venn représentant le nombre d'espèces fongiques présentes chez les femmes jeunes (cercle blanc) et les femmes ménopausées (cercle noir)..... 60

Figure 25. Abondance relative des espèces fongiques par individus : femmes jeunes (J); femmes ménopausées (M)..... 62

Tableau I. Séquences d'amorces utilisées pour l'analyse qPCR.....	38
Tableau II. Composition des CST (%) du microbiote vaginal dans différents groupes ethniques à travers le monde	54
Tableau III. Dynamique de l'âge pour les espèces fongiques dans le mycobiote vaginal des femmes algériennes	60

INTRODUCTION.....	1
SYNTH2SE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
I. Le microbiote vaginal sain	4
I.1. Secteurs microbiologiques de l'appareil génital féminin.....	4
I.2. Composition du microbiote vaginal sain.....	5
I.3. Rôle protecteur du microbiote vaginal sain.....	10
I.3.1. Acide lactique	10
I.3.2. Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂).....	11
I.3.3. Bactériocines.....	11
I.3.4. Biosurfactants	12
I.3.5. Formation de biofilms.....	13
I.4. Dynamique du microbiote vaginal en fonction de l'âge	13
I.4.1. A la naissance et pendant l'enfance	13
I.4.2. A la puberté.....	14
I.4.3. A l'âge adulte	15
I.4.4. A la ménopause.....	16
I.5. Caractère ethnique du microbiote vaginal.....	17
II. Déséquilibre du microbiote vaginal	19
II.1. Vaginose bactérienne (VB)	20
II.2. Candidose vulvo-vaginale (CVV)	21
II.3. Infections sexuellement transmissibles (IST)	21
II.4. Complications des infections vaginales	23
II.5. Dysbiose vaginale et cancer	23
II.6. Stratégies de traitement des infections vaginales	24
II.6.1. Traitements antibiotiques et médicamenteux	24
II.6.2. Traitements à base de probiotiques.....	25
III. La métagénomique dans l'étude du microbiote vaginal	27
III.1. Définition de la métagénomique	27
III.2. Principales techniques en métagénomique.....	28
III.2.1. Séquençage de Sanger	28

III.2.2.	Pyroséquençage	29
III.2.3.	Séquençage Illumina.....	30
III.2.4.	Ion Torrent	30
III.2.5.	Séquençage PacBio.....	31
III.2.6.	Séquençage Oxford Nanopore	32
III.3.	Avantages de la métagénomique	32
III.4.	Types d'études en métagénomique	32
III.4.1.	La métagénomique WGS	33
III.4.2.	La métagénomique ciblée.....	33
III.5.	Limitations de la métagénomique	35
MATERIEL ET METHODES		35
I.	Population de l'étude.....	35
II.	Technique de prélèvement	35
III.	Extraction de l'ADN génomique total.....	35
IV.	Séquençage d'ADN et analyse métagénomique ciblée.....	36
V.	Analyses qPCR.....	37
VI.	Analyse statistique	39
RESULTATS ET DISCUSSION.....		40
I.	Analyse de la composante bactérienne du microbiote vaginal	40
I.1.	Diversité microbienne	40
I.1.1.	Diversité alpha	40
I.1.2.	Diversité bêta	41
I.2.	Caractérisation du microbiote vaginal.....	42
I.3.	Composition bactérienne et niveau des œstrogènes	47
I.4.	Utilisation de la qPCR pour l'identification des CST.....	50
I.5.	Dynamique des âges et perspectives des probiotiques	51
I.6.	Comparaison ethnique	53
II.	Analyse de la composante fongique du microbiote vaginal	55

II.1.	Diversité fongique	56
II.2.	Composition du mycobiote	57
II.3.	Dynamique de la composition du mycobiote vaginal	60
II.4.	Composition du mycobiote et paramètres physiologiques.....	61
CONCLUSION GENERALE		63
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		65
ANNEXES		

Introduction

La définition du terme "microbiote humain", à savoir tous les micro-organismes et leur matériel génétique collectif présents dans ou sur le corps humain, a été attribuée au biologiste américain Joshua Lederberg en 2001 (**Moreno et Franasiak, 2017**). Étant donné le rôle crucial des différents microbiotes, les humains ont été décrits comme des holobiontes ou des supraorganismes, ensembles de communautés composées de l'hôte et de ses micro-organismes symbiotiques (**Younes et al., 2018**). Ces différents microbiotes représentent des écosystèmes microbiens situés dans et sur le corps humain: principalement dans l'intestin, mais également dans la cavité buccale, la peau, les voies respiratoires et urogénitales (**Shafquat et al., 2014**). Parmi les nombreuses études réalisées sur les populations microbiennes associées à l'organisme humain, très peu se sont concentrées exclusivement sur la santé des femmes. Le vagin humain reste un organe sous-étudié mais qui peut affecter profondément la santé de la femme et des générations à venir (**Younes et al., 2018**).

A la fin du 19^{ème} siècle, les bactéries et les virus présents dans le vagin ont commencé à être associés à des maladies du tractus génital inférieur telles que la gonorrhée et l'herpès génital. A la même période, Döderlein a découvert un bacille (plus tard attribué à *L. acidophilus*) dans les sécrétions vaginales de femmes enceintes, qui avait des effets antagonistes sur les agents pathogènes (**Pruski et al., 2018**).

En 1892, Döderlein a classé les communautés bactériennes des femmes enceintes en communautés normales (dominées par le bacille vaginal) et anormales (contenant de nombreux autres micro-organismes, fréquemment des streptocoques ou des staphylocoques). Il soutenait que dans les sécrétions normales, différentes conditions favorisées par les bacilles vaginaux, notamment l'acidité, étaient essentielles pour maintenir le vagin exempt de bactéries pathogènes. La compréhension des relations commensales et antagonistes et des mécanismes moléculaires par lesquels les lactobacilles vaginaux agissent contre la colonisation ou les infections par d'autres micro-organismes est un objectif de longue date et devrait être axé sur la physiologie de l'hôte et en particulier sur les processus d'immunité (**Rampersaud et al., 2012**).

Le microbiote du tractus urogénital représente 9 % du microbiote humain total (**Haldar et al., 2016**). Par rapport à tout autre microbiote, le microbiote vaginal est unique par le fait que, dans un état sain, il se caractérise par une diversité bactérienne réduite et une dominance de *Lactobacillus* spp. Il est à noter que les lactobacilles sont connus pour produire une quantité importante d'acide lactique qui est directement corrélée à un pH vaginal inférieur à 4,5. Cette acidité a été fortement corrélée avec la protection contre les infections cervico-

vaginales, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et différentes infections sexuellement transmissibles (**Kroon et al., 2018**). Même lorsque les espèces de *Lactobacillus* sont dominantes, divers autres micro-organismes ont été signalés dans l'écosystème microbien vaginal et ont ensemble un impact important sur la santé des femmes et des nouveau-nés (**Diop et al., 2019**). Parmi ceux-ci on peut citer les champignons commensaux du microbiote vaginal qui sont moins étudiés et appartenant principalement aux genres *Candida* et *Pichia* (**Limon et al., 2017**) ainsi que les virus appartenant aux familles des *Papillomaviridae*, *Herpesviridae*, *Anelloviridae* et *Poliomaviridae* (**Turnbaugh et al., 2009; Zárate et al., 2017; Wylie et al., 2018**).

L'étude de la composition du microbiote est l'étape la plus importante dans l'analyse des fonctions et de la dynamique de cet écosystème complexe, mais la définition d'un microbiote sain et régulier semble déjà un objectif difficile à atteindre (**Greenbaum et al., 2019**). En effet, les études ayant été réalisées sur le microbiote vaginal en utilisant les méthodes pasteuriennes de culture, n'ont donné qu'une vision partielle de sa composition en raison de la présence d'espèces non cultivables *in vitro* (**Huang et al., 2014**). Actuellement, la plupart des études réalisées sur la composition du microbiote vaginal sont basées sur le séquençage d'ADN. Les analyses métagénomiques prennent en compte le séquençage complet des différents génomes du microbiote. Les analyses métagénomiques ciblées (metabarcoding) visent le séquençage du gène codant l'ARNr 16S qui présente des régions communes pour toutes les bactéries et des régions variables et spécifiques pour chaque taxon bactérien. Pour des études à grande échelle, d'autres méthodes moléculaires telles que la PCR ont été développées pour l'analyse du microbiote (RISA, T-RFLP, DGGE, etc.). Le criblage sur des microarrays ADN reste également une technologie fiable utilisée notamment dans le milieu hospitalier pour l'identification rapide des taxons du microbiote. Pour le microbiote vaginal, cet outil a déjà fait ses preuves (**Cruciani et al., 2015**). Toutefois, la technique de PCR quantitative (qPCR) reste la méthode la plus utilisée pour les validations ciblées (**Diop et al., 2019**).

Cette thèse s'inscrit dans le contexte de l'étude de la composition du microbiote vaginal chez une cohorte de femmes algériennes. Cette analyse ciblera tant la communauté bactérienne que la communauté fongique de cette niche microbienne. La cohorte de notre étude étant constituée à moitié d'échantillons provenant de femmes en âge de procréer, nous donnera l'opportunité de lister un répertoire des différents taxons présents au sein du microbiote vaginal chez la femme jeune en Algérie. En parallèle, l'analyse de l'autre moitié de notre cohorte, constituée d'échantillons provenant de femmes ménopausées, nous donnera une idée claire des taxons composant le microbiote vaginal à la ménopause.

En effectuant une comparaison entre les résultats obtenus pour les deux groupes cités ci-dessus, nous pourrions avoir un aperçu sur la dynamique auquel est sujet le microbiote vaginal en passant de l'âge de reproduction à la ménopause. En parallèle, les particularités ethniques de la population de l'étude seront recherchées en effectuant un croisement entre nos données et les résultats d'autres études faites sur le même axe de recherche à travers le monde pour différentes ethnies.

Enfin, cette étude introduit le concept de métagénomique pour la première fois pour l'analyse du microbiote vaginal chez la femme algérienne. Pour l'analyse de nos échantillons, une analyse métagénomique ciblée sera effectuée en visant les régions variables pour le génome des bactéries et des levures. Nous avons opté pour un séquençage de type Illumina MiSeq, avec des validations par PCR quantitative des espèces les plus abondantes. Les données obtenues lors de ces analyses seront analysées statistiquement afin d'évaluer la richesse communautaire en calculant les indicateurs de diversité Alpha et Bêta mais également en effectuant des tests de corrélation entre les indicateurs physiologiques (IMC et taux d'œstradiol) et la diversité bactérienne et fongique.

Synthèse
bibliographique

I. Le microbiote vaginal sain

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

Anatomiquement, le tractus génital féminin est constitué d'une succession de cavités (trompes de Fallope, cavité utérine, endocol et vagin) qui communiquent avec l'extérieur par la fente vulvaire (**Figure 1**). Cette structure permet l'extériorisation du flux menstruel et le passage du fœtus lors de l'accouchement mais aussi le passage de micro-organismes dont certains peuvent être pathogènes et donc potentiellement nuisibles au processus de reproduction. Le microbiote vaginal est sans aucun doute l'un des mécanismes de défense les plus importants pour le maintien d'un environnement sain et est étroitement lié à la fonction du tractus reproductif (**Linhares et al., 2010**).

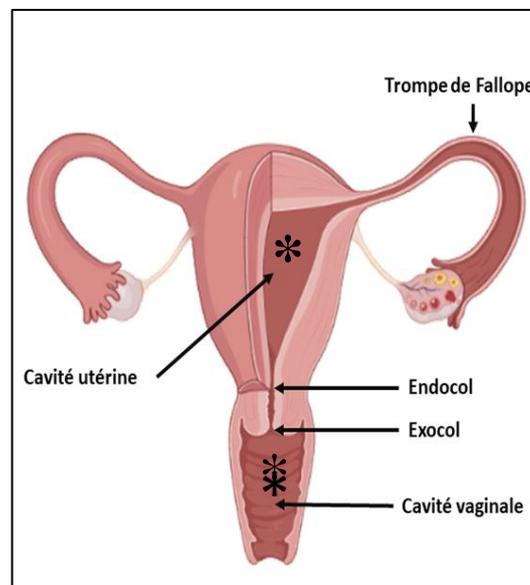


Figure 1. Coupe sagittale de l'utérus (Biorender®). Les secteurs abritant les microbiotes sont indiqués par une étoile.

La structure de l'épithélium vaginal semble être un facteur déterminant dans la capacité de colonisation du microbiote. Cet épithélium stratifié, squameux et non kératinisé prolifère et s'épaissit en réponse à des niveaux élevés d'œstrogènes. Les sécrétions vaginales arrivent des glandes de Bartholin et de Skene, des sites cervicaux et fallopiens. Leur niveau est contrôlé par les œstrogènes. Ces sécrétions sont composées de 90 à 95 % d'eau, de sels inorganiques et organiques, d'urée, de glucides, de mucines, d'acides gras, d'albumine, d'immunoglobulines, de chélateurs de fer, de lysozymes et autres macromolécules, de leucocytes et de débris épithéliaux (**Boris et Barbés, 2000**). Les bactéries sont présentes dans

les sécrétions vaginales à une concentration allant de 10^6 à 10^{12} bactéries par gramme (Quentin, 2006).

Historiquement, on supposait que les micro-organismes ne colonisaient que le vagin, l'utérus étant donc dépourvu de bactéries (Moreno et Franasiak, 2017) mais les données accumulées au fil des décennies ont montré que le reste de l'axe reproducteur féminin n'était pas stérile. Des dizaines d'études ont récemment révélé l'existence d'un microbiote faible mais actif au niveau de la cavité utérine (Franasiak et Scott, 2015). Il semblerait y avoir une interaction entre la composition des microbiotes des voies génitales supérieures (cavité utérine et trompes) et inférieures (cavité vaginale) (Nelson et al., 2016). Le placenta qui est un organe précédemment considéré comme stérile en l'absence d'infections cliniques, s'est révélé habité par des micro-organismes commensaux et le rôle du microbiote endométrial à l'interface fœto-maternelle en début de grossesse pourrait être d'un grand intérêt pour la médecine de la reproduction (Moreno et Simon, 2018). En effet, la présence de bactéries dans les tissus placentaires a été confirmée il y a plus de trois décennies par des techniques dépendantes de la culture et, plus récemment, par des techniques plus précises (PCR et séquençage de l'ADNr 16S) (Pelzer et al., 2017). Des bactéries non pathogènes appartenant aux *Firmicutes*, *Tenericues*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* et *Fusobacteria*, ont ainsi été enregistrées à ce niveau du tractus génital supérieur (Fox et Eichelberger, 2015).

I.2. Composition du microbiote vaginal sain

Depuis le début du XIX^{ème} siècle, les médecins et les chercheurs ont étudié la communauté microbienne vaginale humaine et ses relations avec différentes maladies. Ainsi, sur les 2 776 espèces bactériennes isolées chez l'être humain (Bilen et al., 2018), 581 espèces bactériennes au total ont été recensées dans le vagin à l'aide de cultures et/ou de techniques moléculaires (Diop et al., 2019).

Une analyse *in silico* sur une base de 31 études indépendantes ayant analysé la composition du microbiote vaginal sain nous a permis d'établir une liste exhaustive des différents taxons bactériens identifiés par des méthodes pasteuriennes ou moléculaires (Figure 2 et annexe 1) (Jin et al., 2007; Zhou et al., 2007, 2010; Dimitonova et al., 2008; Hernández-Rodríguez et al., 2011; Ravel et al., 2011; Gustafsson et al., 2011; El Aila et al., 2011; Yoshimura et al., 2011; Petricevic et al., 2012; Lee et al., 2013; Datcu et al., 2013; Hyman et al., 2014; Al Kassaa et al., 2014; Husain et al., 2014; Fettweis et al.,

2014; Albert *et al.*, 2015; Liu et Hao, 2015; Gautam *et al.*, 2015; MacIntyre *et al.*, 2015; Hickey *et al.*, 2015; Madhivanan *et al.*, 2015; Dareng *et al.*, 2016; Alioua *et al.*, 2016; Borgdorff *et al.*, 2017; Virtanen *et al.*, 2017; Yeruva *et al.*, 2017; Babu *et al.*, 2017; Jespers *et al.*, 2017; Doyle *et al.*, 2018; Ouarabi *et al.*, 2019).



Figure 2. Représentation des genres bactériens identifiés dans le microbiote vaginal sain. Le répertoire a utilisé des citations tirées de 31 publications et de l'outil en ligne Wordsift (<https://wordsift.org/>). La taille du nom est proportionnelle au nombre de fois que le taxon a été cité dans le répertoire. On remarque la dominance du genre *Lactobacillus*.

La composition du microbiote vaginal s'est avérée être très différente de celle décrite sur d'autres sites du corps humain et très éloignée de la grande diversité bactérienne trouvée dans l'intestin et la bouche, ce qui témoigne probablement du manque de divers nutriments exogènes entrant régulièrement dans cet écosystème microbien (Fredricks, 2011). L'archétype de la communauté bactérienne vaginale saine serait dominé par un petit nombre d'espèces du genre *Lactobacillus*, comme cela a été constaté sur un grand nombre de populations de différentes régions du monde, y compris d'ethnies, de statuts socio-économiques et de localisations géographiques différents (Anahtar *et al.*, 2018).

Quatre principales espèces ont été identifiées (**Figure 3**) : *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* et *L. gasseri*, ainsi que d'autres lactobacilles dans une proportion moindre, comme *L. acidophilus*, *L. ruminis*, *L. rhamnosus* et *L. vaginalis* (**Douillard et de Vos, 2014**) (**Figure 3**).

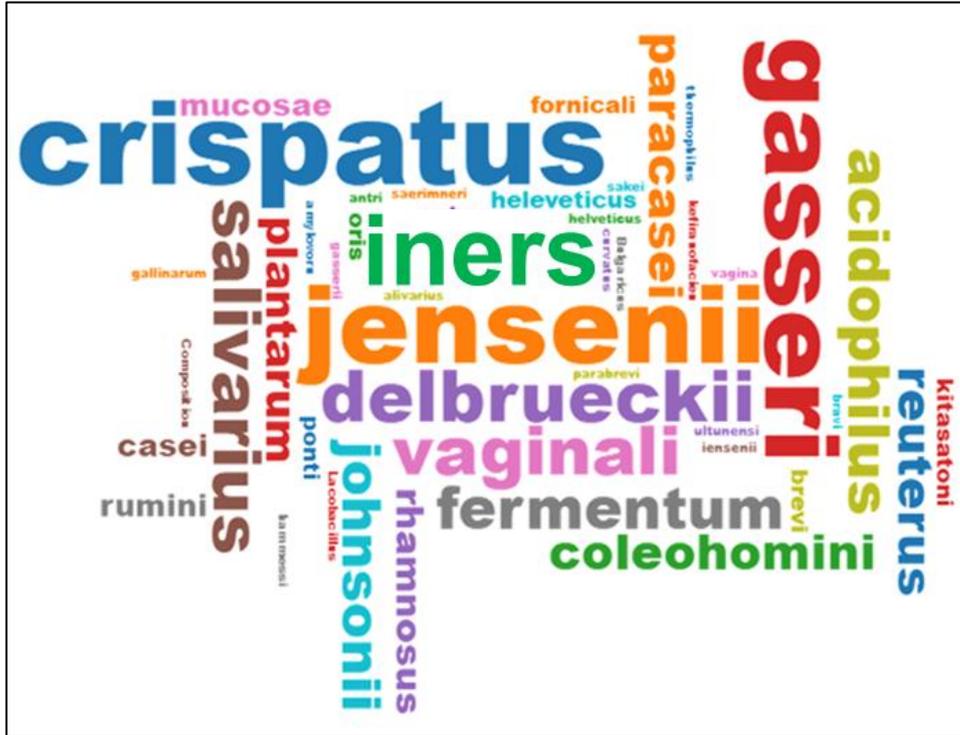


Figure 3. Représentation des espèces de lactobacilles identifiées dans le microbiote vaginal. Le répertoire a utilisé des citations tirées de 31 publications et de l'outil en ligne Wordsift (<https://wordsift.org/>). La taille du nom est proportionnelle au nombre de fois que le taxon a été cité dans le répertoire. Les quatre espèces dominantes sont *L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* et *L. gasseri*.

Un profil très précis de la typologie du microbiote vaginal sain a été établi par **Ravel et al. (2011)**. En effet, ces auteurs ont rapporté que seuls cinq profils du microbiote vaginal pouvaient être trouvés à travers le monde, tout comme pour le microbiote intestinal où seuls trois entérotypes ont été observés (**Cheng et Ning, 2019**). Les communautés du microbiote vaginal ont été regroupées en quatre groupes ou CST (Community State Type) dominés par des espèces de *Lactobacillus* (CST I dominé par *L. crispatus*, CST II par *L. gasseri*, CST III par *L. iners* et CST V par *L. jensenii*) et un groupe hétérogène, CST IV, caractérisé par des proportions plus élevées de bactéries strictement anaérobies (*Atopobium*, *Dialister*, *Aerococcus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Finegoldia*, etc.). Bien que les communautés du groupe IV ne soient pas dominées par *Lactobacillus* spp., certaines proportions de *L. iners* et *L. crispatus* ont été détectées dans de nombreuses communautés de ce groupe (**Ravel et al., 2011**). La production

d'acide lactique en tant que clé principale pour le maintien de la fonction du microbiote vaginal semble être conservée dans tous les groupes communautaires, car ce ne sont pas seulement les espèces de *Lactobacillus* mais aussi celles de *Atopobium*, *Leptotrichia* ou *Megasphaera* qui produisent de l'acide lactique (**Linhares et al., 2010; Huang et al., 2014**).

Le petit nombre de CST décrit dans le microbiote vaginal est quelque peu surprenant, mais la réponse est certainement la même que pour les trois entérotypes du microbiome intestinal. Ces communautés bactériennes sont probablement assemblées indépendamment juste après la naissance et l'organisme de l'hôte doit exercer une forte sélection pour un nombre assez limité d'espèces différentes mais utiles (**Ravel et al., 2011**). Cela est particulièrement évident pour le nombre limité d'espèces de *Lactobacillus* et d'autres bactéries productrices d'acide lactique dont l'abondance est dominante. La prédominance de ces espèces et leur rôle important dans la modulation du pH vaginal laissent penser qu'elles pourraient être des moteurs dans ces communautés selon le modèle conducteur-passager (**Walker, 1992; Peterson et al., 1998**). Les espèces passagères d'*Actinomyces*, *Bacteroides*, *Dialister*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Staphylococcus*, *Weisella*, *Veillonella* et *Ureaplasma* présentent une abondance plus faible et probablement un impact écologique mineur mais ont été systématiquement enregistrées pour chaque CST (**Ravel et al., 2011**) (**Figure 2**).

Les espèces de *Lactobacillus* apparaissent clairement comme dominantes pour l'ensemble des analyses car ces espèces ont été citées comme dominantes dans les CST I, II, III et V et également présentes dans le CST IV. Des taxons comme *Prevotella*, *Atopobium*, *Dialister*, *Sneathia*, *Gardnerella* et *Ureaplasma* apparaissent en deuxième position car ils ont été cités spécialement pour le groupe hétérogène CST IV mais aussi dans les analyses globales d'espèces passagères. D'autres taxons comme *Megasphaera*, *Achromobacter*, *Afipia*, *Peptoniphilus* et *Aneriglobus* qui sont rarement cités probablement parce qu'ils ont été rarement identifiés ou rarement discutés, complètent la liste des passagers.

Bien que moins étudiée, la composante fongique du microbiome, appelée « mycobiote », peut également être un important médiateur de la santé ou de la maladie. Comme les bactéries, les champignons sont omniprésents dans l'environnement, mais seules quelques espèces sont couramment associées à l'Homme. Parmi ces espèces, l'isolat le plus répandu est *Candida albicans*, une levure qui colonise normalement la peau et les cavités humaines, telles que les appareils gastro-intestinal et reproducteur. Les souches non-*albicans*

colonisent également les surfaces cutanéomuqueuses. Les espèces de *Candida* coloniseraient le tractus vaginal chez 20 à 30 % des femmes asymptomatiques non enceintes en bonne santé (Achkar et Fries, 2010). Bien que *Candida* spp. soient considérées comme les principaux colonisateurs fongiques de la muqueuse vaginale, des études microbiologiques plus récentes ont détecté jusqu'à 20 autres genres de champignons dans la niche vaginale, dont *Pichia*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* ou *Cladosporium* décrits comme des commensaux vaginaux (Walker, 1992; Limon et al., 2017).

Les symbiotes fongiques varient dans leur voie d'acquisition, car certaines espèces sont acquises à la naissance par transmission directe, entraînant une colonisation des surfaces des muqueuses, tandis que d'autres sont acquises par exposition ou contact régulier (Hall et Noverr, 2017). Cette colonisation est associée à un état sain et ne nécessite pas d'intervention thérapeutique lorsqu'elle est asymptomatique. La pathogénicité potentielle des levures commensales et les circonstances dans lesquelles elles pourraient évoluer en infection ne sont pas entièrement clarifiées. La colonisation vaginale par les levures a été décrite comme un état clinique courant chez les femmes préménopausées (Wylie et al., 2018). Les femmes enceintes, séropositives et diabétiques sont également plus à risque, de même que les femmes prenant des contraceptifs oraux, une thérapie hormonale de substitution et ayant déjà été sous antibiothérapie (Chatzivasileiou et Vyzantiadis, 2019).

Les populations de phages dans le tractus génito-urinaire restent largement inexplorées puisqu'il n'existe que quelques rapports sur cette niche. Les virus décrits sont principalement des phages (>99%), sans différence significative en ce qui concerne l'état de santé. La forte proportion de gènes codant pour une intégrase, identifiés dans ces phages, suggère leur mode de vie lysogène dans ce tractus. En ce qui concerne les virus eucaryotes, seuls des virus à ADN ont été identifiés dans le microbiote vaginal, appartenant principalement à la famille des *Papillomaviridae*, suivis par les *Herpesviridae*, *Anelloviridae* et *Poliomaviridae* (Zárate et al., 2017). Les modifications dans la diversité des virus vaginaux ont été corrélées aux modifications du microbiote bactérien vaginal dans différents stades physiologiques. La plus grande diversité virale vaginale a été associée à la naissance prématurée (Wylie et al., 2018).

I.3. Rôle protecteur du microbiote vaginal sain

Bien que le microbiote vaginal soit réparti en groupes communautaires différents (CST I-V), ce sont les mêmes fonctions qui ont été conservées. Le rôle fonctionnel le plus important de l'écosystème microbien vaginal serait associé à la stabilité des communautés microbiennes face aux changements environnementaux. Les populations vaginales de *Lactobacillus* spp. ont été détectées même avant la naissance (Pelzer et al., 2017) et dès ce stade très précoce, les lactobacilles endogènes peuvent établir une eubiose vaginale en éliminant de nombreux types d'agents pathogènes, par production d'acide lactique (Tachedjian et al., 2017) et d'autres substances antimicrobiennes (Dover et al., 2008) ou en générant un antagonisme par une compétition pour les nutriments (Amin et al., 2011). Plusieurs mécanismes de protection ont été observés : Production de substances antimicrobiennes (acide lactique, peroxyde d'hydrogène, bactériocines et biosurfactants) et la formation de biofilms.

I.3.1. Acide lactique

L'augmentation des niveaux d'œstrogènes, observée surtout entre la ménarche et la ménopause, induit un dépôt important de glycogène dans l'épithélium vaginal. Pendant cette période, le métabolisme anaérobie du glycogène par le microbiote induit l'acidification du vagin (pH d'environ 4) par le biais des lactobacilles qui utilisent le glycogène pour produire du lactate (Larrègue et al., 2008). Un pH vaginal faible a un effet antimicrobien et est également bénéfique pour d'autres agents antimicrobiens comme le peroxyde d'hydrogène qui est stable dans cette condition, ainsi que pour les bactériocines qui sont très actives (Dover et al., 2008).

La corrélation glycogène/lactobacilles/acide lactique a été confirmée en montrant que les échantillons vaginaux présentant le plus haut taux de glycogène libre contenaient aussi le plus grand nombre de lactobacilles et une forte acidité (pH 4), inversement, les échantillons présentant un faible taux de glycogène libre présentaient le plus faible nombre de lactobacilles et l'acidité la plus réduite (pH 5,8). Il a été démontré que des concentrations élevées de glycogène *in vivo* et, par conséquent, une acidité plus élevée correspondent à des niveaux accrus de *L. crispatus* et de *L. jensenii* (Vanechoutte, 2017). *In vitro* également, une abondance accrue de *L. crispatus*, *L. gasseri* ou *L. vaginalis* déclenche une diminution spectaculaire du pH (Boskey et al., 1999).

I.3.2. Peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)

L'inhibition de la croissance d'une espèce bactérienne par le peroxyde d'hydrogène généré par une autre espèce est un mécanisme d'antagonisme bactérien bien connu (**Dahiya et Speck, 1968**). Les lactobacilles, ainsi que d'autres bactéries productrices d'acide lactique, utilisent les flavoprotéines pour convertir l'oxygène en H₂O₂. Ce mécanisme, associé à l'absence de l'hémoprotéine catalase, entraîne généralement la formation d'H₂O₂ en quantités supérieures à la capacité de l'organisme à le dégrader. L'H₂O₂ a une activité microbicide, en particulier sur les bactéries qui manquent ou ont de faibles niveaux d'enzymes piégeant l'H₂O₂, telles que la catalase et la peroxydase. La quantité d'H₂O₂ produite dans le fluide vaginal des femmes ayant un microbiote vaginal sain a été estimée à 1-15,5 g/mL. Le peroxyde d'hydrogène semble s'ajouter à la défense antimicrobienne de l'environnement vaginal, mais il n'est probablement pas un facteur critique (**Dover et al., 2008**). Cependant, il crée un environnement défavorable à la transmission du VIH et inapproprié pour l'intrusion de bactéries endogènes et d'agents pathogènes exogènes (**Dover et al., 2008**). L'H₂O₂ peut également être auto-inhibiteur pour les bactéries qui le génèrent ou toxique pour les bactéries, les champignons et les virus adjacents, surtout en présence de peroxydases et d'halogénures contenus dans le mucus vaginal (**Bohbot, 2007; Amin et al., 2011**).

Des différences ont été détectées entre les différentes espèces de lactobacilles concernant la production de ces deux agents inhibiteurs. En effet, les souches de *L. iners* produisent des quantités limitées d'acide lactique et de peroxyde d'hydrogène (**Mirmonsef et al., 2014**). De ce fait, la prévalence des femmes colonisées de façon dominante par des souches de *L. iners* H₂O₂-négatives indique qu'elles présentent un risque plus élevé de dysbiose vaginale, ce qui suggère que la production d'H₂O₂ pourrait jouer un rôle important dans la protection et constitue donc un marqueur pour les lactobacilles protecteurs (**Vaneechoutte, 2017**).

I.3.3. Bactériocines

Les bactériocines sont des peptides antimicrobiens synthétisés par les ribosomes qui tuent ou inhibent la croissance d'autres bactéries, souvent indésirables. Les bactériocines sont produites par les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (**Dridier et Rebuffat, 2011**). Celles des bactéries à Gram positif sont principalement produites par des bactéries lactiques (LAB), appelées ci-après "LAB-bactériocins". Un récent schéma de classification des

bactériocines a été proposé (**Alvarez-Sieiro et al., 2016**) comprenant trois classes principales et différentes sous-classes. Les « LAB-bactériocins » sont dotées de multiples fonctions biologiques, y compris des activités antivirales (**Dridier et al., 2016 ; Chikindas et al., 2018**). Les « LAB-bactériocins » sont produites par des souches isolées de différentes sources, y compris le vagin humain. Les lactobacilles produisent de nombreuses bactériocines différentes qui contribuent au maintien de la santé vaginale (**Amin et al., 2011**). C'est le cas de la lactocine 160 et de la subtilosine produites par *L. rhamnosus* et *Bacillus amyloliquefaciens* respectivement (**Nader-Macías et Juárez Tomás, 2015**). La salivaricine CRL 1328 produite par *L. salivarius* CRL 1328 a été la première bactériocine extraite à partir d'une souche vaginale (**Ocaña et al., 1999**). D'autres exemples de bactériocines sont TL029, TL059a et TL080 produites par des souches de *L. gasseri*, *L. acidophilus* et *L. delbrueckii* ssp. *delbrueckii* d'origine vaginale (Alpay Karaoğlu et al. 2003).

I.3.4. Biosurfactants

Le microbiote vaginal comprend un large éventail de biosurfactants tels que les glycolipides, les substances protéiques, les phospholipides, les acides gras substitués et les lipopolysaccharides qui non seulement facilitent l'absorption de substrats solubles dans l'eau mais qui sont également impliqués dans l'adhésion des micro-organismes et dans l'activité antimicrobienne contre divers agents pathogènes (**Boris et Barbés, 2000**).

Souvent, l'activité des biosurfactants est surtout liée à une inhibition de l'adhésion des agents pathogènes plutôt qu'à une activité antimicrobienne directe (**Virtanen et al., 2017**) ou à une inhibition de la croissance cellulaire (**Satpute et al., 2016**). Par exemple, un biosurfactant produit par *L. gasseri* BC9 composé de molécules de type peptidique facilite la dispersion du biofilm de *Candida* (**Abruzzo et al., 2018**). De même, un biosurfactant de nature protéique et produit par *L. fermentum* RC-14 est sécrété et activé sous un faible pH vaginal et inhibe l'adhésion de *Candida albicans* (**Datcu et al., 2013**) et *Gardnerella vaginalis* (**Reid et Bruce, 2001**). On a également constaté que le biosurfactant produit par *Lactobacillus* sp. CV8LAC inhibe l'adhésion et, par conséquent, la formation de biofilms par différentes souches de *Candida albicans* (**Hyman et al., 2014**).

I.3.5. Formation de biofilms

Les lactobacilles provenant du microbiote vaginal sain ont la capacité de former un biofilm sur la muqueuse (**Lepargneur et Rousseau, 2002**). Les espèces du genre *Lactobacillus* présentent une large gamme d'adhésines leur permettant d'adhérer à la surface de l'épithélium vaginal. Il s'agit notamment des acides lipotéichoïques ainsi que des adhésines protéiques et non protéiques qui sont situées sur les fimbriae (**Dasari et al., 2016**). De cette façon, les espèces du genre *Lactobacillus* sont en concurrence avec *Gardnerella vaginalis* et *Candida albicans* pour la formation d'un biofilm vaginal (**Boris et Barbés, 2000**). Des biofilms ont été observés dans le vagin, dans l'utérus et même dans les trompes de Fallope et leur analyse aideraient certainement à comprendre l'interaction complexe entre ce microbiote et son hôte (**Franasiak et Scott, 2015**).

I.4. Dynamique du microbiote vaginal en fonction de l'âge

Dès la naissance et durant l'enfance, les communautés microbiennes vaginales ont tendance à évoluer vers une composition stable. Une fois définie, cette composition va se maintenir, malgré les multiples perturbations, tout au long de la vie. Des changements réversibles dans la composition du microbiote peuvent être déclenchés par des facteurs externes ou par des interactions complexes entre les membres de la communauté microbienne (**Faust et al., 2015**). Les facteurs externes comprennent tous les événements se produisant au sein de l'appareil reproducteur féminin comme la ménarche, les différentes phases et périodicité du cycle menstruel, l'activité sexuelle, la grossesse, la contraception, la ménopause ainsi que l'utilisation de médicaments et les pratiques d'hygiène, qui entraînent des changements récurrents ou transitoires dans la composition du microbiote vaginal (**Mastromarino et al., 2013**).

I.4.1. A la naissance et pendant l'enfance

Un premier contact du fœtus avec le microbiote maternel a déjà été observé au niveau du placenta, mais la colonisation massive initiale se produit à la naissance, lorsque le nouveau-né est exposé pour la première fois au tractus vaginal de sa mère en cas d'accouchement par voie basse ou par les bactéries de la peau du personnel soignant en cas d'accouchement par césarienne. Ce contact établit le point de départ des colonisations intestinale, cutanée et vaginale, et dans les semaines et les mois qui suivent la naissance, celles-ci se différencient en communautés distinctes pour chaque habitat. En ce qui concerne

le microbiote vaginal, on a observé que pendant deux à quatre semaines après la naissance, les œstrogènes maternels sont toujours présents et servent de médiateur pour l'épaississement de l'épithélium vaginal de la petite fille. Le glycogène est produit et entretient des lactobacilles indigènes qui le fermentent et produisent de l'acide lactique induisant un faible pH vaginal (**Hickey et al., 2012**).

Cet état est maintenu plusieurs semaines après la naissance. Probablement lié aux influences maternelles et à la diversification progressive des aliments, le pH du vagin du nourrisson augmente jusqu'à devenir neutre et le restera de 6 à 8 mois jusqu'à la puberté. Ce pH neutre pendant l'enfance pourrait favoriser le développement d'une variété de cocci et de bacilles comme *Neisseria gonorrhoeae* et *Streptococcus pyogenes* (**Dasari et al., 2016**), mais généralement un état stable est installé avec une communauté contenant une gamme diversifiée d'espèces de bactéries aérobies, strictement anaérobies et entériques (**Husain et al., 2014**).

Le faible nombre d'études effectuées sur le microbiote vaginal chez les enfants a montré que ce dernier était composé de genres comme *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Streptococcus* et *Mycoplasma* (**Farage et al., 2010**). L'étude de la composition du microbiote vaginal chez les adolescentes, avant les premières menstruations, a révélé que sa composition était modifiée par rapport à l'état d'enfance, conformément aux changements des niveaux d'œstrogènes, et qu'elle serait plus similaire à celle des femmes en âge de procréer (**Greenbaum et al., 2019**).

I.4.2. A la puberté

Pendant la puberté, les fluctuations hormonales déclenchent des changements physiques par lesquels le corps de l'enfant devient un corps adulte capable de se reproduire. Au cours de ce processus de maturation qui se produit entre 8 et 13 ans, le développement folliculaire entraîne une augmentation de la production d'œstrogènes, qui s'accompagne d'un épaississement de l'épithélium vaginal et d'une production intracellulaire de glycogène. Les changements les plus radicaux du microbiote vaginal se produisent au début de la puberté et sont directement liés à cette augmentation de la quantité de glycogène. Le niveau élevé de ce dernier stimule la croissance des bactéries productrices d'acide lactique, en particulier les lactobacilles et les streptocoques, de même que le nombre de levures et d'autres espèces bactériennes responsables d'infections diminue progressivement (**Dasari et al., 2016**). De nouvelles conditions environnementales sont donc progressivement créées pendant la puberté,

la sélection des micro-organismes capables de fermenter le glycogène en acide lactique et l'acidification concomitante du milieu vaginal deviennent un état stable qui caractérisera les femmes en âge de procréer (**Hickey et al., 2012**). Ces conditions sont maintenues pendant les années de fertilité dans un vagin sain avec des fluctuations caractéristiques pendant le cycle menstruel (**Gustafsson et al., 2011**).

I.4.3. A l'âge adulte

Le début de la ménarche s'accompagne d'un développement folliculaire systémique et d'une production d'œstrogènes qui maintiennent l'état stable du microbiote vaginal. En âge de procréer, l'épithélium vaginal reste constamment épais et le dépôt de glycogène est accru (**Godha et al., 2018**). Le cycle menstruel introduit de courtes modifications périodiques dans la composition du microbiote vaginal mais le niveau de lactobacilles est restauré très rapidement vers un état stable (**Linhares et al., 2010**). Pendant les menstruations, on a observé que l'abondance de *Gardnerella vaginalis* augmentait alors que celle des espèces de lactobacilles diminuait. L'augmentation du taux de fer pendant les menstruations pourrait favoriser la croissance accélérée de *Gardnerella vaginalis* mais pas celle des lactobacilles (**Greenbaum et al., 2019**). Seule *L. iners* reste stable. La capacité hémolytique de cette espèce à lyser les globules rouges du sang vaginal pendant les menstruations pourrait jouer un rôle dans l'apport de nutriments et sa survie pendant les menstruations (**Macklaim et al., 2011**). Il a été observé qu'au moment des menstruations, le pH vaginal augmentait pendant plusieurs jours pour atteindre un maximum (pH 6) au 2^{ème} jour, ce qui est corrélé avec une brève diminution de l'abondance des lactobacilles (**Godha et al., 2018**). Le plus grand nombre de lactobacilles a été signalé pendant la phase lutéale (**Vanechoutte, 2017**), ce qui permet aux espèces de *Lactobacillus* de rester dominantes à la fin des menstruations. Le microbiote vaginal peut passer temporairement d'un type de communauté à un autre pendant la période menstruelle. Par exemple, la communauté vaginale dominée par *L. crispatus* peut se retrouver momentanément dominée par *L. iners* ou passer en état communautaire hétérogène (CST IV). Le CST dominé par *L. iners* se transforme plus souvent en CST IV par rapport au CST dominé par *L. gasseri* qui transite rarement vers d'autres types (**Fettweis et al., 2014**).

En âge de procréer, le microbiote vaginal sain est mis face à de multiples autres influences comme les moyens de contraception, les produits d'hygiène ou les médicaments, ainsi qu'à de nombreux facteurs liés aux comportements sexuels (**Fox et Eichelberger, 2015**),

mais un microbiote sain est toujours capable de rétablir un état stable (**Farage et al., 2010**). La grossesse est la période où se produisent d'importantes adaptations cardiovasculaires, métaboliques et endocriniennes et malgré cela, le microbiote vaginal reste très stable en raison de l'absence de fluctuations hormonales et de flux menstruel. Les sécrétions cervicales et vaginales sont enrichies en glycogène, ce qui favorise la prolifération des lactobacilles (**Fox et Eichelberger, 2015**). Cet état stable du microbiote vaginal pendant la grossesse peut contribuer au processus complexe de maintien de l'état de l'embryon et du fœtus dans l'utérus et au maintien d'une période de gestation adéquate (**Nelson et al., 2016**). Une relation directe entre la durée normale de la gestation et la composition du microbiote vaginal a été observée (**Nelson et al., 2016**).

De même que l'état de dysbiose du microbiote vaginal a été incriminé dans la morbidité fœtale, il a été également associé à des problèmes de santé tels que le diabète gestationnel, le faible poids de naissance, l'entérocolite nécrosoante et les coliques (**Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014**).

I.4.4. A la ménopause

La ménopause est caractérisée par une chute spectaculaire du taux d'œstrogènes. En conséquence, la stimulation ostrogénique de l'épithélium vaginal est réduite et le niveau de glycogène vaginal - qui est le substrat préféré des lactobacilles - est également réduit. Ainsi, le taux de lactobacilles diminue et le pH vaginal augmente (**Leckie, 2010**). En raison de l'augmentation du pH vaginal, seulement 39 % à 55 % des femmes ménopausées ont une communauté microbienne vaginale dominée par les lactobacilles (**Mitchell et Waetjen, 2018**). Environ 10^8 cellules de *Lactobacillus* spp. peuvent être trouvées par millilitre de fluide vaginal chez les femmes ménopausées (**Dasari et al., 2016**), contre 10^{12} cellules par millilitre chez les femmes en âge de procréer (**Quentin, 2006**).

En plus des lactobacilles, d'autres bactéries comme *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus* et des levures comme *Candida albicans*, peuvent coloniser le microbiote, déclenchant un nouvel état stable (**Muhleisen et Herbst-Kralovetz, 2016**). En période de périménopause, ce nouveau microbiote mixte semble très sensible aux dysbioses et aux infections (**Dasari et al., 2016**). Lorsque les niveaux d'œstrogènes sériques diminuent, l'épithélium vaginal et la *lamina propria* se dilatent, une atrophie progressive des muscles lisses apparaît, le collagène et l'élasticité des tissus sont perdus et différents symptômes

vaginaux sont possibles et ont été enregistrés pour plus de 50 % des femmes ménopausées: gêne, sécheresse, démangeaisons, atrophie et dyspareunie (Mitchell et Waetjen, 2018). La composition des microbiotes semble répondre à ces modifications de leur habitat qui prédisposent à la remontée des bactéries externes dans les voies urinaires (Leckie, 2010).

I.5. Caractère ethnique du microbiote vaginal

Une étude portant sur une large cohorte de 396 femmes nord-américaines, issues de quatre groupes ethniques différents (caucasien, africain, hispanique et asiatique), indique que les cinq CST sont représentés dans tous les groupes ethniques, mais que les proportions de chaque type de communauté varient parmi celles-ci. Les communautés bactériennes vaginales dominées par des espèces de *Lactobacillus* (groupes I, II, III et V) ont été trouvées chez 80,2 % et 89,7 % des femmes asiatiques et caucasiennes, respectivement, mais chez seulement 59,6 % et 61,9 % des femmes hispaniques et africaines, respectivement. Le CST IV était surreprésenté chez les femmes hispaniques (34,3 %) et africaines (38,9 %) par rapport aux femmes asiatiques (17,6 %) et caucasiennes (9,3 %). En conséquence, même si la production d'acide lactique était conservée dans toutes les types de communautés, le pH vaginal des femmes était plus élevé chez les femmes hispaniques (pH $5,0 \pm 0,59$) et africaines (pH $4,7 \pm 1,04$) que chez les femmes asiatiques (pH $4,4 \pm 0,59$) et caucasiennes (pH $4,2 \pm 0,3$) (Ravel et al., 2011).

Ainsi, sur une cohorte malawienne, il a été enregistré que les femmes sont en moyenne plus susceptibles d'être définies comme appartenant au CST IV par rapports aux autres CST qui ont été trouvés en moins grande abondance (Doyle et al., 2018). Une cohorte nigériane a présenté le CST IV comme dominant pour 50 % des femmes, le CST III (dominé par *L. iners*) pour 39,2 %, tandis que le CST I (dominé par *L. crispatus*) n'était présent qu'à 7,2 %. Les CST II et CST V étaient absents de cette étude, mais un nouveau groupe a été observé, le CST VI dominé par les protéobactéries, pour 2,9 % (Dareng et al., 2016). Une proportion de 40 % des femmes britanniques ont présenté le CST I (dominée par *L. crispatus*) comme le groupe le plus représenté sur une cohorte de 42 femmes (MacIntyre et al., 2015). Les femmes néerlandaises ont également présenté le CST I comme type de communauté dominante (39 %) par rapport aux femmes turques et marocaines qui ont présenté le CST III comme type de communauté dominante (33 % et 32 %, respectivement) (Borgdorff et al., 2017).

Il est intéressant de noter que dans une même localisation géographique, plusieurs différences entre les groupes ethniques sont maintenues (**Figure 4**) car le CST I semble être dominant dans les groupes caucasiens, le CST IV dans les groupes africains et hispaniques, le CST III dans les cohortes asiatiques, turques et marocaines. Les groupes turcs et marocains se distinguent également par une proportion particulièrement élevée des CST II et V. Les raisons de ces différences entre les divers groupes ethniques sont inconnues, mais elles sont probablement régies par des différences génétiques impliquant notamment des particularités dans les systèmes immunitaires inné et adaptatif, la composition et la quantité des sécrétions vaginales, et les ligands à la surface des cellules épithéliales (**Ravel et al., 2011**). Bien que ces éléments puissent être essentiels à la formation des communautés vaginales, des études antérieures ont également montré que les habitudes et pratiques humaines, notamment l'hygiène personnelle, les méthodes de contrôle des naissances et les comportements sexuels, exercent également de fortes influences (**Schwebke, 2009**).

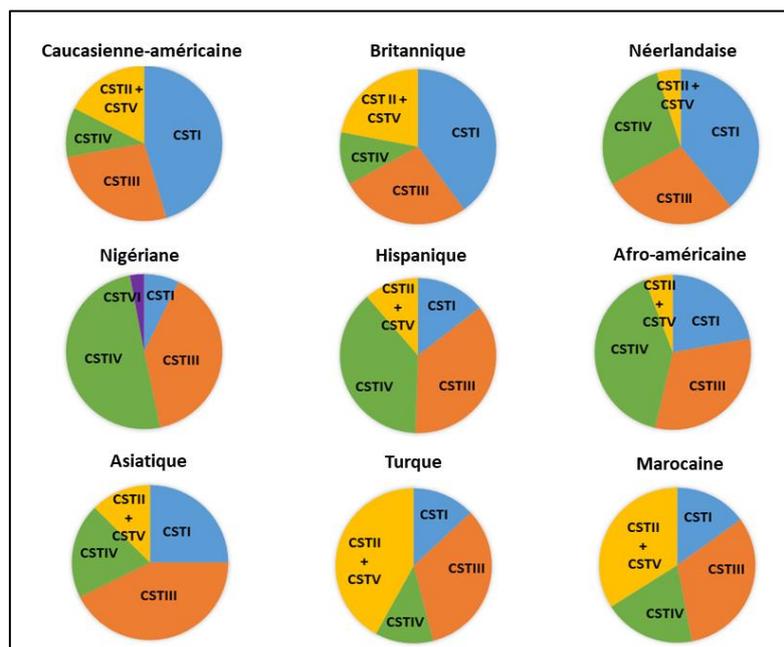


Figure 4. Représentation des CST dans les différents groupes ethniques. Les ethnies nigériane (**Dareng et al., 2016**), britannique (**MacIntyre et al., 2015**), néerlandaise, turque et marocaine (**Borgdorff et al., 2017**), hispanique, afro-américaine, caucasienne-américaine et asiatique (**Ravel et al., 2011**) sont représentées. Pour être en accord avec toutes les études, les types de communautés CST II et CST V ont été représentés ensemble pour tous les groupes ethniques.

II. Déséquilibre du microbiote vaginal

Le microbiote vaginal a été largement étudié comme un "écosystème" dont la composition saine contribue à protéger contre les agents pathogènes envahissants responsables d'infections urinaires ou de maladies sexuellement transmissibles (**Al Kassaa et al., 2014**). Les liens existants entre le microbiote, l'immunité de l'hôte et la stérilité semble être une clé à la compréhension de la physiologie et la physiopathologie de la reproduction humaine (**Moreno et Franasiak, 2017**). Cette structure communautaire semble être étroitement associée à l'inflammation génitale, telle que mesurée par les cytokines pro-inflammatoires cervico-vaginales et la présence de cellules immunitaires activées. Cette inflammation est à son tour associée à un certain nombre d'effets néfastes sur la reproduction, notamment une incidence accrue des IST et à des troubles obstétriques (**Anahitar et al., 2015**).

Bien que le système immunitaire semble largement tolérer la colonisation par le genre *Lactobacillus*, certaines espèces peuvent atténuer ou améliorer les réponses immunitaires et inflammatoires locales. Par exemple, les communautés vaginales dominées par *L. crispatus* sont associées à des niveaux inférieurs de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 α , IL-1 β et IL-8) par rapport aux communautés dominées par les bactéries associées à la vaginose bactérienne (VB) retrouvée essentiellement au sein du groupe hétérogène CST IV (**Pruski et al., 2018**).

Ainsi alors que les types I, II, III et V sont associés à un taux plus faible d'infections urinaires et vaginales et à des résultats obstétriques favorables, le type IV, à flore essentiellement polymicrobienne, est un facteur de risque pour le développement de complications obstétriques et de la VB. Cela est dû à sa capacité à induire la synthèse de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 6 (IL 6) et l'activation de cellules présentatrices d'antigènes, qui vont par conséquent recruter des lymphocytes T CD4+ vaginaux et stimuler la réponse immunitaire, associée à un taux accru de fausses couches récurrentes, de naissances prématurées, de chorioamnionites, d'endométrites post-partum ou de septicémies postnatales (**Tur-Torres et Alijotas-Reig, 2018**).

Les principaux types d'infections du tractus urogénital sont les infections bactériennes et fongiques aiguës et récurrentes. La VB, la candidose vulvo-vaginale (CVV) et les infections de l'urètre, de la vessie, de l'uretère, du rein ou du col de l'utérus touchent 300 millions de femmes par an dans le monde. Rien qu'aux États-Unis, ces pathologies entraînent

un coût annuel des soins de santé d'environ 1,6 milliard de dollars (**Nader-Macías et Juárez Tomás, 2015**).

II.1. Vaginose bactérienne (VB)

Le microbiote vaginal est un système dynamique dans lequel les bactéries pathogènes que l'on trouve souvent en petit nombre chez les femmes en bonne santé peuvent dans certains cas largement dépasser le nombre d'espèces de lactobacilles. Cette condition de remplacement du genre *Lactobacillus* par des espèces pathogènes est appelée "vaginose bactérienne". Les lactobacilles sont principalement remplacés par *Gardnerella vaginalis* et d'autres espèces anaérobies telles que *Prevotella*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma* et *Ureaplasma* (**Dover et al., 2008**).

La VB est une modification de la composition du microbiote vaginal, tant en nombre qu'en type de bactéries. La concentration de bactéries vaginales est 1000 fois plus élevée dans le vagin chez les femmes atteintes de vaginose que chez les femmes ayant une flore majoritairement composée de lactobacilles (**Ekström et al., 2013**). Aucun agent pathogène unique n'a été identifié de manière concluante comme étant la cause de la VB. La question de savoir si cette dernière est une maladie sexuellement transmissible fait l'objet d'un débat. On ne sait pas exactement pourquoi les femmes développent ce syndrome, et plus précisément si les facteurs de l'hôte jouent un rôle dans la susceptibilité. Malgré plusieurs décennies de recherche, il y a plus de questions que de réponses sur la pathogenèse de cette infection (**Fredricks, 2011**).

Dans le tractus génital féminin, *Mycoplasma* et *Ureaplasma* ont été directement impliqués dans les cas de VB (**Melgaço et al., 2018**). D'autres études sur les causes microbiennes de cette inflammation ont principalement porté sur des agents pathogènes établis tels que *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, le virus *Herpes simplex 2* (HSV-2) et *Trichomonas vaginalis* (**Anahtar et al., 2015**).

La VB peut être classée comme asymptomatique ou symptomatique. L'observation que le microbiote vaginal chez les femmes asymptomatiques est largement composé de bactéries capables de produire de l'acide lactique conduit à affirmer que l'acide lactique a une fonction écologique clé potentielle dans les microbiotes vaginaux associés à l'eubiose (**Tachedjian et al., 2017**). L'ambiguïté dans la caractérisation de cette pathologie peut expliquer la notion de VB asymptomatique chez les femmes considérées comme saines, ainsi

que la forte récurrence de cette infection après le retour à un état qui n'est pas dominé par le *Lactobacillus* après antibiothérapie, et qui n'est pas nécessairement pathologique selon la compréhension actuelle et plus large de la flore vaginale normale (Solt et Cohavy, 2012).

II.2. Candidose vulvo-vaginale (CVV)

La CVV est l'une des infections les plus courantes du tractus génital féminin. La plupart des cas (80 à 85 %) sont causés par *Candida albicans*, alors que les espèces non-*albicans* de *Candida* représentent 5 à 20 % des cas. Ces dernières peuvent être dues à *Candida glabrata* (5 à 10 % des cas) ou à *Candida tropicalis* (< 5 % des cas) (Singh et al., 2002).

Plus de 50 % des femmes de plus de 25 ans ont eu un épisode de candidose, mais environ 5 % de ces femmes connaissent une infection récurrente (Hu et al., 2015). Dans la vaginite à *Candida*, certaines cellules fongiques à la surface de la muqueuse peuvent vivre au sein d'un biofilm d'espèces mixtes comprenant principalement des membres bactériens du microbiote vaginal. La récalcitrance de ces cellules du biofilm au traitement antifongique classique empêcherait l'éradication complète des organismes de la cavité vaginale et pourrait expliquer la récurrence fréquente de cette infection fongique symptomatique (Douglas, 2003).

II.3. Infections sexuellement transmissibles (IST)

Les IST sont un problème de santé majeur dans le monde entier et une importante cause de morbidité génitale. Le papillomavirus humain (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* sont les quatre agents les plus impliqués dans ces infections génitales. Les infections dues à ces agents pathogènes touchent principalement les jeunes femmes et peuvent entraîner des complications dévastatrices sur le long terme (Burgener et al., 2015).

Deux des IST les mieux décrites qui augmentent le risque de l'infection au VIH sont celles dues au HSV-2 et au HPV. Chacune a été associée à un taux accru d'acquisition du VIH dans de grandes méta-analyses (Burgener et al., 2015).

L'inflammation résultant d'une VB à *Gardnerella vaginalis* est un facteur d'augmentation du risque de VIH. Certaines molécules produites par cette bactérie telles que la vaginolysine et les enzymes sialidase et prolidase provoquent la formation de pores et une

desquamation des cellules épithéliales rendant cet environnement favorable à l'implantation du VIH (**Bayigga et al., 2019**).

II.4. Complications des infections vaginales

La compréhension actuelle de ce qui constitue un microbiote vaginal "sain", y compris la façon dont il varie dans le temps ou parmi des populations de patientes hétérogènes, est en pleine évolution. Un ensemble important et convaincant de preuves implique que le microbiote vaginal est la source dominante de l'invasion microbienne de la cavité amniotique (**DiGiulio, 2012**). Des études cliniques ont associé la VB à des troubles durant la grossesse, notamment des naissances prématurées, des ruptures prématurées des membranes, un travail précoce et une endométrite post-partum (**Martin, 2012**).

De vastes études transversales ont démontré que les femmes enceintes atteintes de VB au cours du deuxième ou du troisième trimestre ont un risque de 40 à 84 % plus élevé de donner naissance à un enfant prématuré par rapport aux femmes qui ne présentent pas cette infection (**Anahtar et al., 2015**). En effet, cette pathologie est associée à l'infection intra-amniotique et constitue un facteur de risque important de naissance prématurée et d'avortement spontané (**Solt et Cohavy, 2012**). La naissance prématurée semble être l'événement final dans l'aboutissement de multiples interactions environnementales, maternelles, fœtales et microbiennes complexes. Ainsi, il a été proposé que l'infection intra-amniotique soit un événement qui précipite le travail prématuré (**Fox et Eichelberger, 2015**).

Par ailleurs, les femmes qui hébergent des taxons associés à la VB ne donnent pas forcément naissance à un enfant prématuré. Les comparaisons génomiques de divers isolats cliniques de *Gardnerella vaginalis* révèlent de multiples sous-types avec des tailles de génome et des fonctions enzymatiques très différentes. Les différences de capacités enzymatiques et fonctionnelles entre les souches de *Gardnerella vaginalis* pourraient expliquer la variabilité de l'impact sur la biologie de l'hôte (**Chu et al., 2018**).

II.5. Dysbiose vaginale et cancer

La dysbiose peut avoir un impact sur d'importants processus physiologiques. Chez une femme en bonne santé, le microbiote vaginal est séparé de l'hôte par un système de barrières à plusieurs niveaux qui comprend, entre autres, une couche de mucus, la sécrétion de médiateurs immunitaires solubles et un épithélium intact aux jonctions serrées. Ce système de barrière est également soutenu par des cellules immunitaires. Par exemple, les cellules B produisent des IgA qui aident à neutraliser les bactéries pathogènes. Lorsque ce système de barrière à multiples facettes échoue, les bactéries pathogènes peuvent se déplacer à travers

l'épithélium vaginal, provoquant une inflammation chronique de faible intensité qui peut être le précurseur d'une cancérogénèse (**Chase et al., 2015**). Les modifications des communautés microbiennes cervicovaginales dues à la dysbiose ou à des facteurs environnementaux peuvent altérer le métabolisme cervicovaginal et certaines études ont montré une forte association entre les médiateurs immunitaires génitaux et une diminution de l'abondance de *Lactobacillus* spp. dans la cancérogénèse du col de l'utérus (**Ilhan et al., 2019**).

L'incidence de la VB accentue la susceptibilité d'être infecté par le HPV qui est le principal agent causal du développement et de la progression du cancer du col de l'utérus. Le HPV peut être classé en deux types, le type à haut risque donnant lieu à un carcinome du col de l'utérus et le type à faible risque produisant des verrues bénignes. Environ 40 types de HPV donnent lieu à des verrues anogénitales, dont 12 types probablement cancérogènes. Les HPV-16 et HPV-18 sont considérés comme les types les plus oncogènes et sont présents dans 71% des cas de cancer du col de l'utérus (**Banerjee et al., 2015**). Par ailleurs, il existe des preuves solides que l'infection par le HPV est nécessaire mais pas suffisante pour le développement de maladies vaginales invasives (**Kyrgiou et al., 2017**).

II.6. Stratégies de traitement des infections vaginales

Le manque de données exhaustives sur la diversité du microbiote vaginal chez les espèces cultivées est un obstacle à la compréhension de l'étiologie et de la pathogénie de la VB et à la recherche de stratégies thérapeutiques. Cependant, les progrès de la biologie moléculaire, en particulier la métagénomique, le séquençage et l'analyse phylogénétique du gène de l'ARNr 16S, ont renforcé l'exploration du microbiome humain, et du microbiote vaginal en particulier (**Dione et al., 2017**).

II.6.1. Traitements antibiotiques et médicamenteux

Bien que les traitements antibiotiques et médicamenteux puissent être efficaces pour éradiquer les infections, plusieurs problèmes sont apparus, tels que les bactéries multi-résistantes (**Bouridane et al., 2016**). Cette résistance bactérienne pourrait être associée à la formation de biofilms. En effet, les premiers biofilms en gynécologie, spécifiquement sur l'endomètre et les trompes de Fallope, ont été décrits chez des femmes atteintes de VB. Le biofilm de vaginose, comprend principalement *Gardnerella vaginalis* et *Atopobium vaginae*, avec des concentrations plus faibles de lactobacilles. Ni le système immunitaire ni les antibiotiques n'éradiquent tous les micro-organismes de ces biofilms. Par conséquent, les

infections liées au biofilm peuvent être persistantes et récurrentes (**García-Velasco et al., 2017**).

Des techniques de dépistage et des thérapies ciblées ont été proposées en particulier dans les régions à faibles ressources afin de dépister les patientes ne présentant pas une dominance de lactobacilles vaginaux, et donc potentiellement à risque de naissance prématurée, par la surveillance du pH vaginal. Des thérapies ciblées pourraient alors éventuellement être utilisées, notamment un gel vaginal contenant de l'acide lactique et du glycogène ou une souche probiotique par voie vaginale pour favoriser un niveau sain de lactobacilles (**Fox et Eichelberger, 2015**).

D'autres interventions vaginales ciblées sur les microbiotes sont conçues pour promouvoir ou maintenir l'acidité vaginale, l'idée étant qu'un environnement plus acide facilite la croissance des espèces de lactobacilles et inhibe les agents pathogènes génito-urinaires. Un essai d'inoculation de vitamine C par voie vaginale pour le traitement de la VB a montré une augmentation des taux de *Lactobacillus* spp. dans le frottis vaginal des femmes traitées durant une semaine (79%) et durant deux semaines (76%) par rapport au placebo (53% et 52%, respectivement) (**Anahtar et al., 2015**).

II.6.2. Traitements à base de probiotiques

Pour prévenir les récurrences d'infections urogénitales, on a tenté de modifier la composition du microbiote vaginal des femmes sensibles par l'instillation de lactobacilles exogènes. Toutefois, pour déterminer l'impact de ces traitements, il convient d'utiliser des méthodes qui permettent de surveiller de manière fiable la dynamique de cette composition (**Burton et Reid, 2002**).

En effet, l'utilisation de microbicides ou de probiotiques a été fortement entravée par le manque de stratégies de dosage validées, les effets spécifiques des souches et les problèmes de stabilité des produits. La plupart des études qui évaluent le potentiel des probiotiques utilisent des échantillons de petite taille, de sorte que les effets ne peuvent être généralisés à des populations plus importantes (**Barrons et Tassone 2008**). En âge de procréer, chez les femmes non enceintes, l'utilisation de souches probiotiques pour éradiquer la VB ou la CVV a été évaluée principalement de plusieurs façons (comme traitement simultané aux médicaments antimicrobiens, comme traitement ultérieur aux médicaments antimicrobiens utilisés et comme thérapie unique pour améliorer l'état de l'écosystème vaginal). Dans la

plupart des études, les produits probiotiques commerciaux ou les nouvelles formulations probiotiques potentielles ont été administrés par voie vaginale (**Nader-Macías et Juárez Tomás, 2015**).

Les probiotiques ont de nombreux effets utiles sur le microbiote vaginal, notamment des effets immunitaires antagonistes et stimulants. En utilisant des probiotiques pour stimuler le développement de micro-organismes favorisés, il va de soi que nous pourrions être en mesure de réduire le taux des éventuelles bactéries nocives et de renforcer les mécanismes de défense innés. Bien que le traitement aux probiotiques semble réussir à augmenter la quantité vaginale des lactobacilles chez certaines femmes, l'impact sur les résultats cliniques est moins clair (**Ventolini, 2015**). Dans un essai randomisé de femmes enceintes qui ont utilisé un probiotique oral quotidien à base de *L. rhamnosus* GR et *L. reuteri* pendant 8 semaines au début du deuxième trimestre, aucune différence n'a été observée dans les taux de colonisation vaginale par *Lactobacillus* ou d'accouchement prématuré (**Anahtar et al., 2015**). D'autres études ont montré que les lactobacilles isolés du microbiote vaginal pourraient être de bons candidats à une utilisation en tant que probiotiques (**Al Kassaa et al., 2014; Ouarabi et al., 2019**).

Avoir une idée claire des taxons composant le microbiote vaginal sain devient un point essentiel dans le traitement des pathologies liées au tractus génital féminin. En effet étant donné les nombreuses corrélations retrouvées entre la dysbiose du microbiote vaginal et les complications de grossesses aussi bien pour la mère que pour le fœtus, le développement d'outils d'analyses précis et rapides devient une nécessité dans le milieu médical.

Les méthodes de culture conventionnelles ont permis de déterminer seulement 20% des bactéries présentes dans l'écosystème vaginal. Actuellement, la plupart des études sur le microbiote vaginal sont basées sur le séquençage d'ADN. Les analyses métagénomiques prennent en compte le séquençage complet des différents génomes du microbiote. Les analyses métagénomiques ciblées (métabarcoding) visent le séquençage du gène ARNr 16S qui présente des régions communes pour toutes les bactéries et des régions variables et spécifiques pour chaque taxon bactérien. Le criblage sur des microarrays ADN reste également une technologie fiable utilisée notamment dans le milieu hospitalier pour l'identification rapide des taxons du microbiote. Pour le microbiote vaginal, cet outil a déjà

fait ces preuves (**Cruciani et al., 2015**). La technique de PCR quantitative reste la méthode la plus utilisée pour les validations ciblées (**Diop et al., 2018**).

Avec des investigations plus poussées basées sur l'utilisation de ces technologies de pointe, les traitements probiotiques peuvent être ajustés selon la composition du microbiote vaginal de chaque femme ouvrant ainsi la voie vers une gestion médicale personnalisée en gynécologie.

III. La métagénomique dans l'étude du microbiote vaginal

III.1. Définition de la métagénomique

Auparavant gênés par le fait que plus de 99% des microorganismes échappent à la culture, les microbiologistes ont maintenant accès à une vision beaucoup plus précise de la composition taxonomique, de la diversité génétique fonctionnelle et de la dynamique des populations microbiennes grâce à la montée en puissance du séquençage de nouvelle génération et de la réduction constante des coûts de séquençage qui ont fait de la métagénomique un standard de référence en écologie microbienne (**Halary et al., 2016**).

Le terme « métagénomique » a été utilisé pour la première fois par Jo Handelsman *et al.* en 1998, le définissant comme la collecte de tous les génomes des membres d'une communauté microbienne à partir d'un certain environnement (**Handelsman et al., 1998**). La métagénomique décrit l'analyse de l'ADN purifié directement à partir d'un environnement naturel, sans passer par la culture des microorganismes *in vitro*. Ce terme est ainsi consacré à l'étude des communautés microbiennes dans leur état naturel (**Godzik, 2011**).

Les études classiques des écosystèmes microbiens ont visé l'isolement des microorganismes, leur maintien en culture, l'amplification de cibles conservées, le clonage et le séquençage Sanger (**Uprety et al., 2018**). Dans les années 2000 les coûts du séquençage Sanger avoisinaient les 500 dollars par Mb. Ainsi, les projets de métagénomique ont été accessibles seulement aux laboratoires qui disposaient de ressources financières importantes (**Temperton et Giovannoni, 2012**). La diversification des technologies de séquençage de 2^{ème} et 3^{ème} génération au cours de la dernière décennie ainsi que la simplification des méthodes de préparation d'échantillons et la diminution des couts de séquençage qui a suivie, ont rendu les applications de la métagénomique plus abordables dans le domaine médical comme dans le domaine environnemental (**Uprety et al., 2018**). En succession rapide, le

séquençage 454 (Roche), Illumina, SOLID (Life Technologies) et Pacific Biosciences ont permis de réduire le cout du séquençage à moins de 0,10 Dollars par Mb (**Temperton et Giovannoni, 2012**).

La métagénomique a d'abord été appliquée aux communautés microbiennes des océans et des sols, où moins de 1% des micro-organismes peuvent être cultivés en laboratoire (**Walker et al., 2014**) mais a rapidement été popularisée dans des études visant les microbiotes humains. Ainsi, beaucoup d'études de métagénomique ont été engagées sur la composition des microbiotes humains en abordant l'identification et la quantité relative de différents taxons et gènes contenus dans un échantillon (**Nayfach et Pollard, 2016**).

III.2. Principales techniques en métagénomique

III.2.1. Séquençage par la méthode de Sanger

Le séquençage Sanger est une méthode développée par Frederick Sanger et ses collaborateurs dans les années 1970 qui est basée sur l'incorporation sélective de didésoxynucléotides de terminaison de chaîne par l'ADN polymérase pendant la répllication *in vitro* de l'ADN (**Solomon, 2018**).

En effet, cette technique de séquençage ciblée utilise des amorces oligonucléotidiques pour rechercher des régions spécifiques de l'ADN. Le séquençage Sanger commence par la dénaturation de l'ADN double brin. Sur l'ADN simple brin sont ensuite alignées des amorces oligonucléotidiques et un nouveau brin est allongé à l'aide d'un mélange de désoxynucléotides triphosphates (dNTP), qui fournissent les nucléotides adénine (A), cytosine (C), thymine (T) et guanine (G) nécessaires pour construire la nouvelle structure double brin. En outre, une petite quantité de didésoxynucléotides triphosphates (ddNTPs) de terminaison de chaîne pour chaque nucléotide est incluse. La séquence continuera à s'étendre avec les dNTP jusqu'à ce qu'un ddNTP s'y attache. Comme les dNTP et les ddNTP ont une chance égale de s'attacher à la séquence, chaque séquence se terminera à des longueurs variables (**Gomes et Korf, 2018**).

Le séquençage Sanger est une méthode de séquençage de l'ADN de "première génération". Malgré les avantages des techniques de séquençage de la prochaine génération (dite la nouvelle génération de séquençage ou NGS), dont le rendement est supérieur d'un ordre de grandeur, le séquençage Sanger conserve une place essentielle dans la génomique clinique pour au moins deux objectifs spécifiques. Premièrement, le séquençage Sanger sert

de méthode orthogonale pour confirmer les variantes de séquences identifiées par les NGS (**Hagemann, 2015**). Deuxièmement, le séquençage de Sanger permet de "rapiécer" la couverture des régions qui sont mal couvertes par les NGS. Dans les essais ciblés de NGS, il peut y avoir des régions qui sont résistantes au séquençage, en raison d'une mauvaise capture, amplification ou autres particularités. Ces régions sont souvent riches en contenu GC. Une approche pour rétablir la couverture de ces régions consiste à augmenter la quantité d'ADN d'entrée, mais la quantité disponible peut être limitée. Il peut être possible de redéfinir l'étape d'amplification ou les réactifs de capture, ou encore de dépanner la technologie NGS. Cependant, une approche très pratique, lorsque la zone à remblayer est petite, consiste à utiliser le séquençage Sanger pour couvrir les régions mal couvertes par les NGS (**Hagemann, 2015**).

III.2.2. Pyroséquençage

Le pyroséquençage est une méthode de séquençage de l'ADN qui diffère du séquençage de Sanger, car elle repose sur la synthèse d'un brin complémentaire (sequencing by synthesis) suivi de la détection de la libération de pyrophosphate et la génération de lumière sur l'incorporation des nucléotides, plutôt que sur la terminaison de chaîne avec des didésoxynucléotides (**Simner et al., 2015**).

Le pyroséquençage est une technique fiable, rapide et à haut débit qui permet d'analyser jusqu'à 96 échantillons d'ADN en 4 heures environ. Elle est basée sur l'addition et l'incorporation séquentielles de nucléotides qui peuvent être quantifiés par la conversion du pyrophosphate libéré naturellement en un signal lumineux en temps réel. Le pyrophosphate libéré est utilisé dans une réaction de sulfurylase libérant de l'ATP qui est ensuite utilisé par la luciférase pour produire de la lumière. Le pyroséquençage a un large éventail d'applications, notamment la détection de l'insertion/suppression, le nombre de copies de gènes et la méthylation de l'ADN. Le pyroséquençage, mis au point pour la première fois en 2003 par Colella et al. a été appliqué avec succès au séquençage de novo et au re-séquençage des génomes, ainsi qu'à la détection de biomarqueurs de méthylation de l'ADN pour le diagnostic et le pronostic du cancer (**Zhao et Bapat, 2016**).

Le pyroséquençage ne nécessite pas d'électrophorèse ni aucune autre procédure de séparation de fragments et est donc plus rapide que le séquençage Sanger. Il ne peut générer que jusqu'à 150 pb en une seule expérience mais il peut être automatisé de manière

massivement parallèle, ce qui permet d'obtenir des centaines de milliers de séquences à la fois, peut-être jusqu'à 1000 Mb en un seul passage (**El-Bondkly, 2014**).

III.2.3. Séquençage Illumina

Technologie développée par Solexa en 2006, le séquençage Illumina est une technologie appelée comme la précédente, « sequencing by synthesis ». Le principe est basé sur l'incorporation réversible de nucléotides fluorescents et par lecture optique de cette fluorescence. L'ADN génomique à séquencer est au départ fragmenté et ligaturé à des molécules « adaptateurs » pour être ensuite fixé sur un support solide, la « flow-cell ». Ensuite, l'amplification par PCR des fragments d'ADN est effectuée en utilisant la séquence d'adaptateur comme amorce. Environ 1000 copies identiques des molécules d'ADN sont synthétisées et toutes sont déposées à proximité les unes des autres. Comme l'apparence de chaque fragment d'ADN amplifié par PCR en pont (« bridge-PCR ») sur lame ressemble à une colonie bactérienne, on les appelle des clusters ou « polymerase colony » (« polony »). Leur taille est d'environ un micron de diamètre. Ensuite, le séquençage est effectué par des cycles répétés d'ajout de nucléotides réversibles marqués par fluorescence et d'incorporation des nucléotides au brin complémentaire. La fluorescence des nucléotides incorporés est détectée. Ensuite, le blocage (le groupe terminateur à l'extrémité 3' et le colorant fluorescent sont éliminés) dans le nucléotide incorporé est supprimé, puis le cycle suivant est lancé. De même, après chaque cycle d'incorporation des nucléotides, l'image fluorescente est détectée. Grâce à cette technique, la longueur de lecture est de 25 à 35 bases par réaction et on estime qu'environ 40 millions de clusters d'ADN peuvent être séquencés à la fois (**Saraswathy et Ramalingam, 2011**).

III.2.4. Ion Torrent

En 2010, Ion Torrent Systems Inc. (maintenant détenue par Life Technologies) a commercialisé son séquenceur de paillasse. Ion Torrent utilise la technologie de séquençage des semi-conducteurs ioniques. La puce Ion Torrent est un pH-mètre ultrasensible qui détecte les ions hydrogène libérés lors de l'incorporation de nucléotides pendant la synthèse de l'ADN (**Chang et al., 2015**).

La technologie Ion Torrent fonctionne sur le principe de la détection de la libération d'ions hydrogène lors de l'incorporation de nouveaux nucléotides dans le brin complémentaire de la matrice d'ADN (« sequencing by synthesis »). Lorsqu'un nucléotide est incorporé dans

un brin d'ADN par une polymérase, un ion hydrogène est libéré en tant que sous-produit. Ion Torrent, avec son séquenceur Ion Personal Genome Machine (PGM™), utilise un réseau de haute densité de puits pour effectuer l'incorporation de nucléotides de manière massivement parallèle. Chaque puits contient une matrice d'ADN différente. Sous les puits se trouve une couche sensible aux ions, suivie d'un capteur d'ions. L'ion modifie le pH de la solution, qui est détecté par le capteur. S'il y a deux bases identiques sur le brin d'ADN, la tension de sortie est doublée et la puce enregistre deux bases identiques. Au lieu de détecter la lumière comme dans le cas du pyroséquençage, la technologie Ion Torrent détecte le changement de pH et crée ainsi le lien direct entre les événements chimiques et numériques (**Gupta et Gupta, 2014**).

III.2.5. Séquençage PacBio

Si les technologies de séquençage de deuxième génération (SGS) ont apporté de grandes améliorations par rapport au séquençage Sanger, leurs limites, en particulier leur faible longueur de lecture, les rendent peu adaptées à certains problèmes biologiques particuliers, notamment l'assemblage et la détermination de régions génomiques complexes, la détection d'isoformes géniques et la détection de la méthylation. Le séquençage SMRT (Single-molecule real-time), développé par Pacific BioSciences (PacBio), offre une approche alternative pour surmonter nombre de ces limitations. Pour être concis, il est appelé "séquençage PacBio" ci-après, bien que le "séquençage SMRT" soit également utilisé par la communauté (**Rhoads et Au, 2015**).

Le séquençage PacBio est une méthode de séquençage de molécules individuelles d'ADN, réalisé en parallèle. Ce séquençage utilise des dispositifs ZMW (zero-mode waveguide) pour détecter la fluorescence. Une polymérase particulière a été construite, elle est capable d'incorporer des nucléotides et ensuite de couper leur tag fluorescent. La molécule de polymérase est fixée dans le ZMW et agit sur une seule molécule d'ADN matrice. Les 4 nucléotides utilisés dans la synthèse du brin complémentaire sont marqués d'une fluorescence spécifique. Pour chaque incorporation, le tag fluorescent est clivé et la fluorescence détectée par le ZMW. Cette fluorescence est ensuite diffusée en dehors de la zone de détection. Les réactions de séquençage monomoléculaire en temps réel sont effectuées en parallèle sur des milliers de chambres de visualisation nanophotoniques, générant les lectures de séquençage.

Les outils bioinformatiques sont ensuite utilisés pour les assembler afin de générer les contigs, les chromosomes et, finalement, la séquence du génome (**Dorado et al., 2019**).

III.2.6. Séquençage Oxford Nanopore

Le séquençage Oxford Nanopore est une méthode de séquençage de l'ADN qui est en cours de développement depuis 1995. En février 2012, Oxford Nanopore Technologies au Royaume-Uni, a présenté les premières données de cette technologie. Un nanopore est simplement un petit trou de l'ordre de 1 nm de diamètre interne qui est constitué par certaines protéines cellulaires transmembranaires. Ce séquençage fonctionne sur le principe des changements infimes du courant électrique à travers le nanopore immergé dans un fluide conducteur, une tension étant appliquée lorsqu'un nucléotide (ou brin d'ADN) en mouvement le traverse. Chaque nucléotide de la molécule d'ADN, lorsqu'il passe à travers le nanopore, obstrue le nanopore à un degré différent et caractéristique, et la quantité de changement de courant est caractéristique de chaque nucléotide différent. L'ADN peut être forcé à passer par le pore une base à la fois. La modification du courant peut être directement lue, et la séquence de l'ADN passant peut être déterminée en détectant les modifications du courant généré spécifiques à la base passée. (**Gupta et Gupta, 2014**).

III.3. Avantages de la métagénomique

Les études basées sur l'utilisation de la métagénomique ont permis de surmonter les limites des techniques basées sur la culture. Celles-ci ont été aidées par divers outils bioinformatiques pour analyser les banques de données en vue de rechercher de nouveaux gènes et enzymes (**Bilal et al., 2018**).

En effet, les environnements de culture de routine fournis en laboratoire imposent une pression sélective qui empêcherait la majorité des microbes de se développer. Cela pourrait être attribué à un certain nombre de facteurs différents tels que des modifications des niveaux d'oxygène dans l'atmosphère, des conditions osmotiques, des éléments nutritifs spécifiques nécessaires à la survie, ainsi que des conditions de pH et de température (**Ngara et Zhang, 2018**).

III.4. Types d'études en métagénomique

Pour l'analyse métagénomique, le séquençage peut être utilisé selon deux approches différentes: l'analyse ciblée d'une région variable (comme le gène 16S RNA) qui fait l'objet

de la métagénomique ciblée (metabarcoding) ou l'analyse métagénomique totale WGS (Whole Genome Sequencing), qui repose sur le séquençage de toutes les séquences d'un échantillon sans émettre d'hypothèses sur son contenu (**Amrane et Lagier, 2018**).

III.4.1. La métagénomique WGS

La métagénomique WGS consiste dans le séquençage de l'ensemble de l'ADN contenu dans un échantillon donné provenant d'un écosystème microbien, et générant ainsi une importante quantité de données concernant le génome de tous les organismes présents (bactéries, champignons, virus, protistes, etc.). Un travail bioinformatique très important est nécessaire pour pouvoir reconstruire le génome individuel de chaque organisme à partir d'un tel mélange et la complexité de telles données rend difficile l'application des algorithmes d'assemblages de génomes. Ces derniers doivent en effet être capables d'aligner et comparer des fragments de génomes bactériens, eucaryotes et/ou viraux, dans des proportions variables et comprenant de nombreuses régions répétées, similaires, et/ou de faible complexité (**Ghurye et al., 2016**).

III.4.2. La métagénomique ciblée

Le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S) comme gène marqueur phylogénétique est l'une des méthodes les plus courantes pour identifier les taxons bactériens faisant parties d'un microbiote (**Acinas et al., 2004**). (**Tringe et Hugenholtz, 2008**).

L'ADNr 16S code pour la composante ARN de la sous-unité 30S du ribosome bactérien. Il est présent dans toutes les espèces bactériennes. Différentes espèces bactériennes possèdent une à plusieurs copies de l'ADNr 16S. Le séquençage de l'ADNr 16S est de loin l'une des méthodes les plus courantes pour étudier la phylogénie bactérienne et la classification des genres/espèces (**Wang et al., 2015**).

Les ADNr 16S ont des régions conservées et variables. Les zones conservées reflètent la relation phylogénétique entre les espèces et les régions très variables reflétant les différences entre les espèces (**Mitreva, 2017**). En effet, l'ADNr 16S, long d'environ 1500 pb, contient des régions conservées (fonctionnellement importantes) et neuf régions variables situées alternativement (V1-V9; fonctionnellement moins importantes). La similarité ou la diversité des séquences dans les régions variables peut être utilisée pour distinguer les différentes espèces. Dans l'analyse métagénomique ciblée de l'ADNr 16S, les fragments

d'ADN des régions variables de toutes les espèces bactériennes de la communauté sont simultanément amplifiés par PCR grâce à des amorces universelles dessinées dans les régions annexes aux régions conservées (Takayasu *et al.*, 2019).

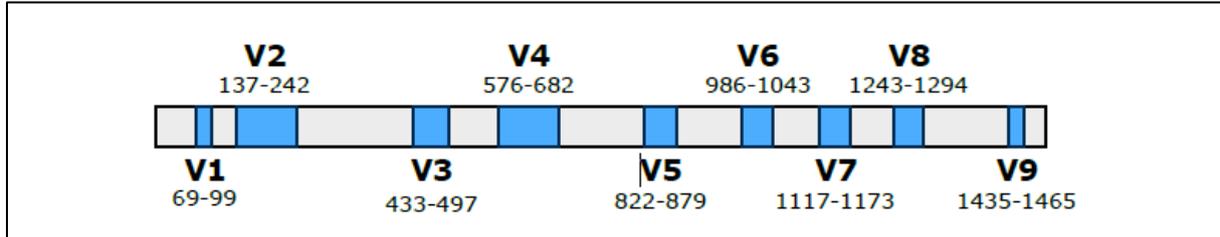


Figure 5. Régions conservées (gris) et hypervariables (bleu) de l'ADNr 16S bactérien. Ces dernières sont numérotées de V1 à V9 et leurs positions sont indiquées (Baker *et al.*, 2003)

Pour les études des espèces fongiques, les séquences d'ADN situées à proximité du gène ARNr 5,8S donnent des marqueurs plus discriminants que l'ADNr 18S. L'espaceur interne transcrit (ITS) est une région d'ADN codant pour de l'ARN non fonctionnel et situé entre les séquences codant pour des ARNr structurels. Il est transcrit dans un précurseur commun, qui est particulièrement utile pour élucider les relations entre les espèces congénères et les genres étroitement liés (Hao *et al.*, 2015). Cet espaceur présente deux régions, ITS1 et ITS2, qui sont séparées par le gène codant pour l'ADNr 5,8S (Froeschke *et von der Heyden*, 2014).

Plusieurs couples d'amorces existent dans la littérature pour capter ces régions, notamment le couple d'amorces ITS1-ITS2 (encadrant la région ITS1) et le couple ITS3-ITS4 (encadrant la région ITS2) (White, 1993).



Figure 6. Organisation de l'opéron ribosomique comprenant les régions hypervariables ITS1 et ITS2 (White, 1993).

III.5. Limitations de la métagénomique

La métagénomique a suscité un grand intérêt mais les limites techniques doivent aussi être prises en compte : une mauvaise stratégie d'échantillonnage, un biais au niveau de l'extraction de l'ADN ou de l'amplification peuvent conduire à des résultats erronés. La présence d'ADN contaminant introduit dans l'étape d'extraction par exemple, peut laisser penser à tort qu'une espèce est présente au sein d'une communauté. Toutes les espèces peuvent ne pas être sensibles aux étapes de lyse cellulaire entraînant un biais dans leur représentation au niveau de leur matériel génétique (**Champomier-Verges et Zagorec, 2015**).

Une fois le séquençage réalisé, les données brutes doivent être transformées en une liste de bactéries classées selon leur appartenance à des phyla, genres, familles et espèces et ensuite il faut identifier leur abondance relative. Au cours de ce processus, différentes étapes de normalisation et filtrage de données doivent être respectées: les séquences des adaptateurs doivent être retirés des résultats, les séquences d'ADN humain doivent également être retirées, les séquences (reads) doivent être assemblées en contigs s'il s'agit d'un séquençage *de novo* ou alors retrouvées comme référencées dans une base de données s'il s'agit d'un alignement sur des génomes de référence (**Miller et al., 2013**). Le choix de la base de données et des paramètres définissant une correspondance avec le niveau du genre ou de l'espèce doit être choisie en fonction de la vitesse et de la précision d'analyse souhaitées (**Miller et al., 2013**). Une base de données de référence incomplète serait un facteur de confusion pour cette étape de l'analyse (**Schlaberg et al., 2017**).

Une autre limitation est qu'il peut être difficile d'assembler les génomes, en particulier ceux des membres les moins abondants du microbiote ou dans les situations où une communauté contient de nombreuses espèces étroitement apparentées (**Walker et al., 2014**).

Matériel & méthodes

I. Population de l'étude

Au total, 100 femmes saines consultant le service de gynécologie d'un établissement hospitalier privé de la ville de Bejaia (Algérie) ont participé à cette étude. Un consentement écrit a été obtenu de toutes les participantes. Les antécédents médicaux ont été recueillis, plus particulièrement en ce qui concerne les situations gestationnelles antérieures, les symptômes gynécologiques, le statut infectieux et les antécédents de traitement antibiotique ou hormonal. Les femmes ont été exclues de l'étude si elles étaient enceintes, consultaient pour des infections vaginales ou sous traitement hormonal de substitution. Un nombre de 50 femmes en âge de procréer (âge moyen de $35,1 \pm 7,2$ ans) et 50 femmes ménopausées (âge moyen de $57,7 \pm 8,2$ ans) ont été retenues (**Annexe 2**).

IV. Technique de prélèvement

Le prélèvement a été effectué par le gynécologue responsable du service, par la mise en place d'un spéculum stérile, sans nettoyage antiseptique, de l'exocol. Une brosse a été insérée dans l'endocol en effectuant un mouvement de rotation afin de récupérer une quantité suffisante de sécrétions vaginales dans un falcon stérile. Les échantillons vaginaux ont été immédiatement congelés et conservés à -80°C jusqu'à l'extraction. Parallèlement à chaque prélèvement vaginal, une prise de sang a été effectuée pour chaque patiente afin de réaliser un dosage hormonal d'œstradiol.

V. Extraction de l'ADN génomique total

L'ADN total des échantillons vaginaux a été extrait à l'aide du kit Power Fecal DNA de QIAamp (Qiagen, Hilden, Allemagne) selon les spécifications fournies par le fournisseur. Pour chaque échantillon, 0,25 g de sécrétions vaginales ont été ajoutés au tube à billes fourni dans le kit. Afin de préparer la lyse cellulaire, 750 μL de solution de broyage (Power Bead solution) et 60 μL de la solution C1 (dodécylsulfate de sodium) ont été ajoutés au tube à billes contenant les sécrétions vaginales. Ce dernier a ensuite été mis sous agitation et puis sous chauffage à 65°C pendant 10 min.

Le contenu du tube à billes a été centrifugé à 13 000 g pendant 1 min. Le surnageant a été transféré dans un tube de collecte propre de 2 mL et 250 μL de la solution C2 ont été ajoutés avant d'incuber à 4°C pendant 5 min puis le tube a été centrifugé à nouveau. La solution C2 est dotée d'une technologie d'élimination des inhibiteurs IRT (Inhibitor Removal *Technology*) qui permet de précipiter les matières organiques et inorganiques autres

que l'ADN, y compris les polysaccharides, les débris cellulaires et les protéines. La même étape a été effectuée avec la solution C3 (technologie d'élimination des inhibiteurs-IRT) afin d'optimiser le rendement de pureté.

Le surnageant a été transféré dans un tube de collecte de 2 mL puis additionné de 1200 µL de la solution saline à haute concentration C4. Le mélange a été chargé dans une colonne de filtration en trois fois avec une étape de centrifugation à 13 000 g entre chaque chargement. La colonne a ensuite été lavée avec 500 µL de la solution C5 avant d'être transvasée dans un tube de collecte de 2 mL. La solution C5 est une solution de lavage à base d'éthanol utilisée pour nettoyer davantage l'ADN qui est lié à la membrane de la colonne. Cette solution de lavage élimine le sel résiduel et d'autres contaminants. L'éluion de l'ADN retenu dans la membrane de la colonne a été réalisé par ajout de 100 µL de la solution C6 (10 mM Tris). Lorsque la solution C6 traverse la membrane, l'ADN qui a été lié en présence d'une forte teneur en sel est sélectivement libéré. L'ADN récupéré a immédiatement été congelé à -80°C.

Le dosage de l'ADN extrait a été effectué en mesurant l'absorbance avec le spectrophotomètre BioSpectromètre Eppendorf (Hambourg, Allemagne) et les valeurs des ratios $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ et $A_{260 \text{ nm}} / A_{230 \text{ nm}}$ ont été utilisées pour l'estimation de la pureté. La qualité des échantillons a été analysée à l'aide du bioanalyseur Agilent 2100 (Santa Clara, Californie, États-Unis).

VI. Séquençage d'ADN et analyse métagénomique ciblée

Le séquençage a été réalisé sur la plateforme de la Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège en Belgique. Pour le séquençage du gène de l'ARNr 16S, l'amplification par réaction en chaîne avec une polymérase (PCR) de la région V1-V3 de l'ADNr 16S et la préparation de la librairie ont été réalisées avec les amorces suivantes (avec des adaptateurs inversés d'Illumina) : direct (5'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3') et inverse (5'-GAGAGTTTGGCTCAG-3'). Chaque produit de PCR a été purifié avec le kit de billes Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Pasadena, USA) et soumis à un second cycle de PCR pour indexation, en utilisant les amorces d'index 1 et 2 de Nextera XT. Après purification, les produits de PCR ont été quantifiés en utilisant le Quant -IT PicoGreen (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, USA) et dilué à 10 ng/µL. Une quantification finale, par qPCR, de chaque échantillon de la librairie a été réalisée à l'aide du kit KAPA SYBR FAST qPCR (KapaBiosystems, Wilmington, USA) avant normalisation, regroupement et

séquençage sur un séquenceur MiSeq utilisant des réactifs v3 (Illumina, USA) (**Allen et al., 2016**).

Pour l'analyse de la composante fongique, des bibliothèques de PCR d'ADNr 5,8S-ITS2 ont été préparées pour chaque échantillon en utilisant des amorces universelles avec des adaptateurs Overhang d'Illumina ciblant la région ITS2. L'amorce directe ITS3KYO2 (5'-GATGAAGAACGYAGYRAA-3'), et l'amorce inverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ont été utilisées pour leur importante couverture des taxons de champignons.

Le traitement des données a été effectué en utilisant, respectivement, le progiciel MOTHUR v1.35 et l'algorithme UCHIME pour l'alignement, la réalisation des clusters et la détection de chimères.

VII. Analyses qPCR

Afin de confirmer l'abondance des espèces bactériennes les plus présentes, des amorces amplifiant le gène de l'ARNr 16S de manière spécifique ont été sélectionnées en fonction de références bibliographiques (**Tableau I**).

Les réactions d'amplification ont été réalisées dans des microplaques de 96 puits avec le système de détection en temps réel iCycler iQ par PCR (BioRad) dans un volume réactionnel de 20 μ L [10 μ L qPCR Core Kit for SYBR Green I (Eurogentec), 1 μ L d'ADN, 1,5 μ L de chaque amorce (4 μ M)]. L'amplification a été réalisée suivant le programme suivant : Dénaturation à 95°C/3 min, 40 cycles (95°C/15 s, 65°C/30 s et 72°C/30s) et enfin extension finale à 72°C/10 min.

Pour chaque paire d'amorces, une courbe de fusion a été réalisée pour vérifier la spécificité de l'amplification. Toutes les réactions ont été effectuées en triplicata. La valeur du cycle correspondant au signal de seuil (Ct) a été déterminée automatiquement et les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel CFX Manager (BioRad). Un contrôle négatif sans matrice d'ADN a été inclus pour chaque amplification.

D'autre part, les échantillons ont été quantifiés pour l'ADN bactérien total avec le même test SYBR Green ciblant le gène d'ARNr 16S. Le nombre de copies du gène donne une approximation du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon étudié.

Tableau I. Séquences d'amorces utilisées pour l'analyse qPCR.

Cible	Amorce	Séquence 5'-3'	Tm °C	Référence
<i>Lactobacillus crispatus</i>	989F Lcrisp	TCTTGACATCTAGTGCCATTTGT	63°C	Fredricks et al. 2009
	1055R Lcrisp	TGCACCACCTGTCTTAGC		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	983F Gvag	ACCTGGGCTTGACATGTGCCT	63°C	
	1059R Gvag	CATGCACCACCTGTGAACCTG		
<i>Atopobium vaginae</i>	ATOVAGRT3Fw	GGTGAAGCAGTGGAAACACT	62°C	De Backer et al. 2007
	ATOVAGRT3Rev	ATTCGCTTCTGCTCGCGCA		
<i>Lactobacillus gasseri</i>	LactoF	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	60°C	
	LgassR	CAGTTACTACCTCTATCTTTCTTCACTAC		
<i>Lactobacillus jensenii</i>	LABJENTR2Fw	CCTTAAGTCTGGGATAACCATT	54°C	
	LABJENRT2Rev	ACGCCGCCTTTTAAACTTCTT		
<i>Lactobacillus iners</i>	InersFw	GTCTGCCTTGAAGATCGG	65°C	
	InersRev	ACAGTTGATAGGCATCATC		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Lpla-3	ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT	65°C	Petricevic et al. 2012
	Lpla-2	CCTGAACTGAGAGAATTTGA		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Lfer-3	ACTAACTTGACTGATCTACGA	55°C	
	L-fer4	TTCACTGCTCAAGTAATCATC		
Bactéries totales	Tot1	ACTCCTACGGGAGGCAG	55°C	Amann et al. 1990

VIII. Analyse statistique

Les comparaisons statistiques entre les différents résultats obtenus ont été effectuées par analyse de la variance ANOVA à l'aide du logiciel XLSTAT 2009. Pour déterminer la diversité bêta, une partie de ces résultats a été soumise à une analyse en composantes principales (ACP) en utilisant le package FactoMineR sur le logiciel R version 3.5.2 (r-project.org).

La diversité alpha a été estimée en se basant sur le calcul de l'indice de Shannon suivant la formule :

$$\text{Indice de Shannon} = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i$$

où s est le nombre de séquences et p_i la fréquence relative de la séquence de taille i .

Les graphes ont été tracés en utilisant le logiciel GraphPad Prism version 8.00 pour Windows.

Résultats & discussion

I. Analyse de la composante bactérienne du microbiote vaginal

Une analyse métagénomique ciblée du gène de l'ARNr 16S a été réalisée à partir d'échantillons vaginaux de 50 femmes en âge de procréer (J) et de 50 femmes ménopausées (M) et permet de comparer la richesse bactérienne globale et la composition phylogénétique du microbiote. Après le traitement des séquences, un total de 181 unités taxonomiques opérationnelles (OTU) différentes a été identifié chez les femmes jeunes contre 431 OTU chez les femmes ménopausées. Tous les résultats du séquençage ont été archivés dans la base de données « National Center for Biotechnology Information (NCBI) BioProject repository » (N° PRJNA630844).

I.1. Diversité microbienne

Le nombre moyen d'OTU décrites dans cette étude est d'environ 426, ce qui est assez proche du total de 581 espèces bactériennes décrites dans la littérature comme appartenant à la niche vaginale et ce en utilisant des techniques de culture et/ou moléculaires (**Bilen et al., 2018**). Ce nombre varie d'une femme à l'autre ; par conséquent, la manière relative de comparer la richesse des communautés et la biodiversité consiste à comparer les mesures de diversité alpha et bêta.

I.1.1. Diversité alpha

Dans l'analyse métagénomique, la diversité alpha est une mesure du nombre de séquences et s'exprime par des indicateurs comme l'indice de Shannon (IS). L'IS donne une mesure de la biodiversité en tant que quantité d'information basée en occurrence sur le nombre de séquences (**Shannon, 1948 ; Shannon et Weaver, 1963**). La valeur de cet indicateur est proportionnelle à la diversité des séquences d'ADN identifiées dans les différents échantillons.

Une augmentation significative de l'IS a été observée dans le groupe M ($p < 0,0001$) (**Figure 5**) ce qui indique que la diversité des séquences d'ADN obtenues dans le microbiote vaginal des femmes ménopausées est beaucoup plus importante que celle des femmes jeunes.

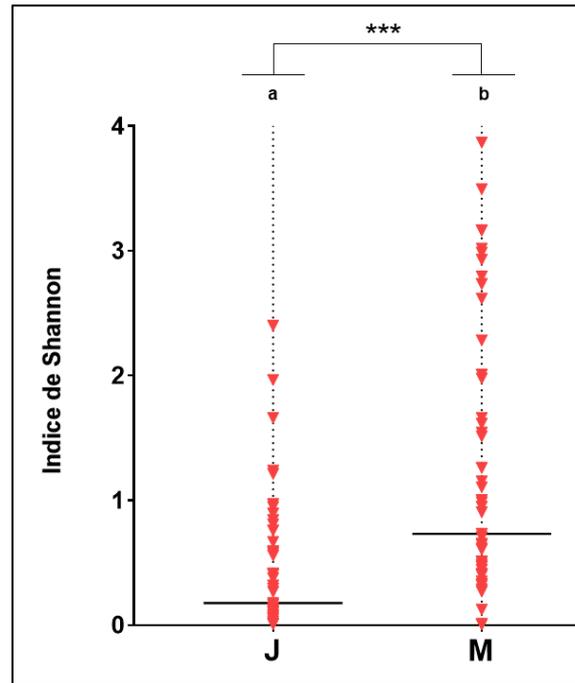


Figure 7 Indice de Shannon de la diversité bactérienne du microbiote vaginal chez les femmes jeunes (J) et ménopausées (M). Les différences significatives sont indiquées par les lettres a,b) ; *** indique ($p < 0,0001$).

I.1.2. Diversité bêta

La diversité bêta est une mesure de la biodiversité qui consiste à comparer la diversité des taxons entre les différents groupes analysés. L'ACP regroupant les taxons du microbiote vaginal a également révélé une différence dans la composition et une augmentation très importante de la diversité des taxons chez les femmes du groupe M (**Figure 6**).

Cette modification est à prendre en compte dans les analyses épidémiologiques car une composition modifiée et une abondance modifiée dans le microbiote vaginal a été associée à une augmentation des risques de dysbiose chez les femmes ménopausées (**van de Wijgert et Jaspers, 2016**).

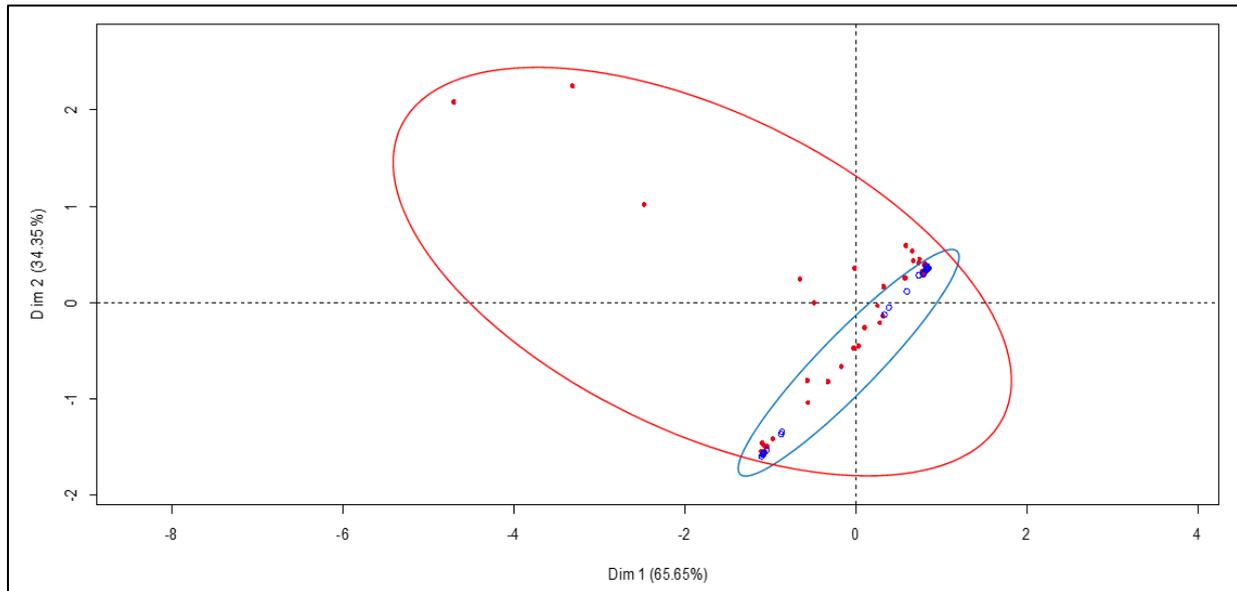


Figure 8. Analyse en composantes principales (ACP) de la diversité des taxons bactériens du microbiote vaginal prélevé sur des femmes jeunes (J) et ménopausées (M) (n=50 par groupe). Le groupe des femmes J (cercle bleu) présente une diversité taxonomique restreinte par rapport au groupe des femmes M (cercle rouge).

I.2. Caractérisation du microbiote vaginal

La composition de chaque communauté microbienne a été étudiée au niveau du phylum bactérien, du genre et de l'espèce pour les principales OTU présentes chez les différentes femmes avec une abondance $\geq 0,01\%$. Les phyla les plus abondants chez les femmes du groupe J étaient les *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* et les *Fusobacteria*. L'abondance relative de ces phyla semble être modifiée chez les femmes ménopausées, où l'abondance des *Firmicutes* diminue considérablement (de 83,04 % chez les J à 69,36 % chez les M, $p < 0,01$) et l'abondance des *Actinobacteria* augmente (de 10,04 % chez les J à 18,19 % chez les M). Deux autres phyla contenant principalement des bactéries pathogènes, *Proteobacteria* et *Tenericutes*, voient leurs abondances accrues dans le microbiote des femmes ménopausées (**Figure 7A et annexe 3**) de 0,07% et 0,05% chez J à 4,92% et 1,27% respectivement chez les femmes M.

Cette dynamique est confirmée au niveau des genres où la chute des *Firmicutes* est exprimée par une diminution de l'abondance des Lactobacilles. Nous avons constaté que ce genre était le plus représentatif dans le microbiote vaginal avec une abondance de 82,45% chez les femmes J contre seulement 47,32% chez celles du groupe M (**Figure 7B et annexe 3**). D'autres genres appartenant au phylum des *Actinobacteria* montrent des abondances plus

importantes au stade de ménopause comme *Bifidobacterium*, *Gardnerella* et *Corynebacterium* dont les abondances sont de 0,02%, 3,32% et 0,22% chez le groupe J contre 2,96%, 4,59% et 2,56% respectivement chez les femmes M. De même, l'abondance des *Mycoplasma* et *Ureaplasma* du phylum des *Tenericutes* augmente de manière significative, passant de 0,01 % et 0,04 % chez les femmes J à 1,06 % et 0,27 % respectivement chez les femmes M. *Pseudomonas* appartenant aux *Proteobacteria* n'apparaît que chez les femmes M (1,86%).

L'analyse au niveau de l'espèce révèle un profil plus détaillé des microbiotes individuels (**Figure 8 et annexe 3**). Chez les femmes jeunes, 34 % des espèces recensées sont attribuées au CST I (dominé par *L. crispatus*), 8 % au CST II (dominé par *L. gasseri*), 38 % au CST III (dominé par *L. iners*), 18 % au CST IV (dominé par des espèces anaérobies comme *Atopobium vaginae*, *Prevotella* sp., *Sneathia amnii*, etc.) et seulement 2 % appartiennent au CST V (dominé par *L. jensenii*).

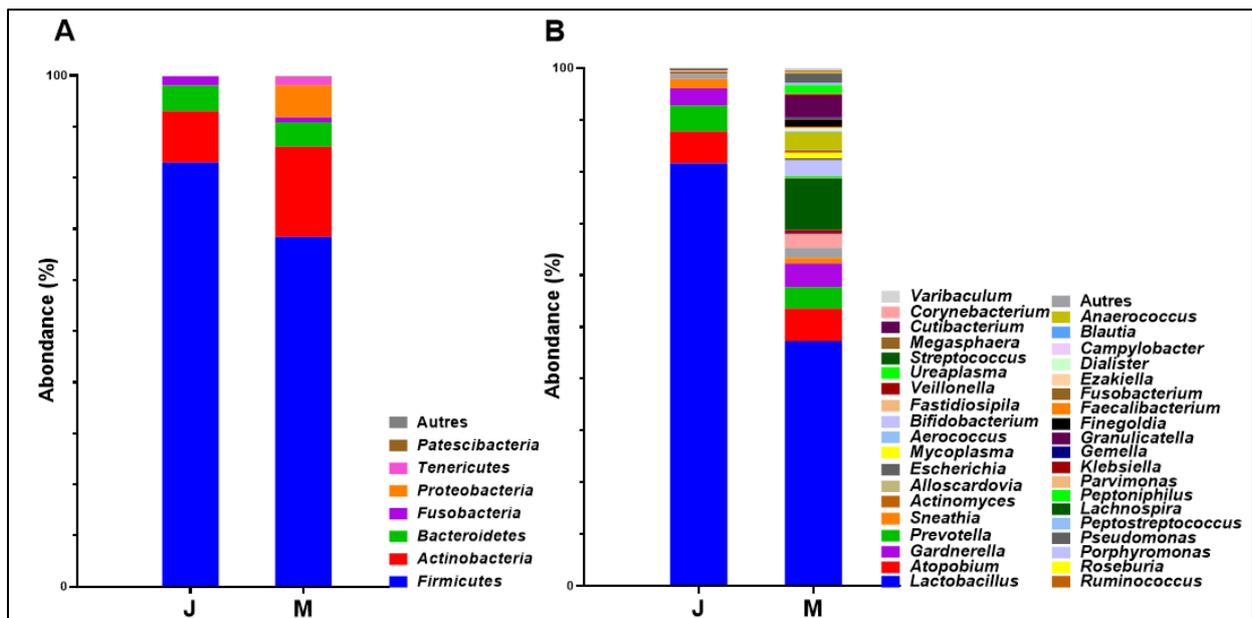


Figure 9. Moyenne des abondances relatives des phyla (A) et des genres (B) bactériens dans le microbiote vaginal. J : femmes jeunes ; M : femmes ménopausées.

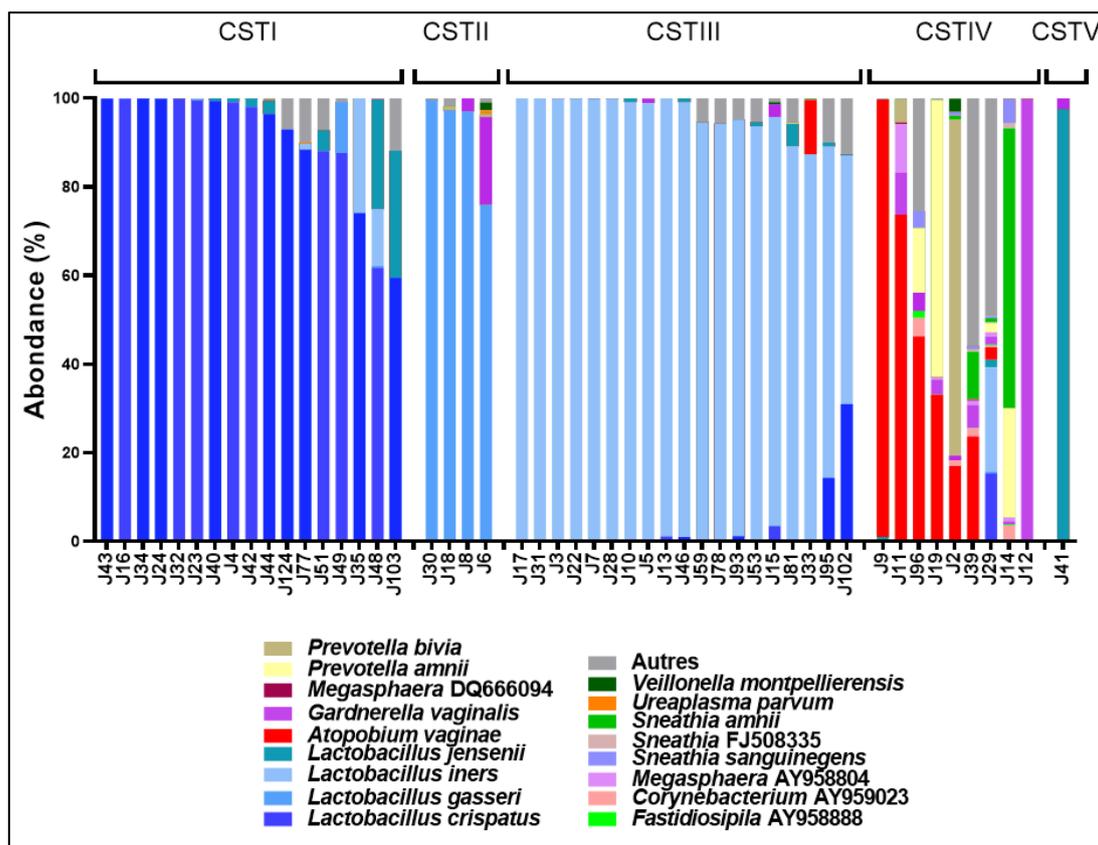


Figure 10. Abondance relative des espèces bactériennes dans le microbiote vaginal des femmes jeunes. Les profils des CST sont indiqués au-dessus des histogrammes.

Pour les femmes M (**Figure 9**), 20 % présentent un profil CST I, 2 % CST II, 24 % CST III et la majorité de 54 % ont le profil CST IV. La stabilité du microbiote vaginal n'est généralement pas exprimée en termes de changements dans la composition des taxons, mais plutôt en termes de régularité des CST (**Gajer et al., 2012**) et il a été suggéré que le microbiote vaginal puisse changer d'un CST à l'autre en réponse aux changements provoqués par le passage à la ménopause. Bien que le suivi longitudinal n'ait pas été possible pour cette étude, il est important de souligner que le changement drastique du profil des CST observé chez les femmes ménopausées, suggère que tous les profils des CST ont changé dans leur représentativité puisque 70 % des CST I, 75 % des CST II et 36 % des CST III semblent être modifiés vers le CST IV à dominance anaérobie dont le taux est passé de 18 % chez les femmes J à 54 % chez les femmes M.

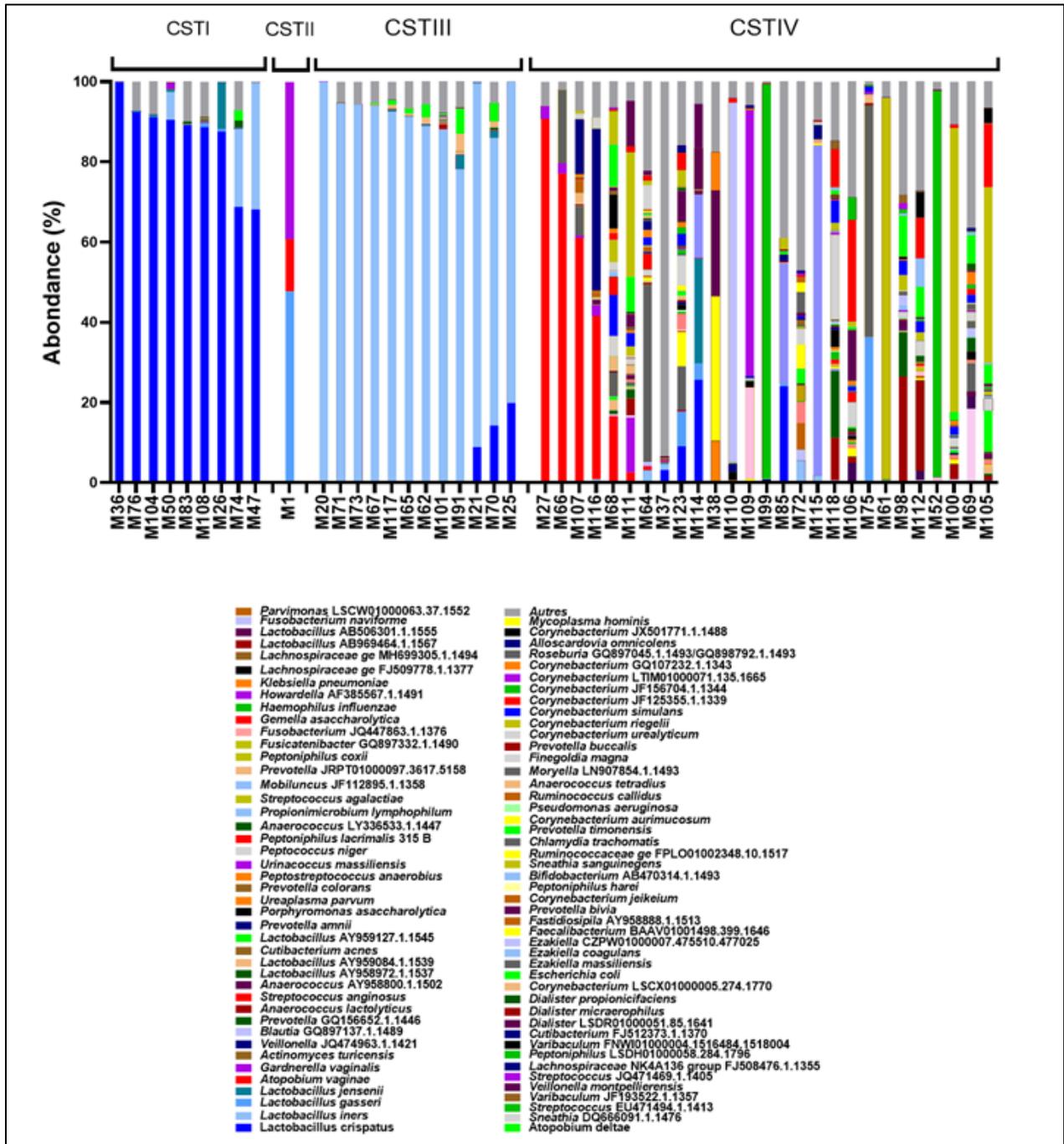


Figure 11. Abondance relative des espèces bactériennes dans le microbiote vaginal des femmes ménopausées. Les profils des CST sont indiqués au-dessus des histogrammes.

Afin d'analyser la signification des variations de l'abondance des taxons bactériens, une analyse de la signification statistique a été réalisée en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey pour les comparaisons par paires avec un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$). Cette analyse de contraste compositionnel a été effectuée à différents niveaux taxonomiques : phylum (Figure 10, Tableau I en annexe 4), genre

(Figure 11, Tableau II en annexe 4) et espèce (Figure 12, Tableau III en annexe 4) en opposant les femmes jeunes aux femmes ménopausées.

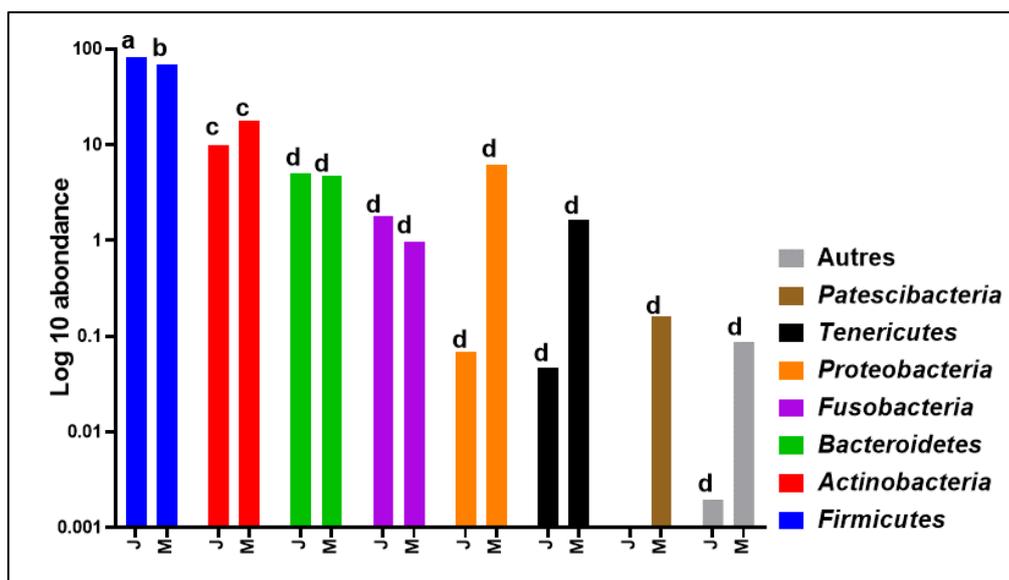


Figure 12. Variations de l'abondance des phyla chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M). Une différence significative dans l'abondance a été observée pour les *Firmicutes* seulement ($p < 0,05$).

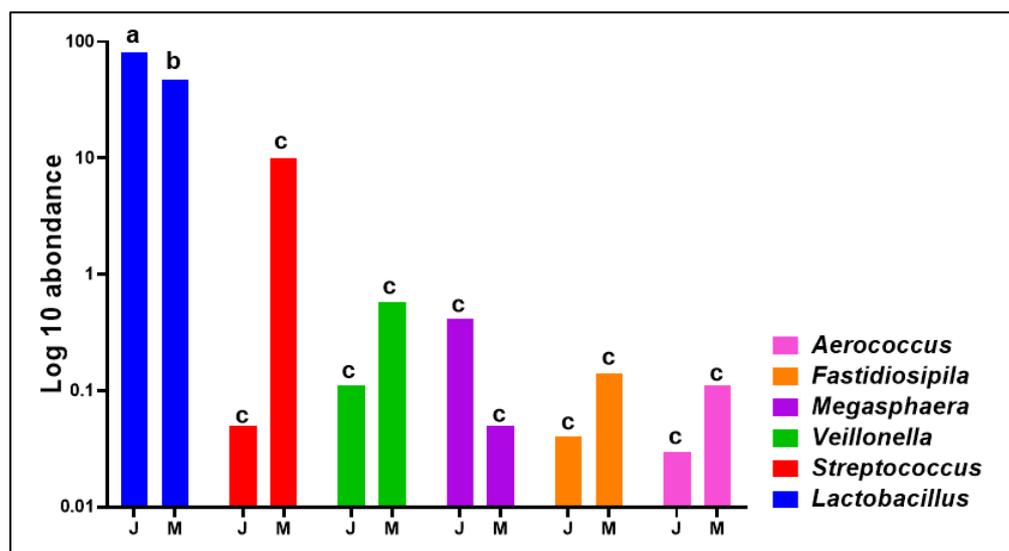


Figure 13. Variations dans l'abondance des genres bactériens chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M).

Comme seules les *Firmicutes* présentaient des variations significatives dans l'abondance entre les femmes J et M, seuls les genres appartenant à ce phylum ont été analysés. Une différence significative dans l'abondance a été observée uniquement pour *Lactobacillus* ($p < 0,05$).

De ce fait les espèces appartenant à ce genre (**Figure 12, Tableau III en annexe 4**) ont été analysées et une différence significative d'abondance a été observée pour *Lactobacillus crispatus* ($p < 0,05$).

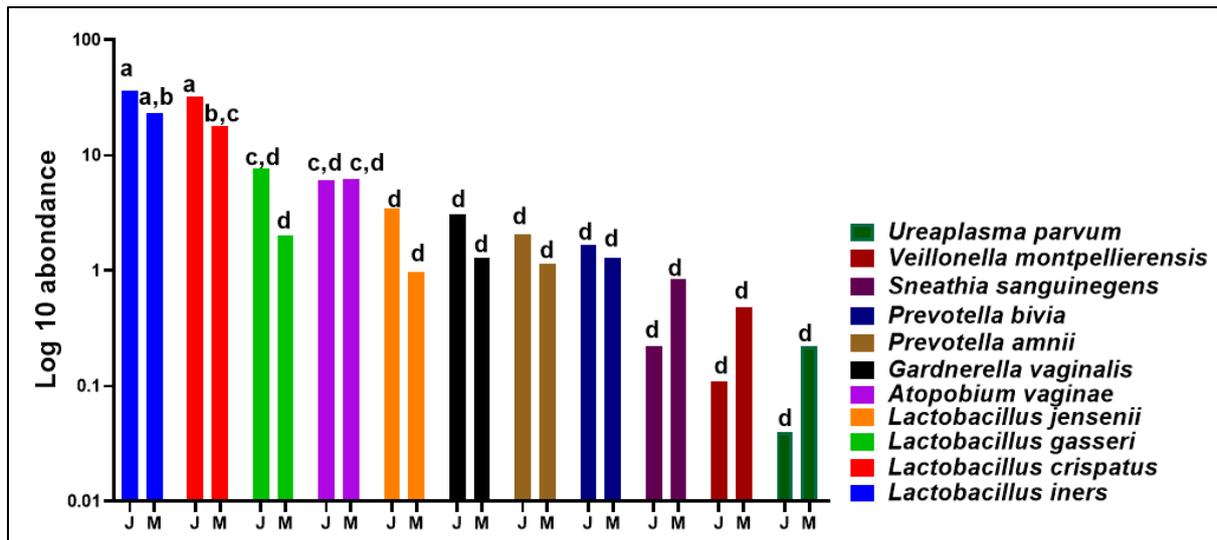


Figure 14. Variations de l'abondance des espèces chez les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M). Les espèces ont été sélectionnées pour une abondance $> 0,1$ %.

Selon les résultats obtenus il semblerait que seul le genre *Lactobacillus* ait un impact dans la dynamique de composition entre l'âge de procréer et la ménopause.

I.3. Composition bactérienne et niveau des œstrogènes

Tous les paramètres physiologiques, et antécédents médicaux recueillis auprès des femmes de la cohorte étudiée ont été examinés afin d'expliquer la dynamique qui se produit en passant de l'âge de procréer à la ménopause. Ainsi, toutes les femmes ménopausées ont été caractérisées par une chute spectaculaire des niveaux d'œstrogènes (29 ± 40 pg/mL) par rapport aux jeunes femmes (126 ± 95 pg/mL) (**Figure 13, Tableau IV en annexe 4**).

Une différence significative a été observée ($p < 0,0001$) entre les niveaux moyens d'œstrogènes des deux groupes analysés. Cette hypo-œstrogénie liée à la ménopause induit à son tour une baisse du taux de glycogène sur l'épithélium vaginal (**Leckie, 2010**). Comme le glycogène est le substrat préféré des lactobacilles, la première conséquence est une diminution très importante du taux de tous les lactobacilles, avec un impact direct sur le maintien de la communauté microbienne spécifique pour chaque CST. Cette situation a déjà été observée chez les femmes ménopausées où une diminution du taux de lactobacilles a déclenché une augmentation du pH vaginal, et seulement 39 % à 55 % des femmes ménopausées détenaient une communauté microbienne vaginale à dominance lactobacillaire (**Mitchell et Waetjen 2018**).

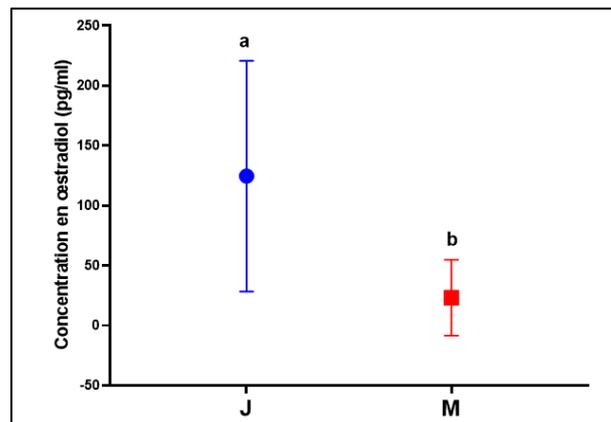


Figure 15. Représentation des moyennes et des écarts types montrant les variations de la concentration en œstradiol chez les femmes jeunes (J) et ménopausées (M).

Le coefficient de corrélation de Pearson a été utilisé pour analyser la corrélation linéaire entre le niveau d'œstradiol de chaque femme et la composition en lactobacilles (**Figure 14, Tableau V en annexe 4**) ou l'indice de masse corporelle (IMC) (**Figure 15, Tableau VI en annexe 4**). En ce qui concerne les variations individuelles du niveau des œstrogènes, aucune corrélation avec la composition du microbiote n'a été observée et cela est en accord avec le prélèvement qui a été réalisé à peu près au même moment du cycle menstruel chez les femmes J, mais aussi avec différentes études signalant que les différentes fluctuations hormonales tout au long du cycle menstruel n'affecte pas le CST établi (**Gajer et al., 2012; Chaban et al., 2014; Bradley et al., 2018**). Bien que nos résultats montrent une différence significative entre le niveau d'œstradiol chez les femmes jeunes et les femmes ménopausées, la distribution par individu est si aléatoire qu'aucune relation ne semble être

établie entre les niveaux d'œstradiol et l'abondance des espèces bactériennes chez les femmes jeunes ou ménopausées. Aucune corrélation n'a été trouvée au niveau individuel entre le niveau d'œstradiol et l'abondance des espèces de lactobacilles ou l'IMC.

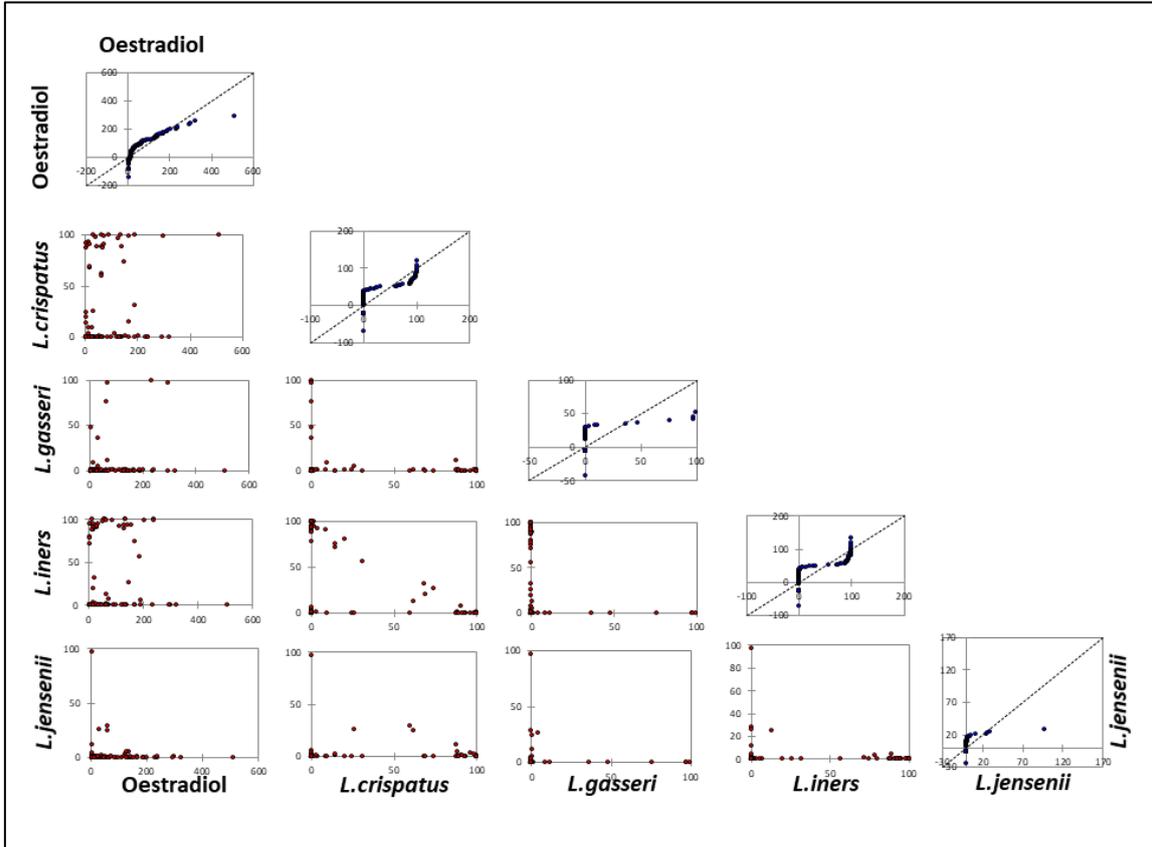


Figure 16. La matrice de corrélation a été utilisée pour le diagramme de dispersion et a montré une forme aléatoire sans ligne directrice entre les niveaux d'œstradiol et l'abondance des lactobacilles. Le nuage de points bleus a montré la corrélation parfaite pour la même variable.

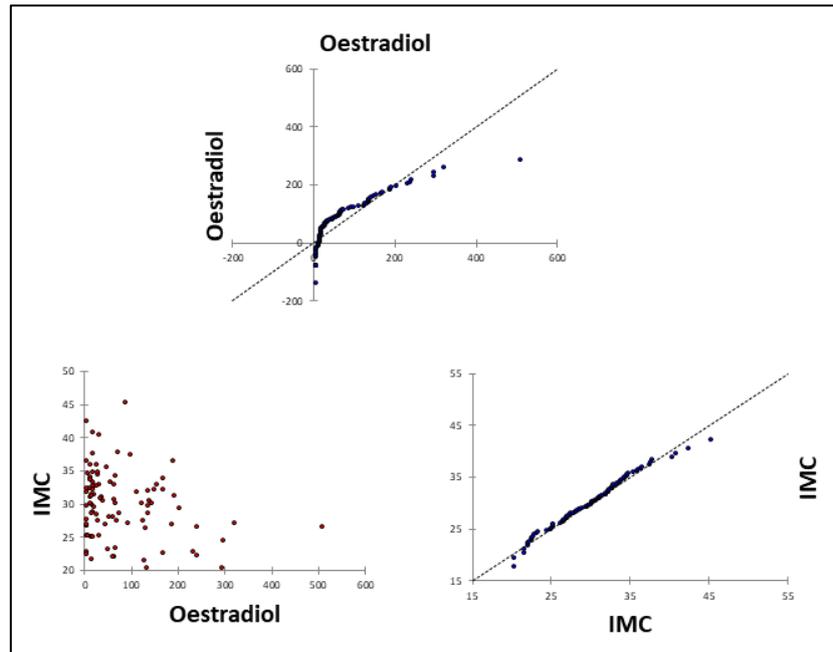


Figure 17. Diagramme de dispersion montrant une forme aléatoire entre les niveaux d'œstradiol et l'IMC. Le nuage de points bleus montre la corrélation parfaite entre la même variable.

I.4. Utilisation de la qPCR pour l'identification des CST

Afin de valider les résultats obtenus par le séquençage Illumina, l'abondance des taxons dominants a été vérifiée par la technique qPCR : *L. crispatus* dominant dans le CST I, *L. gasseri* dominant dans le CST II, *L. iners* dominant dans le CST III, *L. jensenii* dominant dans le CST V et *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* les plus représentatifs pour le CST IV. Les résultats ont confirmé l'abondance du taxon dominant observée dans l'analyse métagénomique (**Figure 16**).

Le taxon dominant a confirmé la même abondance majeure pour 96,3 % des femmes présentant le CST I, 80 % des femmes avec le CST II, 50 % des femmes avec le CST III et 88,5 % des femmes avec le CST IV.

Il semblerait que pour une détection rapide d'un CST particulier, une amplification de l'ADN spécifique de ses principales espèces serait suffisante. Cela pourrait être mis en œuvre comme une méthode rapide d'identification des CST dans un échantillon vaginal en vue d'une investigation clinique, d'un traitement personnalisé ou d'une prescription de probiotiques.

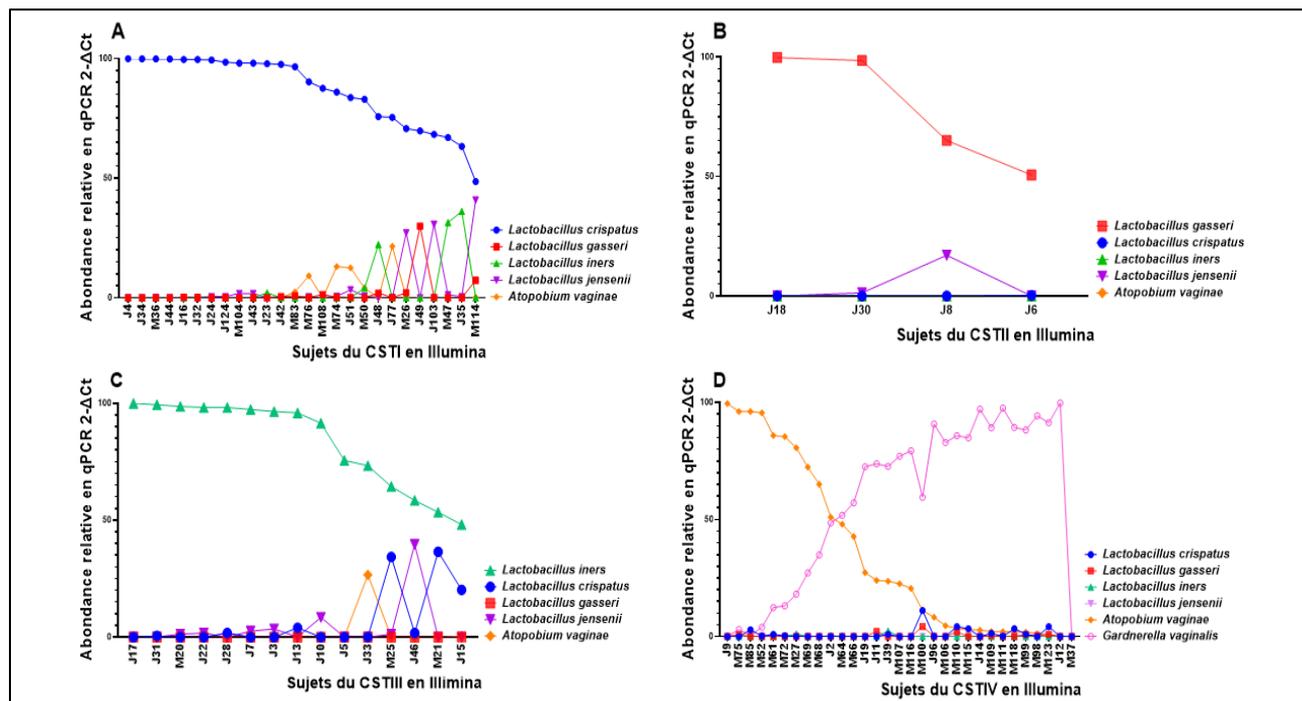


Figure 18. Identification rapide des CST par la méthode qPCR. L'abondance relative de six taxons bactériens dans l'échantillon vaginal des femmes jeunes (J) et des femmes ménopausées (M) a été calculée par le test qPCR pour chaque CST détecté par séquençage Illumina.

I.5. Dynamique des âges et perspectives des probiotiques

En tenant compte de toutes les caractéristiques microbiennes observées, nous pouvons affirmer que le microbiote vaginal des femmes algériennes conserve une dynamique normale en fonction de l'âge. Des diversités alpha et beta plus importantes ont été constatées chez les femmes ménopausées, ainsi que des changements qualitatif et quantitatif dans la composition du phylum *Firmicutes*. Ces changements concernent notamment les lactobacilles dont l'abondance diminue en corrélation avec la chute d'œstrogènes. Tout en restant normal pour l'âge des femmes interrogées, ce changement du microbiote vaginal lié à la ménopause est connu comme une prémisses pour les infections vaginales fréquentes chez les femmes ménopausées. Afin d'estimer les changements à risque de vaginose bactérienne pour les femmes algériennes ménopausées, une comparaison des profils des CST et une comparaison qualitative de la composition du microbiote ont été effectuées entre les femmes J et M interrogées (**Figure 17 et Annexe 5**). Les CST à dominance de lactobacilles (I, II, III et V) diminuent ou disparaissent chez les femmes M et seize espèces semblent complètement disparaître chez ces dernières. Parmi celles-ci, *Actinomyces naeslundii* identifiée comme antagoniste de *Candida albicans* (Mohamad et al., 2019) ou *Carnobacterium*

maltaromaticum qui est une bactérie bénéfique utilisée dans la technologie des produits laitiers pour la production d'acide lactique et de bactériocines (Afzal et al., 2010). D'autre part, le taux du CST IV, dominé par des espèces anaérobies, augmente chez les femmes M et 253 nouvelles espèces ont tendance à occuper le microbiote vaginal de ces femmes (Figure 17B). Parmi celles-ci, de nombreuses espèces de *Prevotella*, *Dialister* ou *Bacteroides* sont connues pour être impliquées dans la VB (Rampersaud et al., 2012; Diop et al., 2019), ou des espèces d'*Actinomyces* qui peuvent conduire à l'actinomycose (Valour et al., 2014). Même si un nouvel équilibre pourrait fonctionner dans le microbiote vaginal des femmes ménopausées, orchestré par des changements hormonaux et de nouvelles relations bactériennes, les risques de vaginose restent considérablement accrus.

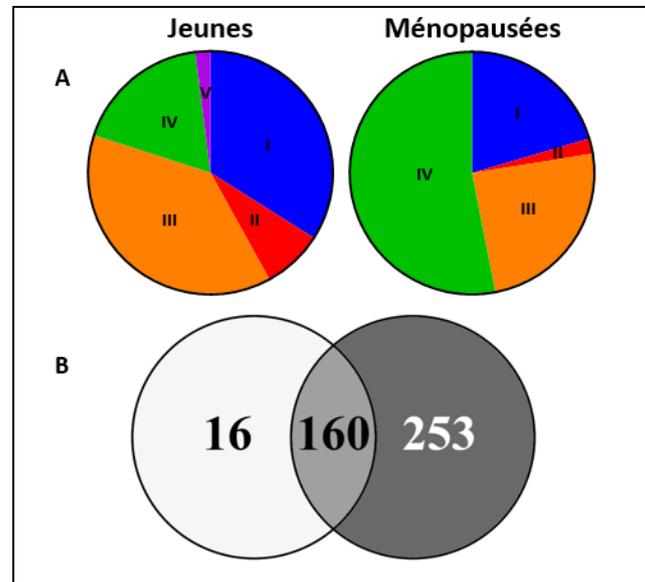


Figure 19. Dynamique du microbiote vaginal en fonction de l'âge. (A) Profils des CST chez les femmes jeunes et ménopausées (I-IV) ; (B) Diagramme de Venn représentant le nombre d'espèces présentes chez les femmes jeunes (cercle blanc) et ménopausées (cercle noir). La superposition des deux cercles indique le nombre d'espèces en commun.

De toute évidence, une association entre les lactobacilles et les taxons bénéfiques spécifiquement présents chez les femmes J, pourrait constituer une option envisageable pour la constitution d'un probiotique destiné aux femmes ménopausées. Différents probiotiques ont déjà été proposés comme ayant des effets positifs sur la composition du microbiote vaginal en favorisant la prolifération de micro-organismes bénéfiques et en prévenant les infections vaginales chez les femmes ménopausées (Kim et Park, 2017). Les probiotiques à base de lactobacilles ont été privilégiés pour traiter et prévenir efficacement la VB sans résistance aux antibiotiques ni effets indésirables, même en cas d'utilisation à long terme (Tachedjian et al.,

2017). Les lactobacilles dégradent les glucides et maintiennent un environnement vaginal acide en générant de l'acide lactique et du CO₂, empêchant ainsi la colonisation du vagin par des micro-organismes nuisibles tels que les entérobactéries (y compris *Escherichia coli*), *Candida* et *Gardnerella vaginalis* ou *Staphylococcus aureus* et prévenant leur croissance (Anukam et al., 2006; Falagas et al., 2007; Mastromarino et al., 2009; Al Kassaa et al., 2014; Ouarabi et al., 2019).

Étant donné que chaque femme possède un microbiote vaginal spécifique avec un CST particulier, il est désormais possible d'utiliser la technique de qPCR pour identifier rapidement le profil spécifique en recherchant l'espèce dominante au sein de l'échantillon vaginal. Cette détection garantit un suivi médical personnalisé impliquant également l'environnement et les habitudes de vie, afin de proposer le taxon bactérien dominant spécifique à l'individu comme probiotique si nécessaire.

Pour les femmes ménopausées dont l'évolution du profil CST rend cette identification difficile, il est possible d'anticiper et de réaliser une empreinte CST précoce pendant la période jeune ou préménopausique. Cette empreinte précoce pourrait également être importante pour les transplantations de sécrétions cervicovaginales. Il s'agit d'une méthode alternative proposée pour la restauration du microbiote vaginal et qui délivre non seulement des souches bactériennes isolées chez une ou plusieurs femmes en bonne santé, mais aussi de l'acide lactique dans les sécrétions cervicovaginales (DeLong et al., 2019). Une transplantation cervico-vaginale personnalisée, respectant le profil CST, pourrait certainement avoir un taux de réussite plus élevé.

I.6. Comparaison ethnique

Bien que notre cohorte soit loin de représenter la complexité de l'ethnie algérienne, nous avons voulu discuter les profils du microbiote obtenus lors de notre étude dans un contexte ethnique en comparant les CST des femmes J avec des études similaires à travers le monde. Une large cohorte de 396 femmes nord-américaines de quatre groupes ethniques différents (caucasien, africain, hispanique et asiatique) a été incluse (Ravel et al., 2011), ainsi qu'une étude nigérienne (Dareng et al., 2016), une étude britannique (MacIntyre et al., 2015), une néerlandaise, une turque et une marocaine (Borgdorff et al., 2017), afin de comparer tous ces profils ethniques (Tableau II et Figure 18).

Tableau II. Composition des CST (%) du microbiote vaginal dans différents groupes ethniques à travers le monde

Ethnies	CST I	CST III	CST IV	CST II+V	Référence
Caucasiennes-américaines	45	27	10	18	Ravel et al., 2011
Britanniques	40	27	11	22	MacIntyre et al., 2015
Néerlandaises	39	28	28	5	Borgdorff et al., 2017
Afro-Américaines	22	31	41	6	Ravel et al., 2011
Hispaniques	15	36	38	11	Ravel et al., 2011
Turques	13	33	12	42	Borgdorff et al., 2017
Marocaines	15	32	19	34	Borgdorff et al., 2017
Nigérianes	7	40	50	3	Dareng et al., 2016
Asiatiques	25	43	20	12	Ravel et al., 2011

Il est intéressant de noter que dans une même localisation géographique, des différences constantes sont enregistrées entre les groupes ethniques. Le CST I semble être dominant dans les groupes caucasiens, le CST IV dans les groupes africains et hispaniques, le CST III dans les cohortes asiatiques, turques et marocaines. Les groupes turcs et marocains se distinguent également par une proportion particulièrement élevée des CST II et V. Le groupe algérien présente le CST III (38 %) et le CST I (34 %) comme des groupes majeurs, suivis du CST IV (18 %) et des CST II et V (10 %). Les raisons de ces différences entre les divers groupes ethniques sont inconnues, mais elles sont probablement déterminées par des différences génétiques, notamment des particularités dans les systèmes immunitaires innés et adaptatifs, la composition et la quantité des sécrétions vaginales, et les ligands à la surface des cellules épithéliales (Ravel et al., 2011). Bien que ces éléments puissent être essentiels pour façonner les communautés vaginales, des études antérieures ont également montré que les habitudes et pratiques individuelles, notamment l'hygiène personnelle, les méthodes de contraception et les comportements sexuels, exercent également de fortes influences (Schwebke, 2009).

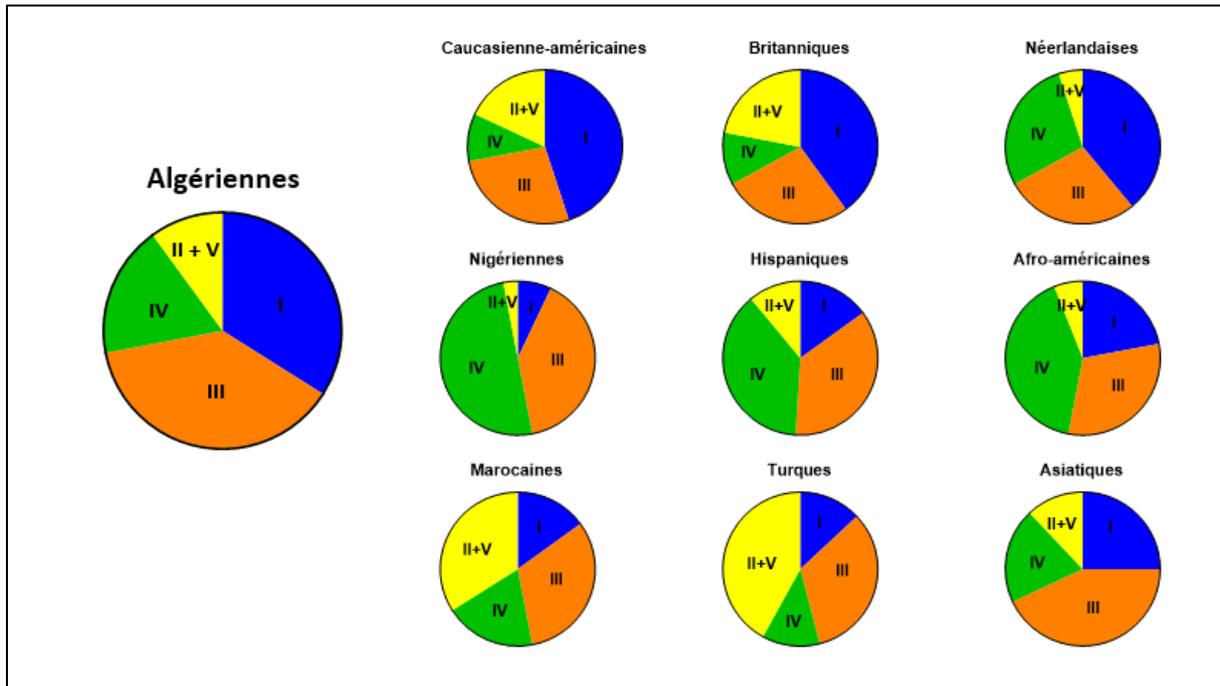


Figure 20. Comparaison des profils des CST sur différents groupes ethniques. Le profil des CST des femmes J Algériennes (à gauche de la figure) est comparé aux profils des CST décrits dans la littérature (à droite de la figure) pour les Caucasiennes-Américaines (Ravel *et al.*, 2011), les Britanniques (MacIntyre *et al.*, 2015), les Néerlandaises (Borgdorff *et al.*, 2017), Nigériennes (Dareng *et al.*, 2016), Hispano-Américaines (Ravel *et al.*, 2011), Afro-Américaines (Ravel *et al.*, 2011), Marocaines (Borgdorff *et al.*, 2017), Turques (Borgdorff *et al.*, 2017) et Asiatiques (Ravel *et al.*, 2011). Pour une meilleure comparaison, les CST II et V ont été regroupés sur un seul secteur.

II. Analyse de la composante fongique du microbiote vaginal

L'analyse métagénomique ciblée des données résultant du séquençage des régions ITS2 et ITS4 a été réalisée sur 50 échantillons vaginaux de femmes en âge de procréer (J) et de 50 femmes ménopausées (M) afin de comparer la richesse fongique globale et la composition du mycobiote vaginal. Pour l'ensemble de la cohorte, seuls 14 échantillons ont donné des résultats en séquençage Illumina. Ainsi, les données analysées pour le mycobiote proviennent de sept femmes en âge de procréer avec une moyenne d'âge de (28,5±3,7 ans) et de sept femmes ménopausées d'âge moyen de (59,5±8,2 ans).

Ce problème est courant au cours des études de métagénomique fongique. Les séquences ribosomiques interstitielles ITS sont un marqueur plus discriminant pour les champignons que l'ADNr 18S. Or, il existe peu de banques spécifiques à ce marqueur et les séquences d'ITS qui s'y trouvent sont souvent incomplètes et/ou mal annotées. Le manque de connaissances sur ce marqueur freine ainsi le développement des applications de métagénomique fongique. En effet, plus une cible est étudiée, plus elle est référencée, plus on favorisera son utilisation. Ce cercle vicieux rend difficile le développement de nouvelles méthodes basées sur d'autres cibles (**Schoch et al., 2012**).

Après traitement des séquences, dix espèces ont été identifiées comme appartenant au mycobiote des femmes jeunes contre onze chez les femmes ménopausées. Toutes les données sur les séquences peuvent être trouvées sur le portail de dépôt « BioProject » du « National Center for Biotechnology Information (NCBI) » (n° d'accès PRJNA630844).

II.1. Diversité fongique

Le nombre moyen d'espèces fongiques identifiées dans cette étude est de 16 (**Annexe 6**). Ces dernières sont regroupées en dix genres distincts, ce qui reste dans l'intervalle de la moyenne de 10 à 20 genres que l'on identifie généralement comme composants fongiques du mycobiote vaginal par des techniques de culture et/ou des techniques moléculaires (**Guo et al., 2012; Zheng et al., 2013**).

Ce nombre varie d'une femme à l'autre et afin de bien estimer la richesse des communautés et la biodiversité, les indicateurs de diversités alpha et bêta ont été calculés et comparés. L'IS a été représenté comme une valeur numérique synthétique de la diversité alpha. Bien qu'il ne soit pas très élevé, une augmentation de cet indice est à noter pour les femmes M ($IS = 0,18 \pm 0,4$) par rapport aux femmes J ($IS = 0,06 \pm 0,1$) ($p > 0,6$) (**Figure 19A**).

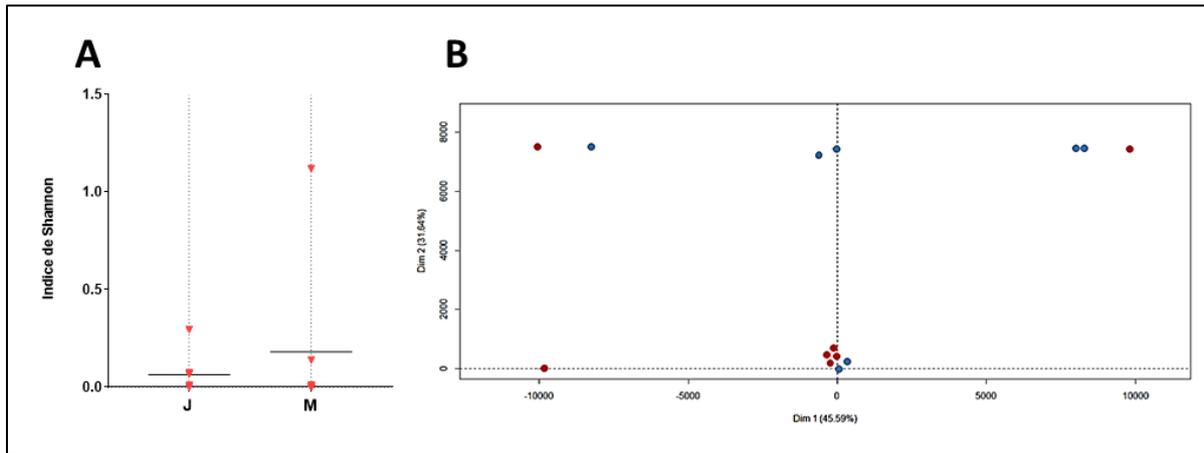


Figure 21. Estimation de la biodiversité des taxons fongiques dans les mycobiotes vaginaux chez les femmes jeunes (J) et ménopausées (M). A : la diversité alpha estimée par l'IS ; B : la diversité beta estimée par l'ACP. Les points bleus correspondent aux femmes J, les points rouges aux femmes M.

L'analyse en composantes principales de la diversité bêta dans la composition du mycobiote vaginal (**Figure 19B**) a également révélé une diversité taxonomique plus importante chez les femmes M (dispersion graphique plus importante).

Même si le nombre de séquences et respectivement de taxons observé dans le mycobiote des femmes interrogées reste considérablement réduit par rapport aux analyses de la composition bactérienne, la même tendance est observée. Les femmes ménopausées présentent une diversité plus importante que ce soit au niveau des séquences d'ADN (diversité alpha) ou au niveau des taxons fongiques (diversité bêta).

II.2. Composition du mycobiote

La composition de la communauté fongique de chaque échantillon a été analysée (**Figure 20**).

Le genre dominant chez toutes les femmes de l'étude est *Candida* (84,70% chez les femmes J et 69,84 % chez les femmes M; $p > 0,3$) suivi du genre *Saccharomyces* (14,28 % chez les femmes J et 28,55 % chez les femmes M; $p > 0,9$) ce qui semble être en accord à d'autres études du même type (**Guo et al., 2012; Drell et al., 2013; Zheng et al., 2013**).

Alors que le genre *Candida* est représenté par plusieurs espèces (**Figure 21**) comme *Candida albicans* (56,44 % chez les femmes J et 30,07 % chez les femmes M; $p > 0,6$), *Candida krusei* (seulement chez les femmes J 14,13 %), *Candida glabrata* (14,11 % chez les femmes J et 2,83 % chez les femmes M; $p > 0,9$) et *Candida dubliensis* (seulement chez les

femmes M avec 8,74 %), le genre *Saccharomyces* est représenté exclusivement par l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* (14,28% chez les femmes J et 28,55% chez les femmes M).

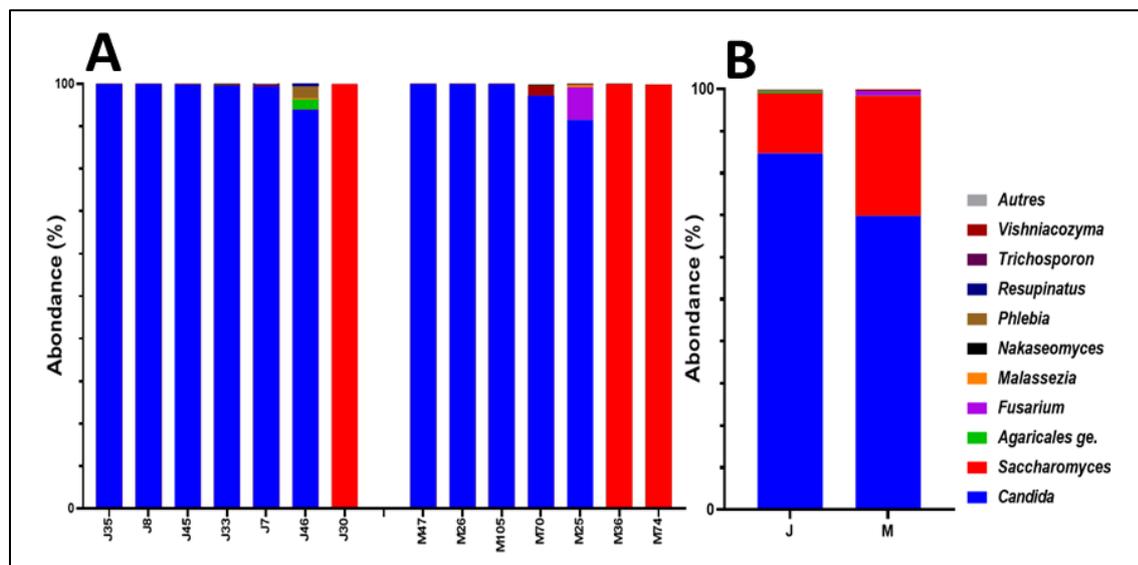


Figure 22. Abondance relative des genres fongiques enregistrée au niveau individuel (A) et en moyenne par groupe (B) dans le mycobiote vaginal des femmes jeunes (J) et ménopausées (M).

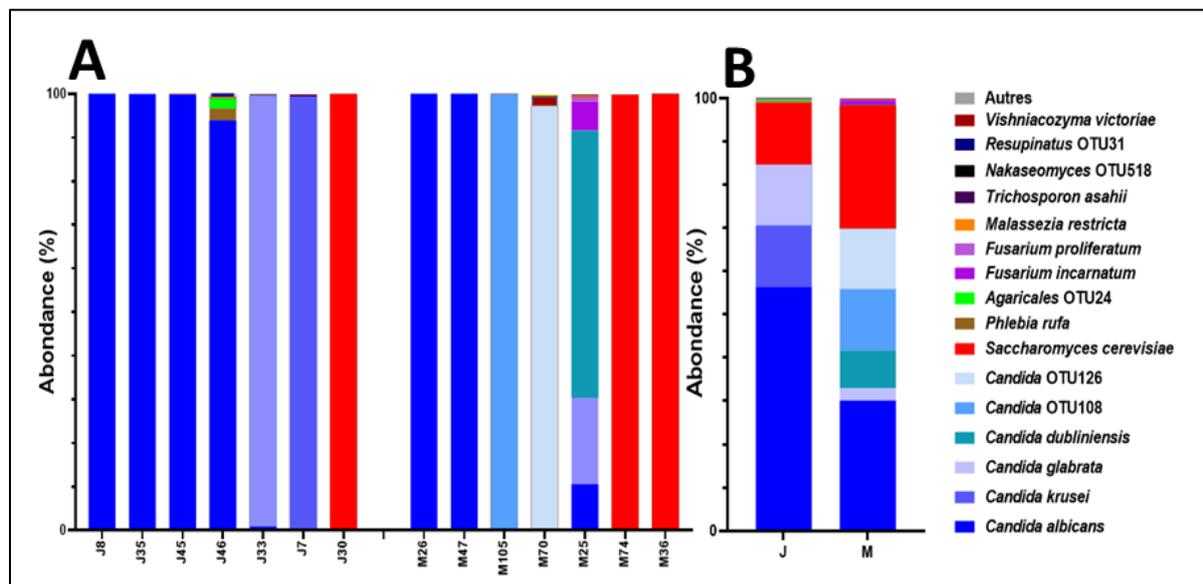


Figure 23. Abondance relative des espèces fongiques enregistrée au niveau individuel (A) et en moyenne par groupe (B) dans le mycobiote vaginal des femmes jeunes (J) et ménopausées (M).

Ces deux principaux genres fongiques sont directement suivis chez les femmes jeunes par les genres *Phlebia*, *Resupinatus*, *Malassezia*, *Trichosporon* et *Nakaseomyces* (0,39%, 0,08%, 0,08%, 0,07% et 0,03% respectivement). Chez les femmes ménopausées, ce sont les genres *Fusarium*, *Vishniacozyma*, *Malassezia* et *Nakaseomyces* (1,09%, 0,34%, 0,08% et 0,02% respectivement) qui suivent après les deux genres fongiques dominants.

L'analyse des données montre très distinctement la dominance d'une unique espèce par individu aussi bien pour les femmes jeunes que les femmes ménopausées. Dans plus de 75% des cas, la dominance est attribuée à une espèce du genre *Candida*. Le plus souvent, il s'agit de l'espèce *Candida albicans*, levure la plus souvent isolée au sein de cette niche écologique. Par ailleurs, quelques individus montrent une dominance à *Saccharomyces cerevisiae*.

Les levures qui présentent un intérêt probiotique sont classées principalement dans le phylum *Ascomycota* (Nayak, 2011). Parmi les levures appartenant au phylum *Ascomycota*, le genre *Saccharomyces* est de loin le plus étudié (Sharpe et al., 2014). Les levures de ce genre ont un grand intérêt biotechnologique dû à leurs nombreuses applications notamment dans la production de vitamines, la synthèse de protéines recombinantes et en tant que probiotiques (Hatoum et al., 2012). Il n'en reste pas moins que les espèces opportunistes du genre *Candida* peuvent être associées à des cas de vaginites. Si plus de 50 % des femmes de plus de 25 ans ont eu un épisode de candidose (Hu et al., 2015), la vaginite symptomatique due à *Saccharomyces cerevisiae* reste extrêmement rare et l'incidence des infections vaginales causée par cette levure a été estimée à moins de 1% (Papaemmanouil et al., 2011). Cependant, les femmes interrogées lors de cette étude étant toutes saines, il est évident que *Candida albicans* et *Saccharomyces cerevisiae* sont présentes dans un état de symbiose à côté de la composante bactérienne.

En plus de ces deux genres dominants, les espèces du genre *Fusarium* sont retrouvées en troisième position mais avec des abondances très faibles. Tout comme décrits dans la littérature, il n'est pas commun de retrouver ce genre au sein du mycobiote vaginal. Les macroconidies des espèces de *Fusarium* ont été décrites comme un résultat inhabituel dans les frottis cervicaux (Gupta et al., 2003).

II.3. Dynamique de la composition du mycobiote vaginal

Le passage de l'âge de reproduction à la ménopause semble être marqué par des modifications qualitatives (disparition/apparition) dans la composition des espèces fongiques (**Figure 21**). Seules cinq espèces sont communes chez les femmes J et M : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Malassezia restricta*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Nakaseomyces OTU518* (**Tableau III et Figure 22**).

Tableau III. Dynamique de l'âge pour les espèces fongiques dans le mycobiote vaginal des femmes algériennes.

Espèces spécifiques aux femmes jeunes	Espèces spécifiques aux femmes ménopausées	Espèces communes aux femmes jeunes et ménopausées
<i>Agaricales OTU24</i>	<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Phlebia rufa</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	<i>Malassezia restricta</i>
<i>Resupinatus OTU31</i>	<i>Candida OTU108</i>	<i>Nakaseomyces OTU518</i>
<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Candida OTU126</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	<i>Vishniacozyma victoria</i>	

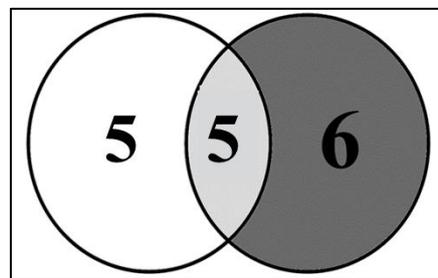


Figure 24. Diagramme de Venn représentant le nombre d'espèces fongiques présentes chez les femmes jeunes (cercle blanc) et les femmes ménopausées (cercle noir). La superposition des deux cercles indique le nombre d'espèces en commun.

Les femmes ménopausées présentent des taux d'œstrogènes et de glycogène plus faibles dans la muqueuse vaginale, ainsi qu'un épithélium vaginal plus mince et un pH vaginal plus élevé. Toutefois, 20 à 50 % des femmes ménopausées conservent des espèces de Lactobacilles au sein de leur microbiote mais la physiologie naturelle du vieillissement imite certains des changements observés dans le vas d'une VB (**Mark et al., 2020**). Ces modifications rejoignent la dynamique bactérienne discutée dans la section 3.1.5. et peuvent être incriminées dans le risque de mycoses vaginales plus accentué chez les femmes ménopausées.

II.4. Composition du mycobiote et paramètres physiologiques

Tous les paramètres physiologiques, médicaux ou historiques recueillis auprès des femmes de l'étude ont été examinés afin d'expliquer les changements qui apparaissent au sein du mycobiote vaginal. L'impact de la variation des niveaux d'œstrogènes et de l'IMC sur la composition des mycobiotés vaginaux a été abordé en effectuant des tests de corrélation avec l'indicateur de diversité alpha (IS).

Nos résultats ont montré une différence significative entre le niveau d'œstradiol chez les femmes jeunes et les femmes ménopausées. Cependant, la distribution par individu est si aléatoire qu'aucune relation ne semble être établie entre les niveaux d'œstradiol et l'abondance des espèces fongiques chez les jeunes femmes et les femmes ménopausées. La même tendance est perceptible pour l'IMC. Ceci est confirmé statistiquement par une absence de corrélation entre la composition du microbiote et les niveaux d'œstrogènes ou l'IMC (**Annexes 7 et 8**).

Sur la **figure 23** sont représentés les résultats obtenus à la fois de l'analyse du mycobiote et des CST correspondants selon l'espèce bactérienne dominante. Cette figure vient confirmer l'absence de corrélation entre la composante fongique et la composante bactérienne au niveau du vagin. En effet, la répartition des CST et la dominance de l'espèce fongique ne sont pas du tout corrélées. Par exemple nous voyons clairement que chez les femmes J8 et J35 la dominance fongique est attribuée à *Candida albicans* mais leurs CST sont différents (CST II et CST I respectivement). Idem pour les femmes J33 et J7 qui sont attribuées au profil CST II mais ont des dominances fongiques différentes (*Candida glabrata* et *Candida krusei* respectivement).

A partir de ces résultats, nous pouvons envisager qu'il n'y ait pas de lien direct entre le mycobiote et le microbiote de la niche vaginale. Cependant, il est indéniable que le mycobiote vaginal tout comme son voisin microbiote est sujet à une dynamique liée à l'âge. Par ailleurs cette dynamique est associée à un changement drastique dans les taux d'œstrogènes et bien qu'aucune corrélation n'ait été décelée entre ces paramètres la piste d'une interaction indirecte n'est pas à écarter.

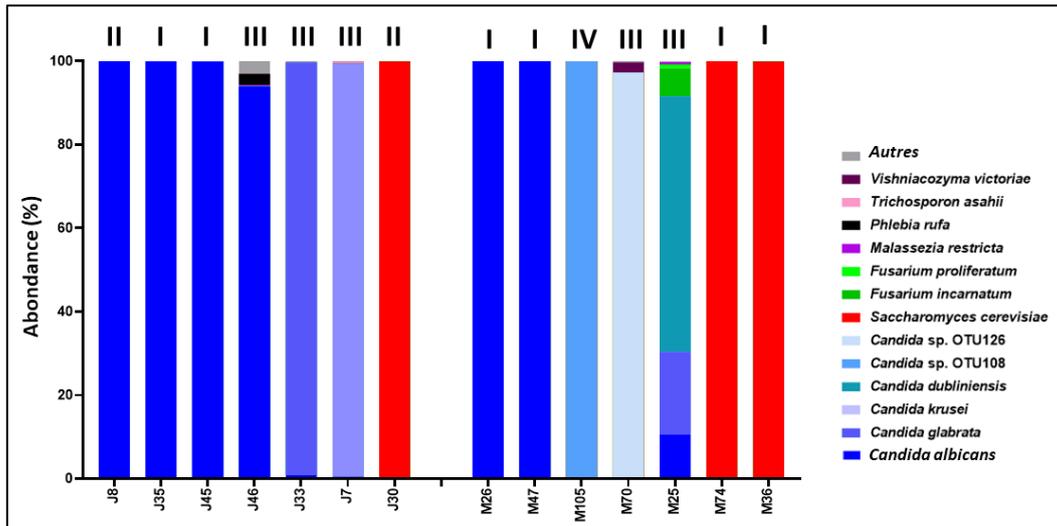


Figure 25. Abondance relative des espèces fongiques par individus : femmes jeunes (J); femmes ménopausées (M). Les CST correspondants sont indiqués sur chaque histogramme.

Conclusion

Conclusion générale

Le microbiote vaginal fait partie d'un écosystème riche et dynamique qui évolue du stade de l'enfance à la ménopause. Il est influencé par un large exposome, comprenant des facteurs liés à la génétique et à la physiologie individuelle. Sa composition a été élucidée grâce à l'utilisation de la métagénomique ciblée, en classant les individus en fonction de l'espèce dominante. Il en résulte cinq types de communautés distinctes observées dans tous les groupes ethniques. Même si la composition de ces CST présente des fluctuations au cours de la vie d'une femme, il s'avère qu'un état stable est mis en place tout au long de la vie reproductive et même à la ménopause. La mise en place du CST stable devient un objectif médical clé pour une meilleure compréhension et régulation de l'homéostasie, à laquelle le microbiote vaginal doit retourner en cas de perturbation. La médecine devant désormais être plus prédictive, personnalisée et préventive, la compréhension de l'exposome d'un individu devient une priorité pour éviter ou traiter les maladies liées au vagin. Des probiotiques vaginaux ont déjà été développés pour favoriser l'homéostasie, mais des probiotiques personnalisés pourraient également être produits en fonction des cinq CST identifiés, en tenant compte des espèces "permanentes" et "passagères" composant chaque communauté. Le glycoène, l'acide lactique et des prébiotiques pourraient être associés à l'avenir pour un traitement personnalisé de la dysbiose vaginale ou de la gêne ménopausique. Les variations ethniques ainsi que les dynamiques physiologique et comportementale observées en fonction de l'âge semblent être les principaux facteurs influençant sa composition.

Lors de cette étude, nous avons examiné pour la première fois une cohorte Algérienne de 50 femmes jeunes en âge de procréer et 50 femmes ménopausées en effectuant une analyse métagénomique ciblée sur le gène de l'ARNr 16S dans le microbiote vaginal. Les CST ont été identifiés et leurs profils ont révélé des particularités ethniques avec une dominance des groupes de CST III et CST I, et cette découverte devrait être prise en compte pour différents diagnostics, analyses, investigations cliniques ou traitements sur le territoire.

Le microbiote vaginal des femmes algériennes respecte une dynamique d'âge normale chez les femmes ménopausées. Une évolution des CST vers le type IV avec des anaérobies dominants a été observée et sa proportion a été estimée à 3 fois plus importante que chez les femmes jeunes. Les changements hormonaux ont été corrélés de manière significative avec la faible abondance des lactobacilles. Ces changements prédisposent les femmes ménopausées à la vaginose bactérienne, c'est pourquoi un système de suivi de l'évolution du profil des CST

par une méthode de qPCR rapide a été développé et proposé. Cette étude ouvre une nouvelle voie pour une gestion gynécologique plus précise et soutient le guidage personnalisé par probiotiques.

En plus de l'étude de la composition bactérienne du microbiote vaginal, cette étude a permis l'analyse de la composition fongique du mycobiote vaginal. Nous avons examiné pour la première fois une cohorte algérienne de 7 femmes jeunes en âge de procréer et 7 femmes ménopausées en effectuant une analyse métagénomique ciblée sur les régions ITS2 et ITS4 de l'ADNr 5,8S. Il a été constaté que le mycobiote vaginal des femmes Algériennes est toujours dominé par un taxon fongique (*Candida* ou *Saccharomyces*) et des changements qualitatifs ont lieu au niveau des espèces secondaires au passage vers la ménopause. Ces changements sont toujours dans le sens d'un enrichissement de la diversité, comme pour les communautés bactériennes. Tenant compte de la cohorte réduite, les conclusions sur la dynamique du mycobiote vaginal ne restent que hypothétiques.

A l'issue de ce travail et des résultats obtenus, les perspectives suivantes nous semblent intéressantes à envisager :

- Élargir la cohorte avec un nouvel échantillonnage à analyser par métabarcoding afin d'améliorer notre compréhension du microbiote vaginal des femmes Algériennes en incluant plusieurs régions du pays pour être plus représentatif de la diversité de l'ethnie méditerranéenne.
- Exploiter les changements qui occurrent dans la composition microbienne au stade de la ménopause par des analyses ciblées (production de l'acide lactique, bactériocines, etc.) dans la voie de proposition d'une ou de plusieurs souches probiotiques afin de pallier aux désagréments de la ménopause.
- Mise en place d'un autre outil de diagnostic rapide, efficace et facile à utiliser pour les bactérioses vaginales. Un outil de type microarray ADN dédié à l'étude du microbiote vaginal (construction sur la plateforme e-array Agilent) pourrait être fabriqué avec des séquences identifiées dans notre étude et des séquences des bactéries pathogènes. Cet outil permettrait le diagnostic précis chez les femmes Algériennes.
- Mise en place d'une analyse du mycobiote avec de nouvelles techniques d'extraction d'ADN pour augmenter la performance du séquençage et l'analyse efficace de la communauté fongique.

Références bibliographiques

Abruzzo, A., Giordani, B., Parolin, C., Vitali, B., Protti, M., Mercolini, L., Cappelletti, M., Fedi, S., Bigucci, F., Cerchiara, T., Luppi, B., 2018. Novel mixed vesicles containing lactobacilli biosurfactant for vaginal delivery of an anti-*Candida* agent. *European Journal of Pharmaceutical Sciences: Official Journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 112, 95-101.

Achkar, J. M., Fries, B. C., 2010. *Candida* infections of the genitourinary tract. *Clinical Microbiology Reviews* 23(2), 253-273.

Acinas, S. G., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., 2004. Fine-scale phylogenetic architecture of a complex bacterial community. *Nature* 430, 551–554.

Afzal, M. I., Jacquet, T., Delaunay, S., Borges, F., Millière, J.-B., Revol-Junelles, A.-M., Cailliez-Grimal, C., 2010. *Carnobacterium maltaromaticum*: Identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiology* 27(5), 573-579.

Al Kassaa, I., Hamze, M., Hober, D., Chihib, N.-E., Drider, D., 2014. Identification of vaginal lactobacilli with potential probiotic properties isolated from women in North Lebanon. *Microbial Ecology* 67(3), 722-734.

Albert, A. Y. K., Chaban, B., Wagner, E. C., Schellenberg, J. J., Links, M. G., van Schalkwyk, J., Reid, G., Hemmingsen, S. M., Hill, J. E., Money, D., VOGUE Research Group, 2015. A study of the vaginal microbiome in healthy Canadian women utilizing cpn60-Based molecular profiling reveals distinct *Gardnerella* subgroup community state types. *PloS One* 10(8), 1-21.

Alioua, S., Abdi, A., Fhoula, I., Bringel, F., Boudabous, A., Ouzari, I. H., 2016. Diversity of vaginal lactic acid bacterial microbiota in 15 Algerian pregnant women with and without bacterial vaginosis by using culture independent method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10(9), 23-27.

Allen, H., Bayles, D., Looft T., Trachsel, B., Bass, B., Alt, D., Bearson, S., Nicholson, T., Casey, T., 2016. Pipeline for amplifying and analyzing amplicons of the V1–V3 region of the 16S rRNA gene. *BMC Research Notes* 9, 380.

Alpay Karaoğlu, Ş., Aydin, F., Kiliç, S. S., Kilic, A., 2003. Antimicrobial activity and characteristics of bacteriocins produced by vaginal lactobacilli. *Turkish Journal of Medical Sciences* 33, 7-13.

Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., Kuipers, O. P., 2016. Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100(7), 2939-2951.

Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., Stahl, D. A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56(6), 1919-1925.

Amin, M., Goodarzi, H., Orang, Z., Farsi, S., Jorfi, M., 2011. Isolation and identification of *Lactobacillus* species from the vagina and their antimicrobial properties. *African Journal of Microbiology Research* 5(20), 3300-3304.

Amrane, S., Lagier, J-C., 2018. Metagenomic and clinical microbiology. *Human Microbiome Journal* 9, 1-6.

Anahtar, M. N., Byrne, E. H., Doherty, K. E., Bowman, B. A., Yamamoto, H. S., Soumillon, M., Padavattan, N., Ismail, N., Moodley, A., Sabatini, M. E., Ghebremichael, M. S., Nusbaum, C., Huttenhower, C., Virgin, H. W., Ndung'u, T., Dong, K. L., Walker, B. D., Fichorova, R. N., Kwon, D. S., 2015. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity* 42(5), 965-976.

Anahtar, M. N., Gootenberg, D. B., Mitchell, C. M., Kwon, D. S., 2018. Cervicovaginal microbiota and reproductive health : The virtue of simplicity. *Cell Host & Microbe* 23(2), 159-168.

Anukam, K. C., Osazuwa, E., Osemene, G. I., Ehigiagbe, F., Bruce, A. W., Reid, G., 2006. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes and Infection* 8(12-13), 2772-2776.

Babu, G., Singaravelu, B. G., Srikumar, R., Reddy, S. V., Kokan, A., 2017. Comparative study on the vaginal flora and incidence of asymptomatic vaginosis among healthy women and in women with infertility problems of reproductive age. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 11(8), 18-22.

Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A., 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55, 541-555.

Banerjee, J., Mishra, N., Dhas, Y., 2015. Metagenomics : A new horizon in cancer research. *Meta Gene* 5, 84-89.

Barrons, R., Tassone, D., 2008. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women : A review. *Clinical Therapeutics* 30(3), 453-468.

Bayigga, L., Kateete, D. P., Anderson, D. J., Sekikubo, M., & Nakanjako, D., 2019. Diversity of vaginal microbiota in sub-Saharan Africa and its effects on HIV transmission and prevention. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 220(2), 155-166.

- Bilal, T., Malik, Hakeem, K., 2018. Metagenomic analysis of uncultured microorganisms and their enzymatic attributes. *Journal of Microbiological Methods* 155, 65-69.
- Bilen, M., Dufour, J.-C., Lagier, J.-C., Cadoret, F., Daoud, Z., Dubourg, G., Raoult, D., 2018. The contribution of culturomics to the repertoire of isolated human bacterial and archaeal species. *Microbiome* 6(1), 94.
- Bohbot, J.-M., 2007. *Vaginose bacterienne* (p. 141-147) [Communication présentée aux 31 émes journées nationales du CNGOF].
- Borgdorff, H., van der Veer, C., van Houdt, R., Alberts, C. J., de Vries, H. J., Bruisten, S. M., Snijder, M. B., Prins, M., Geerlings, S. E., Schim van der Loeff, M. F., Van de Wijgert, J. H. H. M., 2017. The association between ethnicity and vaginal microbiota composition in Amsterdam, the Netherlands. *PloS One* 12(7), 12-14.
- Borges, S., Barbosa, J., Teixeira, P., 2016. Chapter 56—Gynecological Health and Probiotics. In R. R. Watson & V. R. Preedy (Éds.). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics* 56, 741-752.
- Boris, S., Barbés, C., 2000. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection* 2(5), 543-546.
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R., Cone, R. A., 1999. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infection and Immunity* 67(10), 5170-5175.
- Bouridane, H., Sifour, M., Idoui, T., Annick, L., Thonard, P., 2016. Technological and probiotic traits of the lactobacilli isolated from vaginal tract of the healthy women for probiotic use. *Iranian Journal of Biotechnology* 14(3), 192-201.
- Bradley, F., Birse, K., Hasselrot, K., Noël-Romas, L., Introini, A., Wefer, H., Seifert, M., Engstrand, L., Tjernlund, A., Broliden, K., Burgener, A. D., 2018. The vaginal microbiome amplifies sex hormone-associated cyclic changes in cervicovaginal inflammation and epithelial barrier disruption. *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 80(1), 12863.
- Burgener, A., McGowan, I., Klatt, N. R., 2015. HIV and mucosal barrier interactions : Consequences for transmission and pathogenesis. *Current Opinion in Immunology* 36, 22-30.
- Burton, J. P., Reid, G., 2002. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *The Journal of Infectious Diseases* 186(12), 1770-1780.
- Chaban, B., Links, M. G., Jayaprakash, T. P., Wagner, E. C., Bourque, D. K., Lohn, Z., Albert, A. Y., van Schalkwyk, J., Reid, G., Hemmingsen, S. M., Hill, J. E., Money, D. M.,

2014. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome* 2(1), 23.

Champomier-Verges, M-C., Zagorec, M., 2015. La métagénomique : développements et futures applications. Editions Quae, P 120.

Chang, F., Liu, G.L., Liu, C.J., Li, M.M., 2015. Chapter 18 - Somatic Diseases (Cancer): Amplification-Based Next-Generation Sequencing. *J. Clinical Genomics*. Academic Press, Boston, 297–319.

Chase, D., Goulder, A., Zenhausem, F., Monk, B., Herbst-Kralovetz, M., 2015. The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: A review of applications in etiology, symptoms and treatment. *Gynecologic Oncology* 138(1), 190-200.

Chatzivasileiou, P., Vyzantiadis, T.-A., 2019. Vaginal yeast colonisation: From a potential harmless condition to clinical implications and management approaches-A literature review. *Mycoses* 62(8), 638-650.

Cheng, M., & Ning, K., 2019. Stereotypes about enterotypes: The old and new ideas. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 17(1), 4-12.

Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., Dicks, L. M., 2018. Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 23-28.

Chu, D. M., Seferovic, M., Pace, R. M., Aagaard, K. M., 2018. The microbiome in preterm birth. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology* 52, 103-113.

Cruciani, F., Biagi, E., Severgnini, M., Consolandi, C., Calanni, F., Donders, G., Brigidi, P., Vitali, B., 2015. Development of a microarray-based tool to characterize vaginal bacterial fluctuations and application to a novel antibiotic treatment for bacterial vaginosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(5), 2825-2834.

Dahiya, R. S., Speck, M. L., 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dairy Science* 51(10), 1568-1572.

Dareng, E. O., Ma, B., Famooto, A. O., Adebamowo, S. N., Offiong, R. A., Olaniyan, O., Dakum, P. S., Wheeler, C. M., Fadrosh, D., Yang, H., Gajer, P., Brotman, R. M., Ravel, J., Adebamowo, C. A., 2016. Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiology and Infection* 144(1), 123-137.

Dasari, S., Anandan, S. K., Rajendra, W., Valluru, L., 2016. Role of microbial flora in female genital tract: A comprehensive review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 6(11), 909-917.

- Datcu, R., Gesink, D., Mulvad, G., Montgomery-Andersen, R., Rink, E., Koch, A., Ahrens, P., Jensen, J. S., 2013. Vaginal microbiome in women from Greenland assessed by microscopy and quantitative PCR. *BMC Infectious Diseases* 13(1), 480.
- De Backer, E., Verhelst, R., Verstraelen, H., Alqumber, M. A., Burton, J. P., Tagg, J. R., Temmerman, M., Vaneechoutte, M., 2007. Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiology* 7(1), 115.
- DeLong, K., Bensouda, S., Zulfiqar, F., Zierden, H. C., Hoang, T. M., Abraham, A. G., Coleman, J. S., Cone, R. A., Gravitt, P. E., Hendrix, C. W., Fuchs, E. J., Gaydos, C. A., Weld, E. D., Ensign, L. M., 2019. Conceptual design of a universal donor screening approach for vaginal microbiota transplant. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 9, 1-16.
- DiGiulio, D. B., 2012. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 17(1), 2-11.
- Dimitonova, S. P., Bakalov, B. V., Aleksandrova-Georgieva, R. N., Danova, S. T., 2008. Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 41(6), 469-477.
- Dione, N., Rathored, J., Tomei, E., Lagier, J.-C., Khelaifia, S., Robert, C., Bretelle, F., Raoult, D., Fournier, P.-E., Fenollar, F., 2017. *Dakarella massiliensis* gen. nov., sp. nov., strain ND3T : A new bacterial genus isolated from the female genital tract. *New Microbes and New Infections* 18, 38-46.
- Diop, K., Dufour, J.-C., Levasseur, A., Fenollar, F., 2019. Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Human Microbiome Journal* 11, 1-7.
- Douglas, L. J., 2003. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology* 11(1), 30-36.
- Douillard, F. P., De Vos, W. M., 2014. Functional genomics of lactic acid bacteria : From food to health. *Microbial Cell Factories* 13(1), 8.
- Dorado, G., Gálvez, S., Budak, H., 2019. Nucleic-Acid Sequencing. Encyclopedia of Biomedical Engineering. Elsevier, Oxford, 443-460.
- Dover, S. E., Aroutcheva, A. A., Faro, S., Chikindas, M. L., 2008. Natural antimicrobials and their role in vaginal health: a short review. *International Journal of Probiotics & Prebiotics* 3(4), 219-230.
- Doyle, R., Gondwe, A., Fan, Y.-M., Maleta, K., Ashorn, P., Klein, N., Harris, K., 2018. A *Lactobacillus*-deficient vaginal microbiota dominates postpartum women in rural malawi. *Applied and Environmental Microbiology* 84(6), 1-34.

Drider, D., Bendali, F., Naghmouchi, K., Chikindas, M. L., 2016. Bacteriocins : Not Only Antibacterial Agents. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 8(4), 177-182.

Drider, D., Rebuffat, S., 2011. *Prokaryotic Antimicrobial Peptides : From Genes to Applications*. Springer-Verlag.

Ekström, L., Adolfsson, A., Ericson, H., Poutakidis, G., Charonis, G., Larsson, P.-G., 2013. Vaginal flora and urinary and vaginal group B streptococci in early pregnancy. *Gynecology* 1(1), 6.

El Aila, N. A., Tency, I., Saerens, B., De Backer, E., Cools, P., dos Santos Santiago, G. L., Verstraelen, H., Verhelst, R., Temmerman, M., Vaneechoutte, M., 2011. Strong correspondence in bacterial loads between the vagina and rectum of pregnant women. *Research in Microbiology* 162(5), 506-513.

Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S., 2007. Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 13(7), 657-664.

Farage, M. A., Miller, K. W., Sobel, J. D., 2010. Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences. *Infectious Diseases: Research and Treatment* 3,1-15.

Faust, K., Lahti, L., Gonze, D., de Vos, W. M., Raes, J., 2015. Metagenomics meets time series analysis : Unraveling microbial community dynamics. *Current Opinion in Microbiology* 25, 56-66.

Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Serrano, M. G., Sheth, N. U., Girerd, P. H., Edwards, D. J., Strauss, J. F., The Vaginal Microbiome Consortium, null, Jefferson, K. K., Buck, G. A., 2014. Differences in vaginal microbiome in African American women versus women of European ancestry. *Microbiology (Reading, England)* 160(10), 2272-2282.

Fox, C., Eichelberger, K., 2015. Maternal microbiome and pregnancy outcomes. *Fertility and Sterility* 104(6), 1358-1363.

Franasiak, J. M., Scott, R. T., 2015. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility* 104(6), 1364-1371.

Fredricks, D. N., 2011. Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota. *Anaerobe* 17(4), 191-195.

Fredricks, D. N., Fiedler, T. L., Thomas, K. K., Mitchell, C. M., Marrazzo, J. M., 2009. Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 47(3), 721-726.

Froeschke, G., Von Der Heyden, S., 2014. Chapter Four - A Review of Molecular Approaches for Investigating Patterns of Coevolution in Marine Host–Parasite Relationships. Academic Press, 209-252.

Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., Koenig, S. S. K., Fu, L., Ma, Z. (Sam), Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L. J., Ravel, J., 2012. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science Translational Medicine* 4(132), 1-14.

García-Velasco, J. A., Menabrito, M., Catalán, I. B., 2017. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome : A review. *Reproductive Biomedicine Online* 35(1), 103-112.

Gautam, R., Borgdorff, H., Jespers, V., Francis, S. C., Verhelst, R., Mwaura, M., Delany-Moretlwe, S., Ndayisaba, G., Kyongo, J. K., Hardy, L., Menten, J., Crucitti, T., Tsiivtsivadze, E., Schuren, F., Van de Wijgert, J. H., 2015. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women. *BMC Infectious Diseases* 15(1), 86.

Godha, K., Tucker, K. M., Biehl, C., Archer, D. F., Mirkin, S., 2018. Human vaginal pH and microbiota : An update. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 34(6), 451-455.

Gomes, A., Korf, B., 2018. Chapter 5 - Genetic Testing Techniques. Pediatric Cancer Genetics. Elsevier, 47–64.

Ghurye, J. S., Cepeda-Espinoza, V., Pop, M., 2016. Metagenomic assembly: overview, challenges and applications. *Yale Journal of Biological Medicine* 89, 353–362

Godzik, A., 2011. Metagenomics and the protein universe. *Current Opinion in Structural Biology* 21, 398–403.

Greenbaum, S., Greenbaum, G., Moran-Gilad, J., Weintraub, A. Y., 2019. Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease. *Borgdorff* 220(4), 324-335.

Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A. 2014. Chapter 28 - Sequence Analysis of Industrially Important Genes from Trichoderma. Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier, Amsterdam, 377–392.

Gupta, S., Sodhani, P., Jain, S., 2003. Macroconidia of *Fusarium* species. An unusual finding in cervical smears. *Acta Cytologica* 47(1), 41-44.

Gupta, A.K., Gupta, U.D., 2014. Chapter 19 - Next Generation Sequencing and Its Applications. Animal Biotechnology. Academic Press, San Diego, 345–367.

Gupta, V.K., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A. 2014. Chapter 28 - Sequence Analysis of Industrially Important Genes from Trichoderma. Biotechnology and Biology of Trichoderma. Elsevier, Amsterdam, 377–392.

- Gustafsson, R. J., Ahrné, S., Jeppsson, B., Benoni, C., Olsson, C., Stjernquist, M., Ohlsson, B., 2011. The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Women's Health* 11, 17.
- Hagemann, I.S., 2015. Chapter 1 - Overview of Technical Aspects and Chemistries of Next-Generation Sequencing. *Clinical Genomics*. Academic Press, Boston, 3–19.
- Haldar, S., Kapil, A., Sood, S., Sengupta, S., 2016. Female reproductive tract microbiome in gynecological health and problems. *Journal of Reproductive Health and Medicine* 2(2), 48-54.
- Hall, R. A., Noverr, M. C., 2017. Fungal interactions with the human host : Exploring the spectrum of symbiosis. *Current Opinion in Microbiology* 40, 58-64.
- Handelsman, J., Rondon, M. R., Brady, S. F., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chemistry & Biology* 5, 245–249.
- Hao, D.C., Gu, X.J., Xiao, P.G., 2015. Chapter 9 - Chemical and biological research of Clematis medicinal resources. *Medicinal Plants*. Woodhead Publishing, 341–371.
- Hatoum, R., Labrie, S., Fliss, I., 2012. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts : From fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology* 3, 1-12.
- Hernández-Rodríguez, C., Romero-González, R., Albani-Campanario, M., Figueroa-Damián, R., Meraz-Cruz, N., Hernández-Guerrero, C., 2011. Vaginal microbiota of healthy pregnant Mexican women is constituted by four *Lactobacillus* species and several vaginosis-associated bacteria. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 9, 1-10.
- Hickey, R. J., Zhou, X., Pierson, J. D., Ravel, J., Forney, L. J., 2012. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 160(4), 267-282.
- Hickey, R. J., Zhou, X., Settles, M. L., Erb, J., Malone, K., Hansmann, M. A., Shew, M. L., Van Der Pol, B., Fortenberry, J. D., Forney, L. J., 2015. Vaginal microbiota of adolescent girls prior to the onset of menarche resemble those of reproductive-age women. *MBio* 6(2), 1-14.
- Hu, Z. Q., Zhou, W., Yue, X. A., Mu, L. Y., Jiang, Y. M., 2015. Dynamical evaluation of vaginal micro-ecosystem in a Chinese woman with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Genetics and Molecular Research: GMR* 14(1), 2626-2630.
- Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K., Buck, G. A., 2014. The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine* 34(4), 747-761.

Hughes, R., 2016. Chapter 10—Artifacts for the Enterprise Requirements Value Chain. In R. Hughes (Éd.), *Agile Data Warehousing for the Enterprise*. 181-213. Morgan Kaufmann.

Husain, S. M., Wilks, M., Mupita, M., Reddy, S. P., Hennessy, E. M., Macfarlane, A. J., Millar, M. R., 2014. Diversity and stability of cultured vaginal lactobacilli in pregnant women from a multi-ethnic urban UK population. *Journal of Applied Microbiology* 117(1), 258-265.

Hyman, R. W., Fukushima, M., Jiang, H., Fung, E., Rand, L., Johnson, B., Vo, K. C., Caughey, A. B., Hilton, J. F., Davis, R. W., Giudice, L. C., 2014. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)* 21(1), 32-40.

Ilhan, Z. E., Łaniewski, P., Thomas, N., Roe, D. J., Chase, D. M., Herbst-Kralovetz, M. M., 2019. Deciphering the complex interplay between microbiota, HPV, inflammation and cancer through cervicovaginal metabolic profiling. *EBio Medicine* 44, 675-690.

Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014. The Integrative Human Microbiome Project : Dynamic analysis of microbiome-host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host & Microbe* 16(3), 276-289.

Jeanmonod, R., Jeanmonod, D., 2020. Vaginal Candidiasis (Vulvovaginal Candidiasis). *StatPearls* 10, 1-12.

Jaspers, V., Kyongo, J., Joseph, S., Hardy, L., Cools, P., Crucitti, T., Mwaura, M., Ndayisaba, G., Delany-Moretlwe, S., Buyze, J., Vanham, G., Wijnert, J. H. H. M., Van de., 2017. A longitudinal analysis of the vaginal microbiota and vaginal immune mediators in women from sub-Saharan Africa. *Scientific Reports* 7(1), 1-13.

Jin, L., Tao, L., Pavlova, S. I., So, J.-S., Kiwanuka, N., Namukwaya, Z., Saberbein, B. A., Wawer, M., 2007. Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. *Journal of Applied Microbiology* 102(4), 1107-1115.

Kim, J.-M., Park, Y. J., 2017. Probiotics in the prevention and treatment of postmenopausal vaginal infections : Review article. *Journal of Menopausal Medicine* 23(3), 139-145.

Kroon, S. J., Ravel, J., Huston, W. M., 2018. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertility and Sterility* 110(3), 327-336.

Kyrgiou, M., Mitra, A., & Moscicki, A.-B., 2017. Does the vaginal microbiota play a role in the development of cervical cancer?. *Translational research. The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 179, 168-182.

Larrègue, M., Vabres, P., Guillet, G., 2008. Vulvo-vaginites dans l'enfance. Service de Dermatologie, CHU de la Milèterie, BP 577, 86021 Poitiers Cedex.

- Leckie, K. J., 2010. What is the evidence for the role of oestrogen in the prevention of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women? An evidence-based review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics* 1(2), 31-35.
- Lee, J. E., Lee, S., Lee, H., Song, Y.-M., Lee, K., Han, M. J., Sung, J., Ko, G., 2013. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a Korean twin cohort. *PloS One* 8(5), 1-9.
- Lepargneur, J. P., Rousseau, V., 2002. Protective role of the Doderleïn flora. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 31(5), 485-494.
- Limon, J. J., Skalski, J. H., Underhill, D. M., 2017. Commensal fungi in health and disease. *Cell Host & Microbes* 22(2), 156-165.
- Linhares, I. M., Giraldo, P. C., Baracat, E. C., 2010. New findings about vaginal bacterial flora. *Revista Da Associacao Medica Brasileira* 56(3), 370-374.
- Liu, Y., Hao, W., 2015. Comparative analysis of vaginal bacterial diversity in Northern-Chinese women associated with or without bacterial vaginosis. *Journal of Medical Microbiology & Diagnosis* 5, 1-9.
- MacIntyre, D. A., Chandiramani, M., Lee, Y. S., Kindinger, L., Smith, A., Angelopoulos, N., Lehne, B., Arulkumaran, S., Brown, R., Teoh, T. G., Holmes, E., Nicholson, J. K., Marchesi, J. R., Bennett, P. R., 2015. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Scientific Reports* 5(1), 1-9.
- Macklaim, J. M., Gloor, G. B., Anukam, K. C., Cribby, S., Reid, G., 2011. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(1), 4688-4695.
- Madhivanan, P., Alleyn, H. N., Raphael, E., Krupp, K., Ravi, K., Nebhrajani, R., Arun, A., Reingold, A. L., Riley, L. W., Klausner, J. D., 2015. Identification of culturable vaginal *Lactobacillus* species among reproductive age women in Mysore, India. *Journal of Medical Microbiology* 64(6), 636-641.
- Mark, K. S., Tenorio, B., Stennett, C. A., Ghanem, K. G., Brotman, R. M., 2020. Bacterial vaginosis diagnosis and treatment in postmenopausal women: A survey of clinician practices. *Menopause* 27(6), 679-683.
- Martin, D. H., 2012. The Microbiota of the Vagina and Its Influence on Women's Health and Disease. *The American Journal of the Medical Sciences* 343(1), 2-9.
- Mastromarino, P., Macchia, S., Meggiorini, L., Trinchieri, V., Mosca, L., Perluigi, M., & Midulla, C., 2009. Effectiveness of *Lactobacillus*-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection: The*

Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15(1), 67-74.

Mastromarino, Paola, Vitali, B., Mosca, L., 2013. Bacterial vaginosis : A review on clinical trials with probiotics. *The New Microbiologica 36(3)*, 229-238.

Melgaço, A. C. C., Blohem Pessoa, W. F., Freire, H. P., Evangelista de Almeida, M., Santos Barbosa, M., Passos Rezende, R., Timenetsky, J., Miranda Marques, L., Romano, C. C., 2018. Potential of maintaining a healthy vaginal environment by two *Lactobacillus* strains isolated from Cocoa fermentation. *BioMed Research International*, 1-15.

Miller, R. R., Montoya, V., Gardy, J. L., 2013. Metagenomics for pathogen detection in public health. *Genome Medicine 5(81)*, 1-14.

Milligan, S. R., 2009. 72—Reproductive and Estrogenic Effects of 8-Prenylnaringenin in Hops. In V. R. Preedy (Éd.), *Beer in Health and Disease Prevention 711-723*. Academic Press.

Mirmonsef, P., Hotton, A. L., Gilbert, D., Burgad, D., Landay, A., Weber, K. M., Cohen, M., Ravel, J., & Spear, G. T., 2014. Free Glycogen in Vaginal Fluids Is Associated with *Lactobacillus* Colonization and Low Vaginal pH. *Plos One 9(7)*, 1-11.

Mitchell, C. M., Waetjen, L. E., 2018. Genitourinary Changes with Aging. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America 45(4)*, 737-750.

Mitreva, M., 2017. Chapter 8 - The Microbiome in Infectious Diseases. *Infectious Diseases (Fourth Edition)*. Elsevier, 68-74.

Mohamad, N. A. H., Arzmi, M. H., Othman, N., 2019. Genome Comparison of *Actinomyces naeslundii* with known Probiotics. *IIUM Medical Journal Malaysia 18(2)*, 1-21.

Moreno, I., Franasiak, J. M., 2017. Endometrial microbiota-new player in town. *Fertility and Sterility 108(1)*, 32-39.

Moreno, I., Garcia-Grau, I., Simón, C., 2018. Microbiota and Pathogen Screening in the Female Reproductive Tract. In M. K. Skinner (Éd.), *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*. 36-44. Academic Press.

Moreno, I., Simon, C., 2018. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertility and Sterility 110(3)*, 337-343.

Muhleisen, A. L., Herbst-Kralovetz, M. M., 2016. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas 91*, 42-50.

Nader-Macías, M. E. F., Juárez Tomás, M. S., 2015. Profiles and technological requirements of urogenital probiotics. *Advanced Drug Delivery Reviews 92*, 84-104.

- Nayak, S. K., 2011. Biology of Eukaryotic Probiotics. In M.-T. Liang (Éd.), *Probiotics : Biology, Genetics and Health Aspects*. 29-55. Springer.
- Nayfach, S., Pollard, K. S., 2016. Toward accurate and quantitative comparative metagenomics. *Cell* 166, 1103–1116.
- Nelson, D. B., Rockwell, L. C., Prioleau, M. D., Goetzl, L., 2016. The role of the bacterial microbiota on reproductive and pregnancy health. *Anaerobe* 42, 67-73.
- Ngara, T. R., Zhang, H., 2018. Recent advances in function-based metagenomic screening. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 16, 405–415.
- Ocaña, V. S., Pesce De Ruiz Holgado, A. A., Nader-Macías, M. E., 1999. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12), 5631-5635.
- Ouarabi, L., Chait, Y. A., Seddik, H. A., Drider, D., Bendali, F., 2019. Newly Isolated Lactobacilli strains from Algerian Human Vaginal Microbiota : *Lactobacillus fermentum* Strains Relevant Probiotic's Candidates. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 11(1), 43-54.
- Papaemmanouil, V., Georgogiannis, N., Plega, M., Lalaki, J., Lydakis, D., Dimitriou, M., Papadimitriou, A., 2011. Prevalence and susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* causing vaginitis in Greek women. *Anaerobe* 17(6), 298-299.
- Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., Nitert, M. D., 2017. Review : Maternal health and the placental microbiome. *Placenta* 54, 30-37.
- Peterson, G., Allen, C. R., Holling, C. S., 1998. Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* 1(1), 6-18.
- Petricevic, L., Domig, K. J., Nierscher, F. J., Krondorfer, I., Janitschek, C., Kneifel, W., Kiss, H., 2012. Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 160(1), 93-99.
- Pruski, P., Lewis, H. V., Lee, Y. S., Marchesi, J. R., Bennett, P. R., Takats, Z., MacIntyre, D. A., 2018. Assessment of microbiota:host interactions at the vaginal mucosa interface. *Methods* 149, 74-84.
- Quentin, R., 2006. *Écologie bactérienne vaginale : Nature, exploration et prise en charge des déséquilibres* (Extrait des Mises à jour en Gynécologie et obstétrique XXX).
- Qin, J., Li, R., Raes, J., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Rampersaud, R., Randis, T. M., Ratner, A. J., 2012. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 17(1), 51-57.

- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., Forney, L. J., 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(1), 4680-4687.
- Reid, G., Bruce, A. W., 2001. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *The Journal of Infectious Diseases* 183(1), 77-80.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., 2010. Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature* 466, 334-338.
- Rhoads, A., Au, K.F., 2015. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 13, 278-289.
- Saraswathy, N., Ramalingam, P., 2011. Chapter 5 - DNA sequencing methods. Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics. Woodhead Publishing, 57-76.
- Satpute, S. K., Kulkarni, G. R., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Mone, N. S., Patil, R. H., Cameotra, S. S., 2016. Biosurfactant/s from Lactobacilli species : Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology* 56(11), 1140-1158.
- Schlaberg, R., Chiu, C. Y., Miller, S., 2017. Validation of metagenomic next-generation sequencing tests for universal pathogen detection. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine* 141, 776-786.
- Schnoes, A. M., Brown, S. D., Dodevski, I., Babbitt, P. C., 2009. Annotation error in public databases: misannotation of molecular function in enzyme superfamilies. *PLoS Computational Biology* 5(12), 1-14.
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Consortium, F. B., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(16), 6241-6246.
- Schwebke, J. R., 2009. New concepts in the etiology of bacterial vaginosis. *Current Infectious Disease Reports* 11(2), 143-147.
- Shafquat, A., Joice, R., Simmons, S. L., Huttenhower, C., 2014. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in Microbiology* 22(5), 261-266.
- Sharpe, B., Hulin, M., Thorne-Wallis, J., Wheals, A., 2014. Synteny analysis provides a route to design genus-specific PCR primers for rapid identification of all *Saccharomyces* species. *FEMS Yeast Research* 14(3), 517-525.

Simner, P.J., Khare, R., Wengenack, N.L., 2015. Chapter 95 - Rapidly Growing Mycobacteria. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Boston, 1679–1690.

Singh, S., Sobel, J. D., Bhargava, P., Boikov, D., Vazquez, J. A., 2002. Vaginitis due to *Candida krusei* : Epidemiology, clinical aspects, and therapy. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 35(9), 1066-1070.

Solomon, D.A., 2018. Chapter 5 - Integrating Molecular Diagnostics With Surgical Neuropathology. *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach* (Second Edition). Elsevier, 71–89.

Solt, I., Cohavy, O., 2012. The Great Obstetrical Syndromes and the Human Microbiome—A New Frontier. *Rambam Maimonides Medical Journal* 3(2), 1-7.

Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., Cone, R. A., 2017. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology* 168(9), 782-792.

Takayasu, L., Suda, W., Hattori, M., 2019. Mapping the Environmental Microbiome. *Encyclopedia of Bioinformatics and Computational Biology*. Academic Press, Oxford, 17–28.

Taneja, V., 2017. Chapter 39 - Microbiome: Impact of Gender on Function & Characteristics of Gut Microbiome. In M. J. Legato (Éd.), *Principles of Gender-Specific Medicine (Third Edition)*. 569-583. Academic Press.

Temperton, B., Giovannoni, S. J., 2012. Metagenomics: microbial diversity through a scratched lens. *Current Opinion in Microbiology* 15, 605–612.

Tringe, S. G., Hugenholtz, P., 2008. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Current Opinion in Microbiology* 11, 442–446.

Turnbaugh, P. J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B. L., Duncan, A., Ley, R. E., Sogin, M. L., Jones, W. J., Roe, B. A., Affourtit, J. P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A. C., Knight, R., Gordon, J. I., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457(7228), 480-484.

Tur-Torres, M. H., Alijotas-Reig, J., 2018. Maternal microbiota and the major obstetric syndromes : When the enemy becomes an ally. *Medicina Clinica* 150(4), 141-143.

Uprety, P., Mitchell, S. L., Krock, B. L., Graf, E. H., 2018. The current state of metagenomics in infectious disease. *Advances in Molecular Pathology* 1, 81–89.

Valour, F., Sénéchal, A., Dupieux, C., Karsenty, J., Lustig, S., Breton, P., Gleizal, A., Boussel, L., Laurent, F., Braun, E., Chidiac, C., Ader, F., Ferry, T., 2014. Actinomycosis : Etiology, clinical features, diagnosis, treatment, and management. *Infection and Drug Resistance* 7, 183-197.

- Van de Wijgert, J. H., Jaspers, V., 2016. Incorporating microbiota data into epidemiologic models: Examples from vaginal microbiota research. *Annals of Epidemiology* 26(5), 360-365.
- Vanechoutte, M., 2017. *Lactobacillus iners*, the unusual suspect. *Research in Microbiology* 168(9-10), 826-836.
- Ventolini G, S. C., 2015. Probiotic Vaginal Lactobacilli : Are They Protecting Against Fungal Infections?. *Journal of Bacteriology and Mycology* 2(1).
- Vineis, P., Robinson, O., Chadeau-Hyam, M., Dehghan, A., Mudway, I., Dagnino, S. 2020. What is new in the exposome?. *Environment International* 143, 425-437.
- Virtanen, S., Kalliala, I., Nieminen, P., Salonen, A. 2017. Comparative analysis of vaginal microbiota sampling using 16S rRNA gene analysis. *PloS One* 12(7), 1-17.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., Louis, P., Flint, H. J., 2014. Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends in Microbiology* 22, 267–274.
- Walker, B. H., 1992. Biodiversity and Ecological Redundancy. *Conservation Biology* 6(1), 18-23.
- Wang, X., Jordan, I.K., Mayer, L.W., 2015. Chapter 29 - A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. *Molecular Medical Microbiology* (Second Edition). Academic Press, Boston, 517–536.
- White, B.A., 1993. PCR Protocols: Current Methods and Applications. Humana Press.
- Wylie, K. M., Wylie, T. N., Cahill, A. G., Macones, G. A., Tuuli, M. G., Stout, M. J., 2018. The vaginal eukaryotic DNA virome and preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 219(2), 1-12.
- Yeruva, T., Rajkumar, H., Donugama, V., 2017. Vaginal lactobacilli profile in pregnant women with normal & abnormal vaginal flora. *The Indian Journal of Medical Research* 146(4), 534-540.
- Yoshimura, K., Morotomi, N., Fukuda, K., Nakano, M., Kashimura, M., Hachisuga, T., Taniguchi, H., 2011. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 205(3), 1-9.
- Younes, J. A., Lievens, E., Hummelen, R., van der Westen, R., Reid, G., Petrova, M. I., 2018. Women and Their Microbes : The Unexpected Friendship. *Trends in Microbiology* 26(1), 16-32.
- Zárate, S., Taboada, B., Yocupicio-Monroy, M., Arias, C. F., 2017. Human Virome. *Archives of Medical Research* 48(8), 701-716.

Zhao, F., Bapat, B., 2016. Chapter 8 - The Role of Methylation-Specific PCR and Associated Techniques in Clinical Diagnostics. *Epigenetic Biomarkers and Diagnostics*. Academic Press, Boston, 155–173.

Zhou, X., Brown, C. J., Abdo, Z., Davis, C. C., Hansmann, M. A., Joyce, P., Foster, J. A., Forney, L. J., 2007. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *The ISME Journal* 1(2), 121-133.

Zhou, X., Hansmann, M. A., Davis, C. C., Suzuki, H., Brown, C. J., Schütte, U., Pierson, J. D., Forney, L. J., 2010. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 58(2), 169-181.

Annexes

Annexe 1 : Répertoire des espèces décrites comme appartenant au microbiote vaginal sain. Un total de 301 taxons bactériens non redondants a été enregistré dans le microbiome vaginal sain par des analyses moléculaires et métagénomiques ainsi que par des techniques de culture.

Reference	Origine	Taxons bactériens
(Ravel et al. 2011)	Amérique du Nord	<i>L. vaginalis, L. jensenii, L. gasseri, L. crispatus, L. iners, Cryptobacterium, Gemella, Gardenerella, Aerococcus, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, Anaeroglobus, Sneathia, Megasphaera anaerotruncus, Eggerthella, Atopobium, Parvimonas, Porphyromonas, Peptoniphilus, Mobiluncus, Dialister, Prevotella</i>
(Gautam et al. 2015)	Afrique: Rwanda, Kenya, Tanzanie, Afrique du Sud	<i>L. crispatus, L. iners, L. jensenii, L. salivarius, L. gasseri, L. johnsonii, L. vaginalis, L. brevis, L. hammessi, L. parabrevis, L. fermentum, Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae, Prevotella ruminicola, Prevotella timonensis, Prevotella bergensis, Prevotella buccalis, Prevotella bivia, Prevotella disiens, Prevotella amnii, Mobiluncus mulieris, Dialister propioniafaciens, Dialister micraerophilus, Sneathia, Leptotrichia amnionii, Megasphaera uncultured bacterium, Parvimonas micra, Prophyromonas uenonisi, Prophyromonas assaccharolutica, Bacteroides fragilis, Mycoplasma spp., Veillonella spp., Ureaplasma spp., Haemophilus aegyptiusi, Haemophilus influenza</i>

(Doyle et al. 2018)	Malawi	<p><i>Gardnerella vaginalis, Peptostreptococcus anaerobius</i></p> <p><i>Leptotrichia amnionii, Gemella asaccharolytica, Sneathia anguinegens, Atopobium vaginae, Prevotella bivia, L. iners, Veillonella montpellierensis, Peptoniphilus sp., Parvimonas sp., Finegoldia magna,</i></p> <p><i>Clostridiales sp., Prevotella timonensis, Anaerococcus tetradius, Corynebacterium amycolatum, Mycoplasma hominis, Prevotella amnii, Peptostreptococcus anginosus, Corynebacterium sp., Ureaplasma urealyticum, Anaerococcus lactolyticus, Dialister propionicifaciens, Corynebacterium striatum</i></p>
(Jespers et al. 2017)	Afrique : Kenya, Afrique du Sud, Rwanda	<p><i>L. crispatus, L. iners, L. jensenii, L. gasseri, L. vaginalis, Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae, Escherichia coli, Prevotella bivia</i></p>
(Liu and Hao 2015)	Chine	<p><i>L. iners, L. crispatus, Cuprivadius, Peptoniphilus, Prevotella, Anoxybacillus, Escherichia coli, Xanthomonadacaes, Acinetobacter, Methylobacterium, Faecalibacterium, Enhydrobacter finegoldia, Micrococcus, Gardnerella, Porphyromonas, Bacteroides</i></p>
(Yeruva et al. 2017)	Inde	<p><i>L. crispatus, L. jensenii, L. gasseri, L. delbrueckii, L. acidophilus, L. iners, L. johnsonii, L. heleveticus, L. reuteri, L. fermentum, L. vaginalis, L. bravis, L. salivarius, L. plantarum, L. paracasei, L. casei, L. rhamnosus</i></p>

(Zhou et al. 2010)	Japon	<p><i>L. iners</i>, <i>L. crispatus</i>, <i>L. jensenii</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>L. vaginalis</i>, <i>L. salivarius</i>, <i>Aerococcus</i> sp., <i>Anaerobranca</i> sp., <i>Anaerococcus</i> sp., <i>Atopobium vaginae</i>, <i>Bergeyella</i> sp., <i>Bifidobacterium breve</i>, <i>Bradyrhizobium</i> sp., <i>Chryseobacterium</i> sp., <i>Clostridium</i> sp., <i>Dialister</i> sp., <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Finegoldia magna</i>, <i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Gemella palaticanis</i>, <i>Lachnospira</i> sp., <i>Leptotrichia</i> sp., <i>Megasphaera</i> sp., <i>Mobiluncus mulieris</i>, <i>Neisseria</i> sp., <i>Peptoniphilus</i> sp., <i>Peptostreptococcus</i> sp., <i>Prevotella</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Streptococcus</i> sp., <i>Veillonella</i> sp.</p>
(Yoshimura et al. 2011)	Japon	<p><i>L. crispatus</i>, <i>L. pontis</i>, <i>L. mucosae</i>, <i>L. iners</i>, <i>L. fornicalis</i>, <i>L. gasseri</i>, <i>L. jensenii</i>, <i>L. coleohominis</i>, <i>L. delbrueckii</i>, <i>L. oris</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>Atopobium vaginae</i>, <i>Enterococcus faecalis</i>, <i>Gemella palaticanis</i>, <i>Mycoplasma hominis</i>, <i>Capnocytophaga ochracea</i>, <i>Clostridium akagii</i>, <i>Corynebacterium accolus</i>, <i>Tissierella praeacuta</i>, <i>Prevotella buccalis</i>, <i>Streptococcus agalacticae</i>, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>, <i>Streptococcus intermedius</i>, <i>Streptobacillus moniliformis</i>, <i>Tannerella forsythensis</i>, <i>Staphylococcus caprae</i>, <i>Prevotella corporis</i>, <i>Achromobacter piechaudii</i>, <i>Neisseria flavescens</i>, <i>Anaerococcus prevotii</i>, <i>Clostridium hastiforme</i>, <i>Clostridium polysaccharolyticum</i>, <i>Gallicola barnesae</i>, <i>Gardnerella vaginalis</i>, <i>Megasphaera micronuciformis</i>, <i>Peptoniphilus</i>, <i>Dialister invisus</i>,</p>

		<i>Eubacterium brachy</i> , <i>Kingella kingae</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptoniphilus lacrimalis</i> , <i>Veillonella dispar</i>
(Dimitonova et al. 2008)	Bulgarie	<i>L. fermentum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>
(Ouarabi et al. 2019)	Algerie	<i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp.
(Borgdorff et al. 2017)	Pays-Bas, Suriname, Ghana, Turquie, Maroc	<i>L. iners</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>BVAB1</i> , <i>Prevotella timonensis</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>Mobiluncus curtisii</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus</i> sp, <i>Streptococcus anginosus</i>
(MacIntyre et al. 2015)	Angleterre	<i>L. iners</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>Streptococcus anginosus</i> , <i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>Prevotella timonensis</i> , <i>Aerococcus christensenii</i> , <i>Atopobium vaginae</i> , <i>Sneathia sanguinegens</i> , <i>Finegoldia magna</i> , <i>Anaerococcus vaginalis</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Streptococcus gallolyticus</i> , <i>Ureaplasma parvum</i> , <i>Prevotella buccalis</i> , <i>Dialister microaerophilus</i> , <i>Prevotella disiens</i> , <i>Anaerococcus lactolyticus</i> ,

		<p><i>Peptoniphilus harei, Staphylococcus devriesei, L. salivarius, Prevotella amnii, Corynebacterium pyruviciproducens, Staphylococcus capitis, Murdochiella asaccharolytica, Anerococcus murdochii, Actinomyces europaeus, Aneriglobus germinates, Peptoniphilus gorbachii, Peptococcus nuger, Capylobacter ureolyticus, Fusobacterium nucleatum, Propionibacterium acnes, Scardovia wiggsiae, Veillonella montpellierensis, Prevotella denticola, Petostreptococcus anaerobius, Porphyromonas bennonis, Peptonipilus lacrimalis, Dialister propionificiens, Gardnerella vaginalis</i></p>
(Virtanen et al. 2017)	Finlande	<p><i>L. iners, L. crispatus, Megasphaera paucivorans, Megasphaera sueciensis, Atopobium vaginae, Prevotella bivia, Megasphaera micronuciformis, Prevotella amnii, Prevotella, L. jensenii, Pseudomonas aeruginosa, Dialister propionificiens, Sneathia sanguinegens, Prevotella disiens, Propionibacterium acnes</i></p>
(Albert et al. 2015)	Canada	<p><i>L. crispatus, L. jensenii, Atopobium vaginae, Streptococcus devriesei, L. acidophilus, L. iners, L. crispatus, Gardnerella vaginalis, Faecalibacterium prausnitzii, L. gasseri, Sphingobium yanoikuyae, Megasphaera sp., Prevotella timonensis, Bifidobacterium breve, Dialister micraerophilus, Clostridia sp., Pseudomonas putida, Porphyromonas uenonis, Corynebacterium accolens, Prevotella amnii, Prevotella buccalis, Escherichia coli,</i></p>

		<p><i>Prevotella bivia, Burkholderia phytofirmans, Acidovorax delafieldii, Methyloversatilis universalis, Bacteroides sp., Clostridium sp., Aerococcus urinae, Pseudomonas brassicacearum, Alloscardovia omnicoles, Bacteroides coagulans, Prevotella veroralis, Prevotella corpori, Acidovorax delafieldii, Bifidobacterium dentium, Sphingium yanoikuyae, Variovorax paradoxus, Bifidobacterium infantis, Actinomyces neuii, L. delbrueckii, Methylobacillus flagellatus, Streptococcus vestibularis, Variovorax paradoxus</i></p>
(Datcu et al. 2013)		<p><i>Atopobium vaginae, Sneathia sanguinegens, Leptotrichia amnionii, BVAB1, BVAB2, BVAB3, BVAB –TM7, Megasphaera, Eggerthella, Moniluncus curtisii, Mobiluncus mulieris, Gardnerella vaginalis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma parvum, Ureaplasma urealyticum, Finegoldia magna, Prevotella spp.</i></p>
(Hyman et al. 2014)	Amérique du Nord	<p><i>L. acidophilus, L. coleohominis, L. crispatus, L. delbrueckii, L. fermentum, L. fornicalis, L. gallinarum, L. gasseri, L. helveticus, L. iners, L. jensenii, L. johnsonii, L. kefirano-faciens, L. kitasatonis, L. reuteri, L. rhamnosus, L. ultunensis, L. vaginalis</i></p>
(Gustafsson et al. 2011)	Suède	<p><i>L. crispatus, L. coleohominis, L. vaginalis, L. acidophilus, L. gasseri, L. jensenii, L. reuteri, L. salivarius, L. delbrueckii</i></p>

(Husain et al. 2014)	Angleterre	<i>L. jensenii, L. vaginalis, L. gasseri, L. crispatus</i>
(Jin et al. 2007)	Corée et Ouganda	<i>L. coleohominis, L. crispatus, L. gasseri, L. jensenii, L. johnsonii, L. kitasatonis, L. mucosae, L. paracasei, L. plantarum, L. pontis, L. reuteri, L. ruminis, L. saerimneri, L. salivarius, L. vaginalis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, Streptococcus anginosus, Weisella confusa, Weisella cibaria, Weisella kimchii-B, L. antri, L. fermentum, L. paracasei, L. salivarius, L. vaginalis, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosacens, Weissella kimchii</i>
(Hickey et al. 2015)	Amérique du Nord	<i>L. crispatus, L. iensenii, L. gasseri, Staphylococcus, Mycoplasma hominis, Aerococcus christensenii, BVAB2, Dialister sp, Peptoniphilus indolicus, Megasphaera sp, Sneathia sanguinegens, Prevotella amnii, Dialister micraerophilus, Atopobium vaginae, Sneathia amnii, Lachnospiraceae, BVAB1, Gardnerella vaginalis, Prevotella</i>
(Hickey et al. 2015)	Amérique du Nord	<i>L. crispatus, L. iners, L. gasseri, Gardnerella vaginalis, L. jensenii, Prevotella, Anaerococcus, Streptococcus anginosus, Streptococcus agalactiae, Gardnerella, Bifidobacterium, Atopobium, Peptoniphilus, Corynebacterium, Finegoldia, Dialister, Escherichia, Shigella, Megasphaera, Sneathia, Alloscardovia, Mobiluncus</i>

(Zhou et al. 2007)	Amérique du Nord	<p><i>L. iners, L. crispatus, L. jensenii, L. gasseri, L. vaginae, L. coleohominis, L. salivarius, Actinobaculum sp., Aerococcus sp., Anaerobranca sp., Anaerococcus sp., Atopobium vaginae, Clostridium sp., Dialister sp., Eggerthella hongkongensis, Enterococcus faecalis, Finegoldia magna, Gardnerella vaginalis, Gemella palasticanis, Leptotrichia sp., Megasphaera sp., Micromonas sp., Mobiluncus mulieris, Mycoplasma sp., Peptococcus niger, Peptoniphilus sp., Peptostreptococcus sp., Prevotella sp., Pseudomonas sp., Staphylococcus sp., Streptococcus sp., Veillonella sp.</i></p>
(Hernández-Rodríguez et al. 2011)	Mexique	<p><i>L. acidophilus, L. iners, Ureaplasma urealyticum, L. gasseri, BVAB1, Gemella bergeriae, Gardnerella vaginalis, L. delbrueckii, Leptotrichia amnionii, Mobiluncus sp., Ureaplasma, Urealyticum, Peptostreptococcus sp., Gardnerella sp., Peptoniphilus indolicus, Anaerococcus vaginalis, Atopobium sp., Mobiluncus mulieris, Porphyromonas dentalis, Prevotella bivia, Leptotrichia sp., Peptoniphilus sp.</i></p>
(Lee et al. 2013)	Corée	<p><i>L. iners, L. crispatus, Prevotella, Sneathia, Veillonella, Atopobium vaginae, Ureaplasma parvum, Shuttleworthia, Adlercreutzia, L. jensenii, Leptotrichia amnionii, Anaerococcus, Porphyromonas, Dialister, Mycoplasma hominis, Streptococcus, Bacteroides ureolyticus, Sphingomonas echinoides, Peptoniphilusa saccharolyticus, Porphyromonas, Streptococcus</i></p>

		<p><i>agalactiae, Streptococcus pseudopneumoniae, Streptococcus anginosus, Bacteroidia, Gardnerella vaginalis, Mobiluncus mulieris, Afipia genosp.1, Dialister micraerophilus, Ralstonia, Anaerococcus hydrogenalis, Corynebacterium, Caulobacter leidyia, Finegoldia, Mobiluncus curtisii, Anaerococcus prevotii</i></p>
(Dareng et al. 2016)		<p><i>L. iners, Gardnerella vaginalis, Proteobacteria, L. crispatus, Pseudomonas, Atopobium vaginae, Leptotrichia amnionii, Megasphaera sp., Prevotella, L. jensenii, Streptococcus, BVAB1, BVAB2, L. gasseri, Sneathia sangyunegens, Veillonella montpellierensis, Aerococcus christensenii, Bifidobacterium, Megasphaera sp., Streptococcus agalactiae, Escherichia coli, Dialister sp., Peptostreptococcus, Streptococcus anginosus, Eggerthella, Parvimonas micra, Enterobacteriaceae, Gemella, Anaerococcus tetradius, Megasphaera, Prevotella melaninogenica, Staphylococcus, Veillonellaceae, Sneathia, Porphyromonas, Peptoniphilus, Mobiluncus</i></p>
(Alioua et al. 2016)	Algerie	<p><i>Enterococcus faecalis, Enterococcus hirae, L. crispatus, L. iners, Aerococcus urinae, L. acidophilus, Streptococcus anginosus, Streptococcus spp., L. delbrueckii subsp. delbrueckii, L. delbrueckii subsp. bulgaricus, Streptococcus agalactiae, L. jensenii, Enterococcus spp., L. johnsonii, Enterococcus faecium</i></p>

(Petricevic et al. 2012)	Autriche	<i>L. casei, L. paracasei, L. jensenii, L. iners, L. salivarius, L. gasseri, L. johnsonii, L. reuteri, L. plantarum, L. rhamnosus, L. sakei</i>
(El Aila et al. 2011)	Belgique	<i>L. crispatus, L. jensenii, L. gasseri, L. iners, Gardnerella vaginalis, Atopobium vaginae</i>
(Madhivanan et al. 2015)	Inde	<i>L. coleohominis, L. crispatus, L. fermentum, L. gasseri, L. iners, L. jensenii, L. johnsonii, L. mucosae, L. oris, L. reuteri, L. ruminis, L. thermophilus</i>
(Babu et al. 2017)	Inde	<i>Enterococcus spp., Micrococcus, Staphylococcus spp., Diphtheroides, Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas spp., Enterobacter spp., L., Streptococcus</i>
(Al Kassaa et al. 2014)	Liban	<i>L. salivarius, L. jensenii, L. crispatus, L. acidophilus, L. heleveticus, L. gasseri, L. ruminis, L. plantarum, L. fermentum</i>

Annexe 2 : Liste des sujets inclus dans l'étude. J - jeunes femmes, M - femmes ménopausées, IMC - indice de masse corporelle.

Numéro de prélèvement	Age	Groupe	IMC	Œstradiol pg/ml
1	65	M	27,74	19
2	50	J	31,19	45
3	34	J	27,07	136
4	44	J	26,54	75
5	33	J	34,32	66
6	39	J	31,96	64
7	29	J	32,2	239
8	23	J	24,5	295
9	42	J	28,67	122,4
10	34	J	30,41	240,2
11	45	J	27,5	134,3
12	30	J	25	25
13	27	J	22,05	202,5
14	32	J	30,54	98,77
15	32	J	27,42	111,5
16	42	J	32,2	91,65
17	19	J	32,91	59,7
18	34	J	22,14	67,04
19	24	J	22,77	169
20	49	M	31	72
21	43	M	34,37	28
22	35	J	23,28	54,74
23	28	J	20,31	167,2
24	46	J	30,69	64,96
25	75	M	26,66	15,84
26	63	M	42,44	31,71
27	45	M	31,44	189
28	33	J	28,12	86,37
29	29	J	23,45	59,38
30	35	J	29,68	231,8
31	39	J	28,67	135,5
32	27	J	33,38	135,1
33	30	J	26,52	16,36
34	42	J	45,33	508,7
35	28	J	22,22	147,9
36	59	M	40,44	5,47
37	70	M	31,49	<5
38	57	M	32,75	5,49
39	44	J	30,07	321,9
40	37	J	29,41	297,6

41	45	J	28,09	<5
42	32	J	25,19	40,42
43	47	M	32,22	191,2
44	40	J	25,29	124,9
45	29	J	32,86	206,4
46	26	J	30,11	52,62
47	48	M	37,89	20,22
48	44	J	31,9	63,23
49	36	J	21,54	68,12
50	57	M	32,44	5,49
51	44	J	21,67	139,5
52	70	M	31,11	12,44
53	31	J	33,91	142,5
59	68	J	26,98	32,35
61	71	M	25	14,95
62	66	M	28,88	13,5
64	50	M	25,07	<5
65	58	M	33,77	17,05
66	54	M	26,29	5,01
67	48	M	34,72	15,45
68	41	M	27,54	5,89
69	68	M	29,66	6,2
70	60	M	30	<5
71	53	M	36,57	10,09
72	50	M	22,85	5,64
73	60	M	40,78	36,73
74	56	M	32,97	15,96
75	50	M	34,78	<5
76	61	M	34,57	12,47
77	38	J	30,15	64,31
78	36	J	20,37	5,87
81	38	J	23,18	127,5
83	57	M	30,15	<5
85	71	M	32,44	19,25
91	52	M	26,76	16,93
93	27	J	22,61	154,7
95	45	J	26,98	167,8
96	30	J	27,11	49,08
98	50	M	32,72	32,72
99	68	M	33,33	<5
100	60	M	31,9	28,07
101	49	M	33,98	130
102	31	J	37,5	187,9
103	34	J	28,36	61,53
104	62	M	37,68	28,44

105	56	M	36,44	15,86
106	60	M	29,59	13,62
107	43	M	22,49	17,17
108	53	M	35,47	19,46
109	59	M	36,02	18,2
110	62	M	33,68	11,21
111	57	M	27	11,72
112	55	M	28,67	26,1
113	58	M	30,88	29,33
114	51	M	32,72	17,05
115	60	M	35,97	47,25
116	61	M	34,76	30,53
117	55	M	25,25	17
118	73	M	35,54	25,67
123	68	M	31,25	18,7
124	45	J	25,26	15,76

Annexe 3 : Liste des espèces bactériennes présentes dans le microbiote vaginal des femmes jeunes Algériennes (J) et des femmes ménopausées

(M). Les espèces dont l'abondance est inférieure à 0,1 % ont été regroupées dans la catégorie "autres".

Taxons bactériens chez les sujets J	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0,01	0	99,15	0	0,02	0,04	0,03	0	0,02	0,02
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0,01	0	75,88	0	96,95	0	0,01	0,09
<i>Lactobacillus iners</i>	0,04	99,91	0,03	98,87	0,07	99,85	0,04	0,07	99,08	0,04
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0,02	0,78	0,03	0	0	0	1	0,89	0
<i>Atopobium vaginae</i>	16,99	0	0	0,03	0	0,01	0,01	98,66	0	73,59
<i>Corynebacterium</i> AY959023	1,36	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fastidiosipila</i> AY958888	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,92	0,06	0,02	0,9	19,74	0,08	2,96	0,01	0	9,46
<i>Megasphaera</i> AY958804	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10,98
<i>Megasphaera</i> DQ666094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37
<i>Prevotella amnii</i>	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	75,93	0	0	0	0,66	0	0	0,01	0	5,21
<i>Sneathia amnii</i>	0,83	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> FJ508335	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0,77	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0	0	0,15	0,94	0	0,01	0	0	0,01
<i>Veillonella montpellierensis</i>	3,03	0	0	0	1,72	0	0	0	0	0,01
Autres	0,06	0,01	0,01	0,02	0,97	0	0	0,25	0	0,21

Taxons bactériens chez les sujets J	J12	J13	J14	J15	J16	J17	J18	J19	J22	J23
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	1,14	0,01	3,47	99,92	0,02	0,06	0,02	0,04	99,55
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0,02	0	0,03	0,04	0	97,09	0	0	0,01
<i>Lactobacillus iners</i>	0	98,81	0,02	92,25	0,01	99,94	0,12	0,07	99,87	0,43
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0,01	0	0	0	0,02	0	0	0,09	0
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0,01	0,23	0,03	0,01	0	0	33,01	0	0
<i>Corynebacterium</i> AY959023	0	0	3,37	0	0	0,01	0	0	0	0
<i>Fastidiosipila</i> AY958888	0	0	0,23	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	99,86	0	0,7	2,82	0	0	0	3,4	0	0
<i>Megasphaera</i> AY958804	0,02	0	0,78	0	0	0	0	0,49	0	0,01
<i>Megasphaera</i> DQ666094	0	0	0,1	0	0	0	0	0,06	0	0
<i>Prevotella amnii</i>	0	0	24,59	0,02	0	0	0	62,53	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	0	0	0	0	0	0	0,94	0	0	0
<i>Sneathia amnii</i>	0	0	63,21	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> FJ508335	0	0	1,18	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	5,46	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0,11	0	0	0,05	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0,42	0	0	0	0	0	0
Autres	0,01	0,01	0,11	0,9	0,02	0,01	1,79	0,43	0	0

Taxons bactériens chez les sujets J	J24	J28	J29	J30	J31	J32	J33	J34	J35	J39
<i>Lactobacillus crispatus</i>	99,86	0,34	15,42	0,04	0,05	99,81	0,05	99,92	74,04	0,13
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0,01	0,49	99,51	0	0,01	0	0	0	0
<i>Lactobacillus iners</i>	0,05	99,58	23,4	0,1	99,91	0,09	87,3	0,08	25,92	0,12
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0,05	1,68	0	0,03	0,05	0	0	0	0,02
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0	2,81	0	0	0	12,24	0	0	23,5
<i>Corynebacterium</i> AY959023	0	0	0,32	0	0	0	0	0	0	1,77
<i>Fastidiosipila</i> AY958888	0	0	0,25	0	0	0	0	0	0	0,01
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,07	0	1,88	0	0,01	0	0	0	0,01	5,3
<i>Megasphaera</i> AY958804	0	0	0,91	0	0	0	0	0	0	0,99
<i>Megasphaera</i> DQ666094	0	0	0,04	0	0	0	0	0	0	0,28
<i>Prevotella amnii</i>	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	0	0	0,24	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia amnii</i>	0	0	0,93	0	0	0	0,31	0	0	10,73
<i>Sneathia</i> FJ508335	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0,6
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0,28	0	0	0	0	0	0	0,68
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0	0,04	0	0	0	0,02	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0	0	0	0,07	0	0,01	0
Autres	0,01	0,02	49,28	0,35	0	0,03	0,01	0	0,02	55,88

Taxons bactériens chez les sujets J	J40	J41	J42	J43	J44	J46	J48	J49	J51	J53
<i>Lactobacillus crispatus</i>	99,41	0,06	98,06	99,95	96,48	1,04	61,82	87,63	88,1	0,02
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0,04	0	0	0	0,35	11,51	0,03	0
<i>Lactobacillus iners</i>	0,01	0,03	0,02	0,01	0,03	98,06	12,84	0	0,03	93,63
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0,56	97,48	1,81	0,01	2,88	0,87	24,73	0	4,6	0,97
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0	0,01	0,01	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> AY959023	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Fastidiosipila</i> AY958888	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	2,4	0,03	0	0	0	0,04	0	0	0
<i>Megasphaera</i> AY958804	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera</i> DQ666094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella amnii</i>	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia amnii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> FJ508335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0,01	0	0	0,18	0,01	0,07	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autres	0,02	0,02	0,03	0	0,43	0,01	0,13	0,86	7,23	5,38

Taxons bactériens chez les sujets J	J59	J77	J78	J81	J93	J95	J96	J102	J103	J124
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	88,42	0	0,03	1,13	14,32	0	30,99	59,52	92,97
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus iners</i>	94,52	1,3	94,25	89,02	94,08	74,83	0	56,14	0	0,02
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0	0	5,07	0	0,85	0	0,17	28,7	0
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0	0	0	0	0	46,27	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> AY959023	0	0	0	0	0	0	4,18	0	0	0
<i>Fastidiosipila</i> AY958888	0	0	0	0	0	0	1,57	0	0	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	0	0	0,02	0	0	4,15	0	0	0
<i>Megasphaera</i> AY958804	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera</i> DQ666094	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella amnii</i>	0	0	0	0,08	0	0	14,52	0	0	0
<i>Prevotella bivia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia amnii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> FJ508335	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	0	0	3,83	0,02	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0,3	0	0,18	0,02	0	0	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autres	5,48	9,98	5,75	5,52	4,77	10	25,48	12,69	11,78	7,02

<i>Roseburia</i> GQ897045.1.1493/GQ898792.1.1493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i> ge FPLO01002348.10.1517	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcus callidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> DQ666091.1.1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> EU471494.1.1413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> JQ471469.1.1405	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,03	9,55	0,02
<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autres	0,11	0	0,06	0,02	0,08	6,14	0,03	93,38	17,53	0,04

<i>Corynebacterium</i> GQ107232.1.1343	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> JX501771.1.1488	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2,02
<i>Cutibacterium acnes</i>	0,16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Cutibacterium</i> FJ512373.1.1370	0	0,1	0,22	0	0,02	0	0	0	0	0
<i>Dialister</i> LSDR01000051.85.1641	0	0,02	0	0	0,03	0	0	0	0,22	0
<i>Dialister micraerophilus</i>	0	0	0	0	0,4	0,03	0	0	0,15	0
<i>Dialister propionicifaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,47
<i>Corynebacterium</i> LSCX01000005.274.1770	0	0	0	0	0,43	0	0	0	3,63	0,02
<i>Escherichia-coli</i>	0	0,03	0,23	0	0,07	0	0	0	0	0,05
<i>Ezakiella coagulans</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,37
<i>Ezakiella</i> CZPW01000007.475510.477025	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,95
<i>Ezakiella Fenollaria massiliensis</i>	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	1,82
<i>Faecalibacterium</i> BAAV01001498.399.1646	0	0,02	0,05	0	0,88	0	0	0	0	0
<i>Fastidiosipila</i> AY958888.1.1513	0	0	0	0	0,43	0	0	0	0	0,02
<i>Finegoldia magna</i>	0	0,03	0	0	1,45	0,02	0	0	5,07	2,15
<i>Fusicatenibacter</i> GQ897332.1.1490	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0
<i>Fusobacterium</i> JQ447863.1.1376	0	0	0	0	0	0	0	0	10,25	0
<i>Gemella asaccharolytica</i>	0	0	0	0	3,8	0	0	0	4,48	0
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	96,17	0,22	0	0	0	0	0,02	0	0
<i>Howardella</i> AF385567.1.1491	0	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0,37
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> ge FJ509778.1.1377	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> ge MH699305.1.1494	0	0	0,02	0	0,03	0	0	0	0	0
<i>Lachnospiraceae</i> NK4A136 group FJ508476.1.1355	0	0	0	0	0,37	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> AB506301.1.1555	0	0	0	0	0,2	0	0	0	0	0

<i>Roseburia</i> GQ897045.1.1493/GQ898792.1.1493	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i> ge FPLO01002348.10.1517	0	0	0	0	0,45	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcus callidus</i>	0	0	0	0	0,45	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> DQ666091.1.1476	0	0	0	0	5,95	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	1,05	0	0	0	8,28	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0,05	95,18	0	0	0	0	0,02	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	0	0	0	1,3	0	0	0	0,5	0
<i>Streptococcus</i> EU471494.1.1413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,17
<i>Streptococcus</i> JQ471469.1.1405	0	0	0	0	0	0	0	0	0,52	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0,02	0	0	0	0,08	0	0	0,02	0	0,1
<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0
<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	0	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0,82
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0,03	0	0	1,18	0	0	0	0,02	0
Autres	0,1	1,92	3,83	5,65	22,18	6,6	2	5,28	6,42	36,48

Taxons bactériens chez les sujets M	M70	M71	M72	M73	M74	M75	M76	M83	M85	M91
<i>Lactobacillus crispatus</i>	14,25	0,03	0,08	0	68,77	0,03	92,47	89,25	24,12	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0,05	0	0	36,28	0	0,08	0,62	0
<i>Lactobacillus iners</i>	71,7	94,58	5,35	94,38	19,42	0,02	0	0,02	0,03	78,21
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1,8	0	0	0	0,37	0	0,28	0	0	3,53
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0
<i>Actinomyces turicensis</i>	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Alloscardovia omnicolens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerococcus</i> AY958800.1.1502	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerococcus</i> LY336533.1.1447	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerococcus tetradius</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,77
<i>Atopobium deltae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> AB470314.1.1493	0	0	0	0	0	0	0	0	29,89	0,05
<i>Blautia</i> GQ897137.1.1489	0	0	2,77	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0,03	0	0	0	0	57,67	0	0,02	0	0
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,03	0	6,65	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	0	0	0	0	0	0,02	0	0	0,12	0,02
<i>Corynebacterium riegelii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium simulans</i>	0	0	5,25	0	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> 1 JF125355.1.1339	0	0	0	0	0,02	0	0	0	0,3	0
<i>Corynebacterium</i> 1 JF156704.1.1344	0	0	0,17	0	0,03	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> 1 LTIM01000071.135.1665	0	0	3,94	0	0	0,02	0	0	0	0

<i>Roseburia</i> GQ897045.1.1493/GQ898792.1.1493	0	0	5,12	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i> ge FPLO01002348.10.1517	0	0	2,4	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcus callidus</i>	0	0	1,17	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> DQ666091.1.1476	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0,02	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	2,9	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	0	0	0,57	0	0	0,02	0	0	0	0,15
<i>Streptococcus</i> EU471494.1.1413	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> JQ471469.1.1405	0	0	0,57	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0,02	0,05	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	0	0	0,65	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Autres	5,28	5,13	47,11	5,6	7,13	0,77	7,23	9,9	38,96	6,24

Taxons bactériens chez les sujets M	M98	M99	M100	M101	M104	M105	M106	M107	M108	M109
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	0,03	0,02	91,2	0	0	0	88,7	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,92	0,22
<i>Lactobacillus iners</i>	0,02	0,17	0	88,06	0	0	0,1	0	0	0
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0,03	0	0	0,62	0	0,02	0	0	0,02
<i>Atopobium vaginae</i>	0	0,02	0	0,05	0,02	0	0	61,08	0	0,05
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	0	0	0,02	0,02	0	0	0,62	0,27	0,03
<i>Actinomyces turicensis</i>	0,07	0	0,82	0,03	0	0,29	0,18	0	0	0
<i>Alloscardovia omnicolens</i>	0	0	0	0	0	0,36	4,7	0	0	0
<i>Anaerococcus</i> AY958800.1.1502	0,08	0	0,05	0	0	0,03	0	0	0	0
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	26,33	0	3,72	1,23	0	1,05	1,48	0	0	0
<i>Anaerococcus</i> LY336533.1.1447	11	0	0	0,02	0	0,47	0	0	0	0
<i>Anaerococcus tetradius</i>	0	0	0	0,13	0	1,96	0	0	0	0
<i>Atopobium deltae</i>	0	0	0,15	0,02	0	0	0,08	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> AB470314.1.1493	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Blautia</i> GQ897137.1.1489	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0,05	0	0,02	0,05	0	0	0	7,2	0,95	0,08
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	0,08	0,2	0,98	0	0	0,22	2,07	0	0	0,57
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0,08	0	0,28	0	0	0,15	0	0	0	0
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	0,03	0	0	0	0	0	0,02	0	0	22,72
<i>Corynebacterium riegelii</i>	0	0	0	0,07	0	0	0	0	0	0
<i>Corynebacterium simulans</i>	0	0	0,88	0	0	1,05	0,93	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> 1 JF125355.1.1339	0	0	0	0,05	0	0,02	0,02	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> 1 JF156704.1.1344	0	0	0	0	0	0,03	0,5	0	0	0
<i>Corynebacterium</i> 1 LTIM01000071.135.1665	0	0,02	0,05	0	0	0,25	0,15	0	0	0

<i>Roseburia</i> GQ897045.1.1493/GQ898792.1.1493	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i> ge FPLO01002348.10.1517	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcus callidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sneathia</i> DQ666091.1.1476	0	0	0	0	0	0	0	1,57	0	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	0	0	0,05	0	0	0,32	0,63	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0,03	70,79	0	0	43,84	1,02	0	0	0	0
<i>Streptococcus anginosus</i>	0,03	0,1	0,78	0	0	15,8	25,41	0	0,08	0	0
<i>Streptococcus</i> EU471494.1.1413	1	0	0	0	0	0	5,62	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> JQ471469.1.1405	1,6	0	0,15	0	0	0	0	0	0	0	66,32
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0	0	0,02	0	0,17	0	0	0,05	0,42	0
<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004	0	0	0,03	0,05	0	3,67	0	0	0	0	0
<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357	2,07	0	0	0,02	0	0,17	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	0,03	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0	0,83
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	0	0	0,05	0	0	0	0	0	0	0
Autres	28,17	0,38	10,57	7,73	8,15	6,48	28,85	7,27	8,8	5,85	0

Taxons bactériens chez les sujets M	M110	M111	M112	M114	M115	M116	M117	M118	M123
<i>Lactobacillus crispatus</i>	0	0	0	25,68	0,12	0	0	0	9,09
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0	0,37	4,02	0	0	0	0	8,57
<i>Lactobacillus iners</i>	0	0	0	0	1,72	0,87	92,45	0,32	0
<i>Lactobacillus jensenii</i>	0	0	0	26,2	0	0,02	0,48	0	0
<i>Atopobium vaginae</i>	0,07	2,57	0	0,08	0	40,72	0,08	0	0,2
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0	13,66	0	0	0	2,65	0	0	0,02
<i>Actinomyces turicensis</i>	0,03	0,53	0,32	0	0	0	0	0,28	0
<i>Alloscardovia omnicolens</i>	0	0	2,27	0	0	0	0	0	0
<i>Anaerococcus</i> AY958800.1.1502	0	0,05	0,05	0	0	0	0	0,13	0,28
<i>Anaerococcus lactolyticus</i>	0	4,23	22,49	0	0	0	0	10,47	0
<i>Anaerococcus</i> LY336533.1.1447	0	2,27	0	0	0	0,02	0	16,66	0
<i>Anaerococcus tetradius</i>	0	0,55	0	0	0	0	0	0	0
<i>Atopobium deltae</i>	0	0,27	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium</i> AB470314.1.1493	0	0	0	15,8	82,23	0	0	0,52	0
<i>Blautia</i> GQ897137.1.1489	0	0,02	0	0	0	0	0	0	0
<i>Chlamydia trachomatis</i>	0,02	0,87	0	0,05	0	0,1	0,2	0	10,85
<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	0,03	0	0,57	0	0,52	0	0	0,55	8,49
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	0	0	0,6	0	0,05	0	0,03	0,13	0,38
<i>Corynebacterium urealyticum</i>	0	0,03	1,02	0	0,27	0	0	0,1	0,4
<i>Corynebacterium riegelii</i>	0,02	0	1,15	0	0	0	0	0,43	0
<i>Corynebacterium simulans</i>	0	0,68	0,18	0	0,43	0	0	0	3,82
<i>Corynebacterium</i> 1 JF125355.1.1339	0,07	0	0,68	0	0,02	0	0	1,17	0
<i>Corynebacterium</i> 1 JF156704.1.1344	0	0,03	0,27	0	0,12	0	0	1,93	0,55
<i>Corynebacterium</i> 1 LTIM01000071.135.1665	0	0	0,2	0	0,03	0	0,02	0,27	0,43

<i>Lactobacillus</i> AB969464.1.1567	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0
<i>Lactobacillus</i> AY958972.1.1537	0	0	0	0,02	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> AY959084.1.1539	0	0	0	0	0	0	0,88	0	0
<i>Lactobacillus</i> AY959127.1.1545	0	0	0	0	0	0	1,1	0	0
<i>Mobiluncus</i> JF112895.1.1358	0	0,03	0,12	0	0	0	0	0,3	0,02
<i>Fusobacterium naviforme</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Moryella</i> LN907854.1.1493	0	0	0	0	0	0	0	0,27	0
<i>Mycoplasma hominis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Parvimonas</i> LSCW01000063.37.1552	0	0	0	0	0	0,53	0	0	0
<i>Peptococcus niger</i>	0	0,35	0,02	0	0	0	0	0	0
<i>Peptoniphilus coxii</i>	0	2,52	2	0	0	0	0	1,78	0
<i>Peptoniphilus harei</i>	0	3,29	2,79	0,02	0	0	0,02	5,64	3,03
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i> 315-B	0	0,15	0	0	0	0,02	0	0,25	0
<i>Peptoniphilus</i> LSDH01000058.284.1796	0	0,08	0,53	0,02	0	0	0	0,03	1,58
<i>Urinacoccus massiliensis</i>	0	0,02	0,17	0	0	0	0	0,18	0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0	0,6	0,02	0	0	0	0	0	1,32
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	0,02	0,18	0,22	0	0	0	0	0,18	0,27
<i>Prevotella colorans</i>	0	0,48	0	0	0	0	0	0,4	0
<i>Prevotella amnii</i>	0,02	0	0	0,02	0	40,13	0	0	0,07
<i>Prevotella bivia</i>	0	3,21	0	10,22	0,03	0	0	0	7,42
<i>Prevotella buccalis</i>	0	0,13	0,08	0	0	0,08	0	0,33	0,08
<i>Prevotella</i> GQ156652.1.1446	0	0,52	0	0	0	0	0	0	0,77
<i>Prevotella</i> JRPT01000097.3617.5158	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella timonensis</i>	0,02	8,68	7,56	0	0	0,13	0	1,08	0,03
<i>Propionimicrobium lymphophilum</i>	0	0,02	7,11	0	0	0	0	0,75	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89,56	0	0	0	0	0	0	0	0

<i>Roseburia</i> GQ897045.1.1493/GQ898792.1.1493	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcaceae</i> ge FPLO01002348.10.1517	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ruminococcus callidus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0,27
<i>Sneathia</i> DQ666091.1.1476	0	0	0	0	0	2,77	0,02	0	0
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0	30,88	0	0,02	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0	0,17	0	0	0	0	0,03	0	4,05
<i>Streptococcus anginosus</i>	1,05	1,57	10,11	0	0,38	0	0	9,54	4,33
<i>Streptococcus</i> EU471494.1.1413	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Streptococcus</i> JQ471469.1.1405	0,13	0	0	0,02	0,1	0	0	0	0
<i>Ureaplasma parvum</i>	0	0	0	0	0	0	0,03	0	0
<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004	0	0,12	6,39	0	0	0	0	0	0,02
<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357	0	0	0,38	0	0	0	0	2,1	0
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	0	0	0	0	0	0	0	0	1,82
<i>Veillonella montpellierensis</i>	0	11,19	0	11,03	0	0	0	0	0
Autres	4,12	4,69	27,21	5,5	9,52	8,9	4,5	14,7	15,89

Annexe 4. Matrices de comparaison et des variations des divers paramètres utilisés lors des tests statistiques.

Tableau I. Matrice de comparaison des variations de l'abondance relative des phyla bactériens entre les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M).

Phylum	Moyenne (J)	Moyenne (M)	p-value
<i>Firmicutes</i>	83,04 ± 35,23	69,36 ± 36,62	0,01
<i>Actinobacteria</i>	10,04 ± 24,51	18,19 ± 27,39	0,59
<i>Bacteroidetes</i>	5,02 ± 15,98	4,53 ± 8,55	1,00
<i>Proteobacteria</i>	0,07 ± 0,30	4,92 ± 19,01	0,99
<i>Fusobacteria</i>	1,79 ± 9,99	1,28 ± 5,17	1,00
<i>Tenericutes</i>	0,05 ± 0,14	1,27 ± 8,60	1,00
<i>Patescibacteria</i>	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,61	1,00
Autres	0,00 ± 0,01	0,20 ± 0,59	1,00

Tableau II. Matrice de comparaison des variations de l'abondance relative des genres bactériens entre les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M).

Genres	Moyenne (J)	Moyenne (M)	p-value
<i>Lactobacillus</i>	82,45 ± 36,90	47,32 ± 47,28	< 0,0001
<i>Streptococcus</i>	0,05 ± 0,26	9,99 ± 24,71	0,265
<i>Veillonella</i>	0,11 ± 0,50	0,58 ± 2,23	1,000
<i>Megasphaera</i>	0,41 ± 1,83	0,05 ± 0,25	1,000
<i>Fastidiosipila</i>	0,04 ± 0,24	0,14 ± 0,54	1,000
<i>Aerococcus</i>	0,02 ± 0,12	0,11 ± 0,43	1,000

Tableau III. Matrice de comparaison des variations de l'abondance relative des espèces bactériennes entre les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M).

Espèces	Moyenne (J)	Moyenne (M)	p-value
<i>Lactobacillus iners</i>	36,97 ± 45,85	23,18 ± 38,26	0,066
<i>Lactobacillus crispatus</i>	32,61 ± 43,84	18,01 ± 33,55	0,033
<i>Lactobacillus gasseri</i>	7,79 ± 25,68	2,04 ± 8,51	0,999
<i>Atopobium vaginae</i>	6,22 ± 19,08	6,19 ± 19,42	1,000
<i>Lactobacillus jensenii</i>	3,50 ± 14,72	0,97 ± 4,07	1,000
<i>Gardnerella vaginalis</i>	3,12 ± 14,47	1,31 ± 5,88	1,000
<i>Prevotella amnii</i>	2,08 ± 9,70	1,14 ± 6,01	1,000
<i>Prevotella bivia</i>	1,69 ± 10,85	1,29 ± 4,45	1,000
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0,22 ± 0,95	0,84 ± 4,54	1,000
<i>Ureaplasma parvum</i>	0,04 ± 0,14	0,22 ± 1,36	1,000
<i>Fastidiosipila AY958888</i>	0,04 ± 0,23	0,10 ± 0,49	1,000

Tableau IV. Variations du taux d'œstradiol entre les femmes jeunes (J) et les femmes ménopausées (M) en utilisant l'ANOVA unidirectionnelle avec le test de Tukey post-hoc pour les comparaisons par paires avec un intervalle de confiance de 95% ($p < 0,05$).

Concentration en œstradiol	Différence	Ecart-type	p-value
J vs M	101,34	7,006	<0,0001
Conditions	Moyenne	Niveau de significativité	
J	124,58	a	
M	23,23		B

Tableau V. Matrice de corrélation entre le niveau d'œstradiol et l'abondance des espèces de *Lactobacillus*.

Matrice de corrélation (Pearson)						p-values					
Variables	Œstradiol	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. jensenii</i>	Variables	Œstradiol	<i>L. crispatus</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. iners</i>	<i>L. jensenii</i>
Œstradiol	1					Œstradiol	0				
<i>L. crispatus</i>	0,179	1				<i>L. crispatus</i>	0,077	0			
<i>L. gasseri</i>	0,184	-0,146	1			<i>L. gasseri</i>	0,070	0,151	0		
<i>L. iners</i>	0,054	-0,371	-0,181	1		<i>L. iners</i>	0,595	0,000	0,074	0	
<i>L. jensenii</i>	-0,094	0,015	-0,047	-0,110	1	<i>L. jensenii</i>	0,357	0,883	0,644	0,282	0

Tableau VI. Matrice de corrélation entre les niveaux d'œstradiol et l'IMC.

Matrice de corrélation (Pearson)		
Variables	Œstradiol	IMC
Œstradiol	1	
IMC	-0,251	1
p-values		
Variables	Œstradiol	IMC
Œstradiol	0	
IMC	0,013	0

Annexe 5 : Dynamique des espèces bactériennes dans le microbiote vaginal des femmes jeunes et ménopausées.

Espèces spécifiques aux femmes jeunes	Espèces communes entre les femmes jeunes et ménopausées	Espèces spécifiques aux femmes ménopausées
<i>Actinomyces naeslundii viscosus</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Acidaminococcus intestini</i>
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> DSM 20342	<i>Acinetobacter</i> FJ192496.1.1495	<i>Acinetobacter</i> EU137632.1.1498
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Acinetobacter indicus</i>	<i>Acinetobacter</i> EU567041.1.1530
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Actinomyces</i> JQ449710	<i>Acinetobacter</i> FPLP01006293.2.1461
<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	<i>Aerococcus christensenii</i>	<i>Actinobaculum massiliense</i>
<i>Corynebacterium stationis</i>	<i>Aerococcus</i> DQ129404	<i>Actinomyces europaeus</i> ACS-120-V-Col10b
<i>Corynebacterium</i> JF175088	<i>Agathobacter</i> FJ371821	<i>Actinomyces</i> JQ478243.1.1395
<i>Corynebacterium</i> JX501771.1.1488	<i>Alloscardovia</i> JWAI01000011	<i>Actinomyces</i> JRMU01000025.3763.5307
<i>Howardella</i> AF385567.1.1491	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	<i>Actinomyces</i> LTXG01000015.79.1538
<i>Lactococcus Brachyspira hampsonii</i>	<i>Anaerococcus</i> AM176530	<i>Actinomyces naeslundii</i>
<i>Pelomonas</i> KP218928.1.1488	<i>Anaerococcus</i> AY958787	<i>Actinomyces turicensis</i>
<i>Prevotella</i> DQ795842	<i>Anaerococcus</i> EU735709	<i>Actinomyces urogenitalis</i>
<i>Propionibacterium granulosum</i>	<i>Anaerococcus</i> GQ103547	<i>Aerococcus</i> EU776946.1.1408
<i>Pseudonocardia</i> AY921961.1.1372	<i>Anaerococcus</i> JF137201	<i>Agathobacter</i> EF071170.1.1502
<i>Streptococcus</i> KU713445.1.1404	<i>Anoxybacillus</i> EU535551.1.1414	<i>Akkermansia muciniphila</i>
<i>Veillonella</i> JQ474963.1.1421	<i>Arcanobacterium</i> JRMX01000008	<i>Alistipes finegoldii</i>
	<i>Atopobium vaginae</i>	<i>Alistipes indistinctus</i>
	<i>Bacteroides</i> DQ824218	<i>Alloprevotella</i> JQ454401.1.1394
	<i>Bacteroides</i> FJ507583	<i>Alteromonadales</i> ge HM323790
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Anaerococcus</i> AY958800.1.1502
	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Anaerococcus</i> AY958826.1.1453
	<i>Bifidobacterium</i> GQ897220	<i>Anaerococcus</i> AY958901
	<i>Bifidobacterium tsurumiense</i>	<i>Anaerococcus</i> GQ004200.1.1347
	<i>Blautia</i> DQ800647	<i>Anaerococcus</i> GQ106345.1.1347
	<i>Blautia</i> HQ776592	<i>Anaerococcus</i> HM248719.1.1348

	<i>Brevibacterium ravensturnense</i>	<i>Anaerococcus</i> HM256559.1.1348
	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	<i>Anaerococcus</i> HM317242.1.1347
	<i>Campylobacter hominis</i>	<i>Anaerococcus</i> HM336903.1.1348
	<i>Campylobacter ureolyticus</i>	<i>Anaerococcus</i> HM342832.1.1349
	<i>Capnocytophaga</i> JQ456677	<i>Anaerococcus</i> HQ814820.1.1449
	<i>Catenibacterium</i> FJ509024	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>
	<i>Catenibacterium</i> KF843317	<i>Anaerococcus</i> JF192913.1.1348
	<i>Catenisphaera</i> GQ897879	<i>Anaerococcus</i> JF201522.1.1347
	<i>Chlamydia trachomatis</i>	<i>Anaerococcus</i> JF219238.1.1347
	<i>Chryseobacterium hominis</i>	<i>Anaerococcus</i> JF220146.1.1348
	<i>Cloacibacterium</i> AY945872	<i>Anaerococcus</i> JF230780.1.1349
	<i>Coprococcus 3</i> DQ809529	<i>Anaerococcus lactolyticus</i>
	<i>Corynebacterium pilbarensense</i>	<i>Anaerococcus</i> LT900366.1.1516
	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	<i>Anaerococcus</i> LY336533.1.1447
	<i>Corynebacterium</i> AY959164	<i>Anaerococcus mediterraneensis</i>
	<i>Corynebacterium</i> GQ090657	<i>Anaerococcus prevotii</i> DSM 20548
	<i>Corynebacterium</i> LTIM01000071.135.1665	<i>Anaerococcus provencensis</i>
	<i>Corynebacterium pseudogenitalium</i>	<i>Anaerococcus tetradius</i>
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Anaeroglobus geminatus</i>
	<i>Corynebacterium pyruviciproducens</i>	<i>Anaerostipes</i> FPLP01000330.3.1438
	<i>Corynebacterium simulans</i>	<i>Anaerostipes</i> GQ896686.1.1492
	<i>Corynebacterium</i> AY959023	<i>Arcanobacterium haemolyticum</i>
	<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Arcanobacterium</i> JRMX01000008.215.1745
	<i>Cutibacterium</i> FJ512373.1.1370	<i>Arcanobacterium urinimassiliense</i>
	<i>Dermabacter jinjuensis</i>	<i>Atopobium deltae</i>
	<i>Desulfovibrio</i> EF401883	<i>Atopobium</i> JQ460389.1.1375
	<i>Dialister</i> AY958979	<i>Atopobium Lancefieldella rimae</i>
	<i>Dialister</i> AY959060	<i>Bacillus eiseniae</i>
	<i>Diaphorobacter</i> KJ200504	<i>Bacillus</i> HE974809
	<i>Dietzia</i> AY745816	<i>Bacteroides</i> CEAM01011103.3229.4737
	<i>Dorea</i> FJ677517	<i>Bacteroides</i> CECF01052785.95.1602

	<i>Eggerthella lenta</i>	<i>Bacteroides clarus</i>
	<i>Enhydrobacter</i> GQ156845	<i>Bacteroides fragilis</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Bacteroides</i> GQ493606.1.1389
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacteroides</i> GQ898837.1.1488
	<i>Enterococcus</i> KC002632	<i>Bacteroides</i> KC894577.1.1512
	<i>Eremococcus</i> AY959019	<i>Bacteroides uniformis</i>
	<i>Eremococcus coleocola</i>	<i>Barnesiella</i> FJ371820.1.1388
	<i>Escherichia-Shigella coli</i>	<i>Bergeyella</i> AY008691.1.1485
	<i>Ezakiella coagulans</i>	<i>Bergeyella</i> JQ447552.1.1385
	<i>Facklamia</i> JF229920	<i>Bifidobacterium</i> AB470314.1.1493
	<i>Facklamia languida</i>	<i>Bifidobacterium breve</i> HPH0326
	<i>Faecalibacterium</i> FJ683765	<i>Bifidobacterium catenulatum</i>
	<i>Fastidiosipila</i> AY958888	<i>Bifidobacterium</i> GQ896958.1.1487
	<i>Finegoldia</i> KT275140	<i>Bifidobacterium</i> GQ898821.1.1485
	<i>Finegoldia magna</i>	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>
	<i>Flavobacterium</i> KC432449	<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i> PV20-2
	<i>Fusobacterium</i> JQ470725	<i>Bifidobacterium longum</i>
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i>
	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Blautia</i> DQ795753.1.1391
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<i>Blautia</i> DQ796468.1.1389
	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Blautia</i> FJ371176.1.1395
	<i>Holdemanella</i> GQ897836	<i>Blautia</i> FMEU01000030.19333.20842
	<i>Howardella</i> AF287769	<i>Blautia</i> GQ897137.1.1489
	<i>Howardella</i> JQ472943	<i>Blautia</i> GQ898718.1.1489
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Blautia</i> HQ779179.1.1452
	<i>Kocuria marina</i>	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
	<i>Kocuria rosea</i>	<i>Brachyspira hamptonii</i>
	<i>Lactobacillus</i> AB969464.1.1567	<i>Brevibacterium</i> JF166626.1.1344
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Brevibacterium mcbrellneri</i>
	<i>Lactobacillus</i> AY958972.1.1537	<i>Bulleidia extracta</i>

	<i>Lactobacillus</i> AY959127.1.1545	<i>Butyricoccus</i> GQ491576.1.1378
	<i>Lactobacillus coleohominis</i>	<i>Butyrivibrio</i> DQ801124.1.1382
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Casaltella massiliensis</i>
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Catenibacterium</i> KF843125.1.1417
	<i>Lactobacillus</i> GQ448256.1.1427	<i>Catenibacterium mitsuokai</i>
	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Chryseobacterium anthropi</i>
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Chryseobacterium hispanicum</i>
	<i>Lautropia</i> FJ470424	<i>Citrobacter farmeri</i>
	<i>Lawsonella</i> KC001804	<i>Cloacibacterium</i> JN019026.1.1476
	<i>Leuconostoc carnosum</i>	<i>Cloacibacterium</i> KC000870.1.1354
	<i>Leuconostoc</i> EU463927	<i>Coprococcus</i> 1 EU774106.1.1360
	<i>Megasphaera</i> AY958804	<i>Coprococcus</i> 2 GQ897226.1.1477
	<i>Megasphaera</i> DQ666094	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>
	<i>Megasphaera</i> KF842438	<i>Corynebacterium</i> AY959164
	<i>Micrococcus</i> KF797945	<i>Corynebacterium</i> JF175088
	<i>Mobiluncus curtisii</i>	<i>Corynebacterium</i> HM257287.1.1340
	<i>Mycoplasma hominis</i>	<i>Corynebacterium</i> JF125355.1.1339
	<i>Mycoplasma</i> JN673565	<i>Corynebacterium</i> JF171669.1.1344
	<i>Neisseria</i> AM419960	<i>Corynebacterium coyleae</i>
	<i>Nocardia</i> EF502100	<i>Corynebacterium genitalium</i>
	<i>Oligella urethralis</i>	<i>Corynebacterium godavarianum</i>
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Corynebacterium macginleyi</i>
	<i>Peptoniphilus</i> GQ003909	<i>Corynebacterium minutissimum</i>
	<i>Peptoniphilus harei</i>	<i>Corynebacterium pilbarensis</i>
	<i>Peptoniphilus</i> JF231378	<i>Corynebacterium riegellii</i>
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Corynebacterium stationis</i>
	<i>Phascolarctobacterium</i> DQ905662	<i>Corynebacterium urealyticum</i>
	<i>Prevotella</i> FJ685183	<i>Corynebacterium</i> LSCX01000005.274.1770
	<i>Prevotella</i> GQ156641	<i>Cutibacterium avidum</i>
	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Deinococcus</i> CP026516.2358738.2360224

	<i>Prevotella</i> JQ187509	<i>Dermabacter</i> ATFO01000001.3627.5132
	<i>Prevotella</i> KF842343	<i>Dermacoccus nishinomiyaensis</i>
	<i>Prevotella corporis</i>	<i>Dialister</i> KR514389.1.1491
	<i>Prevotella</i> JRNC01000117	<i>Dialister</i> LSDR01000051.85.1641
	<i>Prevotella</i> GQ156641	<i>Dialister micraerophilus</i>
	<i>Prevotella amnii</i>	<i>Dialister propionicifaciens</i>
	<i>Prevotella bivia</i>	<i>Dorea</i> EU771666.1.1392
	<i>Prevotella buccalis</i>	<i>Dorea</i> FJ372015.1.1353
	<i>Prevotella disiens</i>	<i>Dorea</i> GQ897167.1.1490
	<i>Prevotella</i> GQ043074	<i>Eremococcus</i> AY959019.1.1494
	<i>Prevotella timonensis</i>	<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>
	<i>Pseudoglutamicibacter albus</i>	<i>Ezakiella</i> CZPW01000007.475510.477025
	<i>Pseudomonas</i> FJ557561	<i>Ezakiella Fenollaria massiliensis</i>
	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Ezakiella Fenollaria timonensis</i>
	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Ezakiella</i> HM327761.1.1361
	<i>Rheinheimera</i> KF975535	<i>Ezakiella</i> JF183747.1.1356
	<i>Romboutsia</i> DQ800285	<i>Ezakiella massiliensis</i>
	<i>Roseburia</i> FJ508435	<i>Facklamia</i> LTHL01000050.31.1587
	<i>Sneathia amnii</i>	<i>Facklamia</i> Y15037.1.1432
	<i>Sneathia</i> FJ508335	<i>Faecalibacterium</i> BAAV01001498.399.1646
	<i>Sneathia sanguinegens</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
	<i>Sporanaerobacter acetigenes</i>	<i>Fannyhessea vaginae</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Fastidiosipila</i> AY383733.1.1483
	<i>Staphylococcus</i> FJ192551	<i>Fenollaria massiliensis</i>
	<i>Staphylococcus</i> FJ658758	<i>Fenollaria timonensis</i>
	<i>Staphylococcus</i> MH683107.1.1547	<i>Fusobacterium naviforme</i>
	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Gallicola</i> JF108544.1.1350
	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Gemella asaccharolytica</i>
	<i>Streptococcus</i> DQ532335	<i>Gemella</i> JQ446896
	<i>Streptococcus tigurinus</i>	<i>Granulicatella elegans</i>
	<i>Subdoligranulum</i> FJ367368	<i>Granulicatella para-adiacens</i>

	<i>Subdoligranulum</i> GQ479983	<i>Haemophilus</i> AY923117
	<i>Sutterella</i> DQ800936	<i>Haemophilus haemolyticus</i>
	<i>Tessaracoccus</i> JF108565	<i>Halomonas stevensii</i>
	<i>Ureaplasma parvum</i>	<i>Helcococcus massiliensis</i>
	<i>Varibaculum</i> JF171178	<i>Jonquetella anthropi</i>
	<i>Veillonella</i> EU071469	<i>Laceyella</i> CP025943.287967.289473
	<i>Veillonella</i> JQ477347	<i>Lactobacillus</i> AY959084.1.1539
	<i>Veillonella montpellierensis</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
	<i>Vulcaniibacterium</i> GQ158474	<i>Lactobacillus</i> GQ422710
	<i>Vulcaniibacterium</i> KJ127960	<i>Lactobacillus helveticus</i>
	<i>Weeksella</i> LT223570	<i>Lactobacillus ruminis</i>
		<i>Lactococcus garvieae</i>
		<i>Lepisosteus oculatus</i>
		<i>Macrococcus goetzii</i>
		<i>Marmoricola bigeumensis</i>
		<i>Megamonas funiformis</i>
		<i>Megasphaera elsdenii</i>
		<i>Micrococcus luteus</i>
		<i>Mobiluncus</i> JF112895.1.1358
		<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
		<i>Moraxella osloensis</i>
		<i>Murdochiella asaccharolytica</i>
		<i>Mycobacterium iranikum</i>
		<i>Negativicoccus hydrogenalis</i>
		<i>Neisseria flavescens</i>
		<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>
		<i>Nosocomiicoccus</i> HM288334.1.1378
		<i>Nosocomiicoccus</i> LTHD01000006.41.1611
		<i>Olsenella uli</i> DSM 7084
		<i>Oscilibacter massiliensis</i>
		<i>Oscilibacter Oscilibacter massiliensis</i>

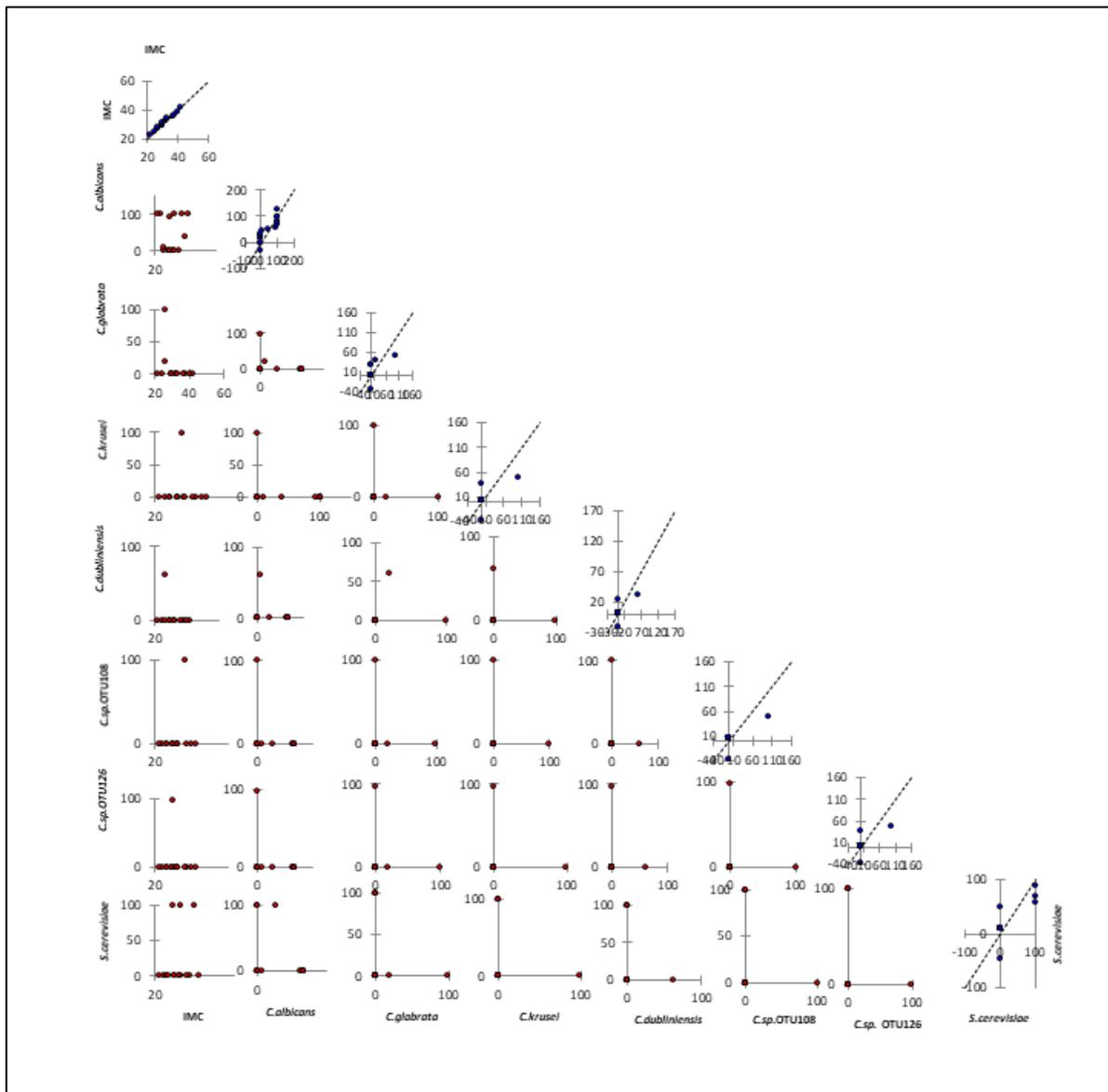
		<i>Parabacteroides distasonis</i>
		<i>Parabacteroides distasonis</i> CL03T12C09
		<i>Parasutterella</i> FJ512393.1.1388
		<i>Parvimonas</i> JQ465325.1.1383
		<i>Parvimonas</i> LSCW01000063.37.1552
		<i>Parvimonas</i> LSDF01000011.85.1597
		<i>Peptococcus niger</i>
		<i>Peptoniphilus coxii</i>
		<i>Peptoniphilus</i> FJ557955.1.1384
		<i>Peptoniphilus</i> FLQT01000003.189534.191041
		<i>Peptoniphilus</i> FLQT01000003.755875.757382
		<i>Peptoniphilus</i> GQ070679.1.1349
		<i>Peptoniphilus grossensis</i>
		<i>Peptoniphilus</i> JF167786.1.1349
		<i>Peptoniphilus</i> JF199668
		<i>Peptoniphilus</i> JF220961.1.1348
		<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>
		<i>Peptoniphilus</i> LSDH01000058.284.1796
		<i>Peptoniphilus</i> LTTA01000044.114.1647
		<i>Peptoniphilus rhinitidis</i>
		<i>Peptoniphilus senegalensis</i>
		<i>Phascolarctobacterium faecium</i>
		<i>Photobacterium</i> EU535703
		<i>Photobacterium</i> JX016943
		<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
		<i>Porphyromonas pasteri</i>
		<i>Prevotella bergensis</i>
		<i>Prevotella corporis</i>
		<i>Prevotella</i> DQ795842

		<i>Prevotella</i> JRNC01000117
		<i>Prevotella</i> 2 DQ795842
		<i>Prevotella bergensis</i>
		<i>Prevotella colorans</i>
		<i>Prevotella</i> GQ156652.1.1446
		<i>Prevotella histicola</i>
		<i>Prevotella</i> JQ187509
		<i>Prevotella</i> KF842343
		<i>Prevotella massilia timonensis</i>
		<i>Prevotella melaninogenica</i>
		<i>Prevotellaceae</i> ge GQ045677.1.1361
		<i>Propionibacterium</i> LT706985.2005634.2007132
		<i>Propionimicrobium lymphophilum</i>
		<i>Pseudoglutamicibacter cumminsii</i>
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Psychrobacter</i> KC002374
		<i>Ralstonia</i> KP189379
		<i>Roseburia intestinalis</i>
		<i>Rothia dentocariosa</i>
		<i>Rothia mucilaginosa</i>
		<i>Ruminiclostridium siraeum</i>
		<i>Ruminococcus bicirculans</i>
		<i>Ruminococcus callidus</i>
		<i>Schaalia radingae</i>
		<i>Streptococcus infantis</i>
		<i>Streptococcus oralis</i>
		<i>Streptococcus parauberis</i> NCFD 2020
		<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>
		<i>Subdoligranulum</i> DQ805841.1.1368
		<i>Sutterella</i> AF371863.1.1466

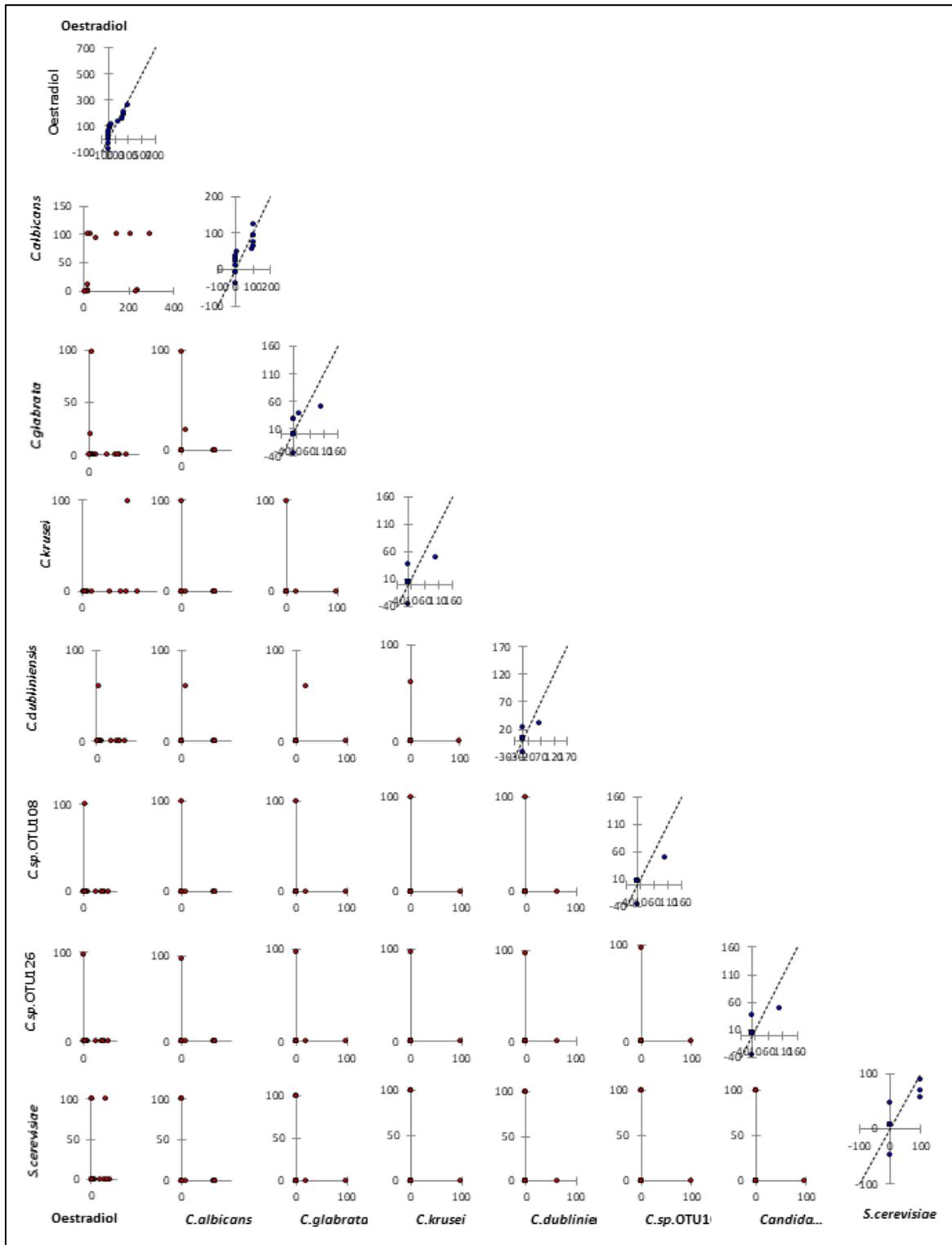
		<i>Sutterella</i> CEBV01021424.69462.70978
		<i>Sutterella</i> HQ810984
		<i>Sutterella</i> HQ810984.1.1453
		<i>Tyzzarella</i> 3 DQ807361.1.1392
		<i>Ureaplasma parvum/ urealyticum</i>
		<i>Urinacoccus massiliensis</i>
		<i>Vaginella massiliensis</i>
		<i>Varibaculum cambriense</i>
		<i>Varibaculum</i> FNWI01000004.1516484.1518004
		<i>Varibaculum</i> JF193522.1.1357
		<i>Veillonella</i> JF233707
		<i>Veillonella seminalis</i>
		<i>Weeksella massiliensis</i>
		<i>Winkia neuii</i>

Espèces fongiques chez les sujets M	M25	M26	M36	M47	M70	M74	M105
<i>Candida albicans</i>	10.51	100.00	0.04	100.00	0.00	0.00	0.00
<i>Candida dubliniensis</i>	61.20	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Candida glabrata</i>	19.86	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
<i>Fusarium incarnatum</i>	6.71	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Fusarium proliferatum</i>	0.92	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Malassezia restricta</i>	0.56	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
<i>Nakaseomyces</i> OTU518	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Candida</i> OTU108	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	99.98
<i>Candida</i> OTU126	0.00	0.00	0.00	0.00	97.26	0.01	0.00
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0.01	0.00	99.96	0.00	0.00	99.87	0.00
<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	2.44	0.00	0.00
Autres	0.02	0.00	0.00	0.00	0.27	0.11	0.02

Annexe 7. La matrice de corrélation a été utilisée pour le diagramme de dispersion et a montré une forme aléatoire sans ligne directrice entre les niveaux d'IMC et l'abondance des espèces fongiques. Le nuage de points bleus a montré la corrélation parfaite pour la même variable.



Annexe 8. La matrice de corrélation a été utilisée pour le diagramme de dispersion et a montré une forme aléatoire sans ligne directrice entre les niveaux d'oestradiol et l'abondance des espèces fongiques. Le nuage de points bleus a montré la corrélation parfaite pour la même variable.



Production Scientifique

Production Scientifique

Publication internationale

Ouarabi, L., Drider, D., Taminau, B. *et al.* Vaginal Microbiota: Age Dynamic and Ethnic Particularities of Algerian Women. *Microbial Ecology* (2020). <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01606-6>

Communication internationale

Ouarabi L, Taminau B, Daube G, Drider D, Bendali F et Lucau-Danila A. Particularités géographiques et dynamiques du microbiote vaginal: cas de femmes Algériennes. 22ème Conférence du Club des bactéries lactiques (CBL 2019). Du 12 au 14 Juin 2019. Caen-Normandie (France).

Communication nationale

Ouarabi L, Taminau B, Daube G, Drider D, Lucau-Danila A et Bendali F. Mise en évidence des particularités de la flore de Doderlein : une voie prometteuse pour un traitement alternatif du déséquilibre du microbiote vaginal. Séminaire national « Alimentation, Santé et Environnement ». Les 25 et 26 septembre 2019. Bejaia (Algérie) (avec le prix de la meilleure communication).



Vaginal Microbiota: Age Dynamic and Ethnic Particularities of Algerian Women

Liza Ouarabi^{1,2} · Djamel Drider² · Bernard Taminiau³ · Georges Daube³ · Farida Bendali¹ · Anca Lucau-Danila²

Received: 8 May 2020 / Accepted: 10 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

The composition of the vaginal microbiota is a key element for maintaining gynecological and reproductive health. With the aim of obtaining an accurate overview of the vaginal microbiota of Algerian women, in terms of their age and ethnic group, we conducted a 16S rRNA gene targeted metagenomic analysis of 100 vaginal samples taken from healthy childbearing and menopausal women. These data were used to establish the pattern of the vaginal microbiota during reproductive and postreproductive phases. Hormone levels were correlated to changes in microbial composition for menopausal women. The ethnic comparison revealed a particular microbiota profile for Algerian women, with a dominance of CST III and CST I. A rapid qPCR method developed by the authors was successfully used to identify the vaginal bacterial pattern for a customized gynecological management.

Keywords Vaginal microbiota · Metagenetics · Menopause · Probiotics · Ethnicity

Introduction

Analyses of high-throughput sequencing have enabled researchers to characterize the composition and variation of species across different microbiota samples and explain the correlations between diseases and microbes and how these microbial species can interact with their host. Because of the crucial role of its different microbiota, human beings have been defined as multi-species individuals [1], in which the sum of the host genome and traits of the microbiome constitute together an evolutionary individual or holobiont [2]. From the different human microbial ecosystems, the vaginal

microbiota accounts for 9% of the total human microbiota [3] and remains under-studied despite its importance for women's health and future generations. The health-promoting effects of the vaginal microbiota are reflected in reproductive fitness of the host through direct and indirect antipathogenic mechanisms. Moreover, the vaginal microbiota exerts a beneficial influence on fertility, conception, and healthy pregnancy and also on infant seeding and prevention of premature birth [4].

Metagenomic analyses revealed the presence of a high proportion of *Firmicutes* and a low percentage of *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, and *Actinobacteria* in the vaginal microbiota [3], which also contain fungi (*Candida* sp., *Pichia kudriavzevii*) and viruses belonging to the *Papillomaviridae*, *Herpesviridae*, *Anelloviridae*, and *Polyomaviridae* families [5–7]. Of note, the fungi were identified in the absence of any pathology [8]. Regarding the bacterial composition, a large body of reports has confirmed the dominance of *Lactobacillus* species in the vaginal microbiota of healthy women [9]. Notably, five community state types (CSTs) were described throughout the world (I–V), the majority of which (types I, II, III, and V) were dominated by one or more species of *Lactobacillus* [10]. The dominance of lactobacilli in the vaginal microbiota has been linked to the production of estrogen and the accumulation of glycogen in the upper layers of the stratified vaginal epithelium [11]. Besides production of lactic acid, the beneficial properties of lactobacilli are associated

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00248-020-01606-6>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Anca Lucau-Danila
anca.lucau@univ-lille.fr

¹ Laboratoire de Microbiologie Appliquée, Faculté des Sciences la Nature et de la Vie, Université de Bejaïa, 06000 Bejaïa, Algeria

² BioEcoAgro N° 1158, Univ. Lille, INRAE, Univ. Liège, UPJV, YNCREA, Univ. Artois, Univ. Littoral Côte d'Opale, ICV, Institut Charles Viollette, F-59000 Lille, France

³ Department of Food Sciences, Microbiology, FARAH, University of Liège, 4000 Liège, Belgium

with (i) production of bacteriocins and hydrogen peroxide as antimicrobial mechanisms, (ii) adherence to vaginal epithelia, and (iii) ability to compete for available nutrients [12].

The vaginal microbial community is in a dynamic equilibrium, in which fluctuations occur in response to hormonal changes during the menstrual cycle, combined with a plethora of disruptive behavioral factors [13]. The menopause is also characterized by a multitude of changes, which affect both the anatomical structure and the microbiota of the lower female reproductive tract [14]. An ethnic variability in the composition of the vaginal microbiota has also been described [10, 15], though so far not fully understood. The host genome may play a major role via the regulation of the innate and adaptive immune systems as well as the composition and quantity of vaginal secretions [16]. The role of the genome in directing the composition of vaginal communities cannot be clearly dissociated from various environmental and cultural factors that are specific to each ethnic group [10].

The study aimed at identifying, for the first time, the particularities of the vaginal microbial ecosystem in healthy Algerian women of childbearing age and also menopausal women. A metagenomic approach based on 16S rRNA gene sequencing was used to register the relative abundance of bacterial operational taxonomic units and thereby identify vaginal community state types (CSTs).

Material and Methods

Study Design and Sample Collection

A cohort of 100 healthy women consulting the gynecology service of a private health care unit in Bejaia city (Algeria) was enrolled in this study. A written informed consent was obtained from all participants in this study. A detailed medical case history related to previous gestational situations, gynecological symptoms, infection status, and antecedent of antibiotic or hormonal therapy was obtained from each participant. Pregnant women, those consulting for vaginal infections or taking hormonal replacement therapy, were all excluded from this study. A group of 50 young women of childbearing age (mean age was 35.1 ± 7.2 years) and another of 50 menopausal women (mean age was 57.7 ± 8.2 years) were retained (Online Resource 1). Vaginal sampling was performed by the gynecologist in charge of the service using a sterile speculum without prior antiseptic cleaning of the exocervix. A swab was inserted into the vagina using a rotational movement to recover a sufficient amount of vaginal secretions in a sterile falcon tube. Samples of the vaginal swab were immediately frozen and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until DNA extraction. In parallel, a blood sample was taken from each participant in order to determine the amount of estradiol.

DNA Extraction

Total DNA from the frozen vaginal swabs was extracted using the QIAamp PowerFecal DNA Kit (Qiagen), following the manufacturer's instructions. DNA amounts were quantified using a BioSpectrometer (Eppendorf), and the DNA quality was checked using a 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Metabarcoding Analysis

The sequencing was carried out at the Faculty of Veterinary Medicine of Liège University (Belgium). For sequencing, the amplification of the V1-V3 region of the 16S rDNA and the library preparation were performed with these primers: direct ($5\text{'-GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'}$) and inverse ($5\text{'-GAGAGTTGGCTCAG-3'}$). Each PCR product was purified with the Agencourt AMPure XP Ball Kit (Beckman Coulter, Pasadena, USA) and subjected to a second round of PCR for indexing, using Nextera XT index 1 and 2 primers. After purification, the PCR products were quantitated using the Quant-IT PicoGreen (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) and diluted to $10\text{ ng}/\mu\text{L}$. A final qPCR quantification of each library sample was performed using the KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KapaBiosystems, Wilmington, USA) before standardization, pooling, and sequencing on a MiSeq sequencer using v3 reagents (ILLUMINA, USA). Data processing was performed using, respectively, the MOTHUR v1.35 package and the UCHIME algorithm for alignment, clustering, and chimera detection. Data obtained from NGS analysis were analyzed for bacterial biodiversity, richness, and evenness. The principal component analysis (PCA) using the FactoMineR package in R version 3.5.2 (r-project.org) and the Venn diagrams platform (<http://bioinfo.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) were used to cross-check the data. Graphical representations were performed using the GraphPad Prism version 8.00 for windows, GraphPad Software.

Quantitative PCR

DNA samples were amplified with species-specific primer sets targeting 16S rDNA fragments (Table 1). The quantitative PCR (qPCR) was carried out in the iCycler iQ real-time PCR detection system (Bio-Rad), in 96-well microplates. Amplifications were carried out in a final volume of $20\text{ }\mu\text{L}$ containing $0.3\text{ }\mu\text{M}$ of each primer, $10\text{ }\mu\text{L}$ qPCR Core Kit for SYBR Green I (Eurogentec), and either $1\text{ }\mu\text{L}$ of DNA or water (no-template control). The thermal cycling conditions were as follows: an initial denaturation step at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min followed by 40 cycles of denaturation at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, primer annealing at $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, extension at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, and a fluorescence acquisition step at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 10 min. DNAs extracted from vaginal samples were amplified in triplicate

Table 1 Primer sequences for qPCR

Specificity	Primer	Sequence 5'-3'	Annealing temperature	Reference
<i>Lactobacillus crispatus</i>	Forward	TCTTGACATCTAGTGCCATTGT	63 °C	[17]
	Reverse	TGCACCACCTGTCTTAGC		
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Forward	ACCTGGGCTTGACATGTGCCT	63 °C	
	Reverse	CATGCACCACCTGTGAACCTG		
<i>Atopobium vaginae</i>	Forward	GGTGAAGCAGTGGAAACACT	62 °C	[18]
	Reverse	ATTCGCTTCTGCTCGCGCA		
<i>Lactobacillus gasseri</i>	Forward	TGGAAACAGRTGCTAATACCG	60 °C	
	Reverse	CAGTTACTACCTATCTTTCTTCACTAC		
<i>Lactobacillus jensenii</i>	Forward	CCTTAAGTCTGGGATACCATT	54 °C	
	Reverse	ACGCCGCTTTTAAACTTCTT		
<i>Lactobacillus iners</i>	Forward	GTCTGCCTTGAAGATCGG	65 °C	
	Reverse	ACAGTTGATAGGCATCATC		
	Reverse	TTCACTGCTCAAAGTAATCATC		
Total bacteria	Forward	ACTCCTACGGGAGGCAG	55 °C	[19]
	Reverse	GTATTACCGCGGCTGCTG		

for each primer set, and the mean values were used for statistical analysis. Data were expressed as nanograms of DNA of the targeted species per microgram of total DNA extracted from the vaginal sample. For each pair of primers, a melting curve was made to verify the specificity of the amplification. The efficiency and threshold cycle (Ct) were calculated with the CFX Manager software (Bio-Rad). Total bacteria is a broad-range primer that identifies the conserved region of the 16S rRNA encoding gene for a wide range of bacteria. Data obtained by this qPCR reaction gives the amount of total bacteria present in the sample. Then, the relative quantification of each target bacterium or group was normalized with the total bacteria content in the sample, by the comparative C(T) method [20]. Data were calculated as $2^{-\Delta C_t}$ means \pm SD.

Statistical Analyses

The analysis of statistical significance was performed by one-way ANOVA and the post hoc Tukey test ($p < 0.05$).

Results

16S rDNA targeted metagenomics analysis was performed in individual vaginal samples of 50 young women of childbearing age (Y) and 50 menopausal women (M) and allowed comparison of the overall bacterial richness and phylogenetic composition of the vaginal microbiota. After sequence processing, a total of 176 different operational taxonomic units (OTUs) were identified in the Y and 413 OTUs in the M dataset, respectively. All sequences can be found at the US-National

Center for Biotechnology Information (NCBI) BioProject repository (PRJNA630844).

Microbial Diversity

The average number of OTUs was about 429 which is of the same order of magnitude as other studies of vaginal microbiota [21]. The Shannon Index (SI) indicated a significant increase of the alpha-diversity for M group with a $p < 0.0001$ (Fig. 1). The PCA of the beta-diversity in the vaginal microbiota composition revealed also an important increase of the taxon diversity for M subjects (Fig. 2).

Microbial Characteristics and Community State Types

The community composition of each sample, representing the bacterial phyla, genus, and species level ranking for major OTU, is depicted in Figs. 3 and 4 and Online Resource 2. The most abundant phyla across all young subjects were *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, and *Fusobacteria*. The relative abundance of these phyla appeared to change for menopausal women, where *Firmicutes* abundance has significantly diminished (83.04% in Y vs 69.36% in M subjects, $p < 0.01$), whereas abundance has increased for *Actinobacteria* (10.04% in Y vs 18.19% in M subjects) (Online Resource 3). Of note, two other phyla containing mainly pathogenic bacteria, *Proteobacteria* and *Tenericutes*, became more important in microbiota of menopausal women (Fig. 3a) and passed in average from 0.07% and 0.05% in Y to 4.92% and 1.27% in M subjects, respectively ($p > 0.9$). This tendency was confirmed at the genus level where the decrease of *Firmicutes* abundance was reflected in lactobacilli

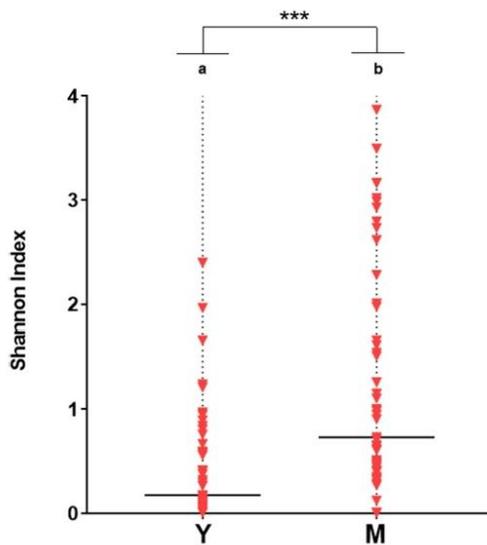


Fig. 1 Shannon Index of bacterial diversity of vaginal microbiota in young (Y) and menopausal (M) women. M subjects presented a significantly increased diversity compared with Y subjects. Significant differences are indicated with letters (a, b); triple asterisks indicate $p < 0.0001$

dynamics. *Lactobacillus* was the upmost representative genus in vaginal microbiota of Y subjects representing 82.45% and only 47.32% for M subjects ($p < 0.0001$) (Fig. 3b). Other genera belonging to *Actinobacteria* such as *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, and *Corynebacterium* increased from 0.02%, 3.32%, and 0.22% in Y to 2.96%, 4.59%, and 2.56% in M subjects, respectively. Likewise, *Mycoplasma* and *Ureaplasma* belonging to *Tenericutes* increased significantly

($p > 0.9$) in abundance, from 0.01% and 0.04% in Y to 1.06% and 0.27% in M subjects respectively. Nevertheless, *Pseudomonas* belonging to *Proteobacteria* appeared only in M subjects (1.86%). Species abundance revealed a more detailed profile of individual microbiota when CSTs were clearly identified (Fig. 4). For Y subjects, 34% were found to belong to CST I dominated by *Lb. crispatus*, 8% to CST II, dominated by *Lb. gasseri*, 38% to CST III dominated by *Lb. iners*, 18% to CST IV dominated by anaerobes (such as *Atopobium vaginae*, *Prevotella* sp., and *Sneathia amnii*), and only 2% to CST V, dominated by *Lb. jensenii*. For M subjects, 20% presented a CST I profile, 2% CST II, 24% CST III, and the majority (54%) a CST IV profile.

All these variations and statistical meanings are represented for different taxonomic levels (phylum, genera, species) by comparing young and menopausal women (Fig. 5).

qPCR Method for CST Identification

The abundance of the main species in each CST was checked by the qPCR technique. Thus, a specific amplification was performed for *Lb. crispatus* (that is dominant in CST I), *Lb. gasseri* (dominant in CST II), *Lb. iners* (dominant in CST III), *Lb. jensenii* (dominant in CST V), *Atopobium vaginae*, and *Gardnerella vaginalis* (the most representative for the CST IV). The resulting qPCR data were in good agreement with the metagenomic analysis and confirmed the dominant taxon for each CST (Fig. 6).

Discussion

This study was conducted to analyze the composition of the vaginal microbiota of a cohort of 100 Algerian

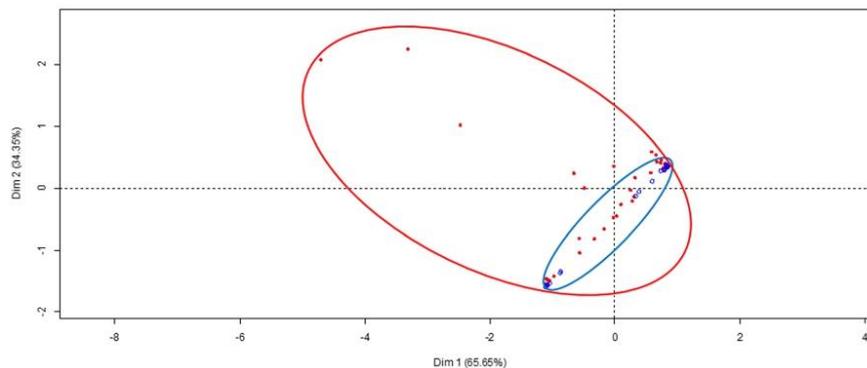


Fig. 2 Principal component analysis of the vaginal microbiota collected from young (Y) and menopausal (M) women ($n = 50$ per group). The two sets of samples are not similar as the Y subjects (blue circle) present a restrained taxon diversity comparing with M subjects (red circle)

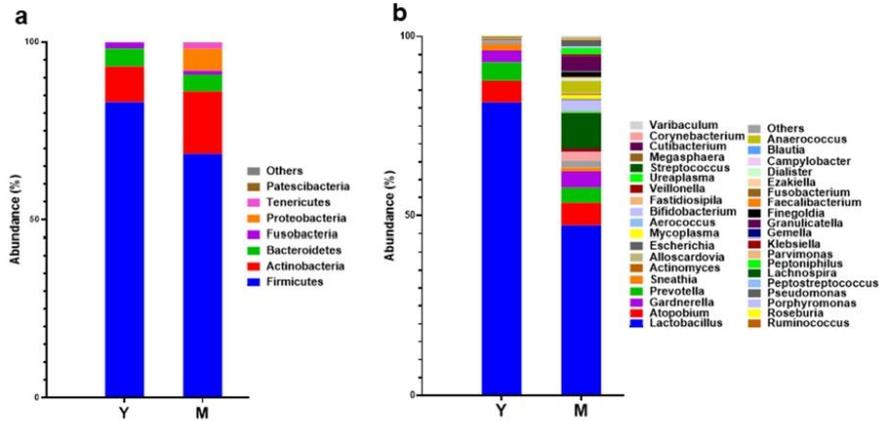


Fig. 3 Relative abundance of bacterial phyla (a) and genera (b) in the vaginal microbiota. Y, young women; M, menopausal women

women, 50 of whom were of reproductive age and 50 at the confirmed menopause period. An analysis of the dynamics of this composition was carried out to intercept age-related changes, and an assessment of the ethnic specificity of this composition was discussed.

Age Dynamics of Vaginal Microbiota

According to Gajer et al. [22], the stability of the vaginal microbiome is not necessarily expressed by changes in taxa composition, but rather by CST consistency. Then, it has been

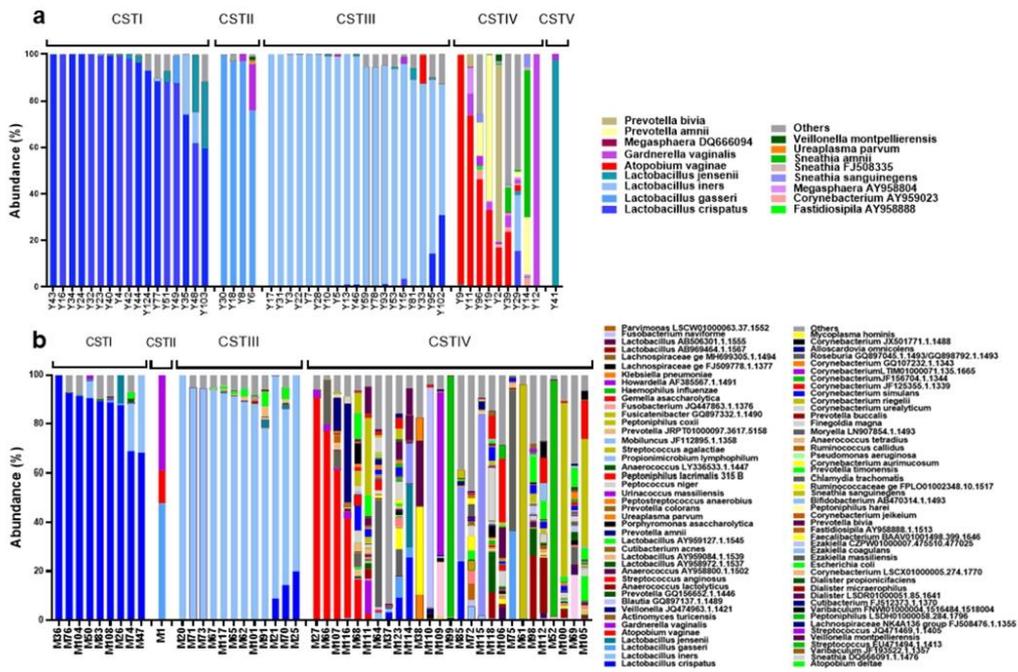


Fig. 4 Relative abundance of bacterial species in the vaginal microbiota of young (a) and menopausal (b) women. Y, young women; M, menopausal women. CST profiles are indicated above

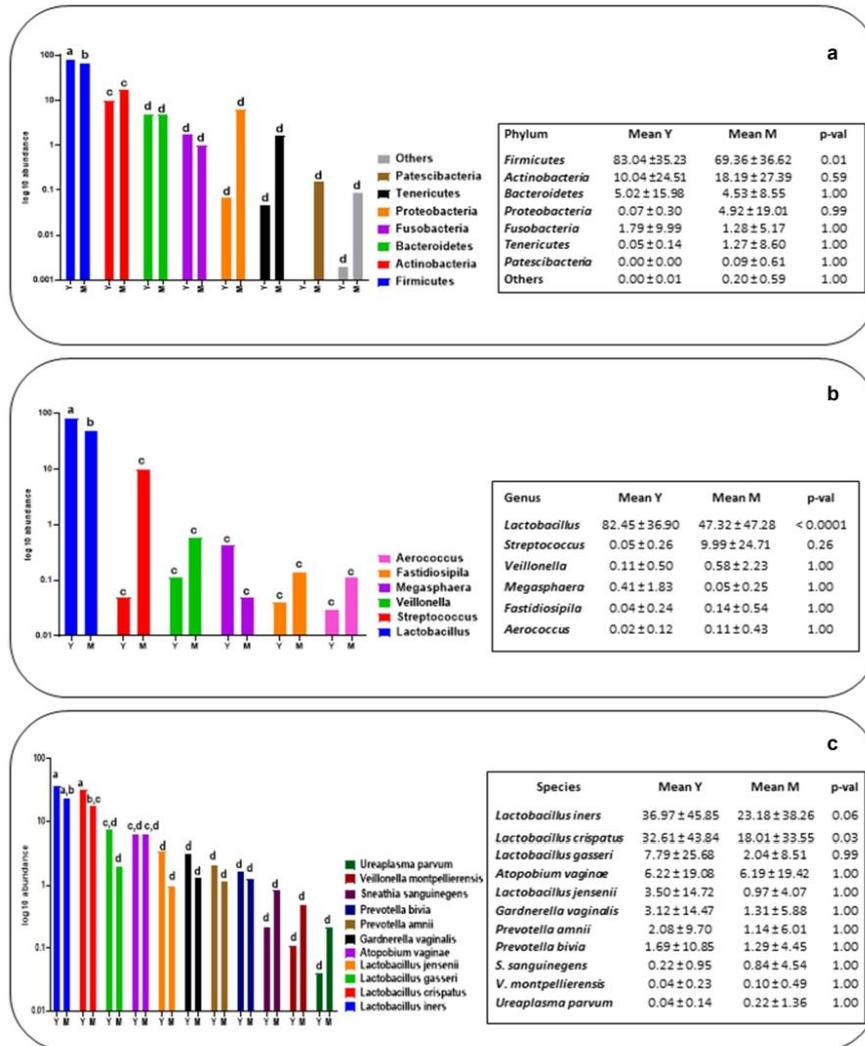


Fig. 5 Variations in taxa abundances. Significant differences in abundance were observed at phylum level (a) for only *Firmicutes*, at genera level (b) for only *Lactobacillus* and at species level (c) for *Lactobacillus crispatus*. Means of relative abundances are represented

for young (Y) and menopausal (M) women. Means without a common letter are different ($p < 0.05$) using one-way ANOVA with Tukey's test for pairwise comparisons

suggested that the vaginal microbiota changes from one CST to another in response to the modifications brought about by the transition to menopause. Although the longitudinal follow-up was not possible for this study, it is important to point out the dramatic change in the CST pattern observed in menopausal women, suggesting that all CST profiles changed in their composition as 70% of CST I, 75% of CST II, or 36% of CST III are

modified towards the anaerobe dominated CST IV, whose abundance increased from 18% in Y subjects to 54% in M subjects.

All physiological, medical, or historical parameters collected from participants were analyzed with the aim to explain these changes. Of note, only estrogen levels were found to be correlated with microbial fluctuations across the age groups. Thus, all menopausal women were characterized by a dramatic decrease in

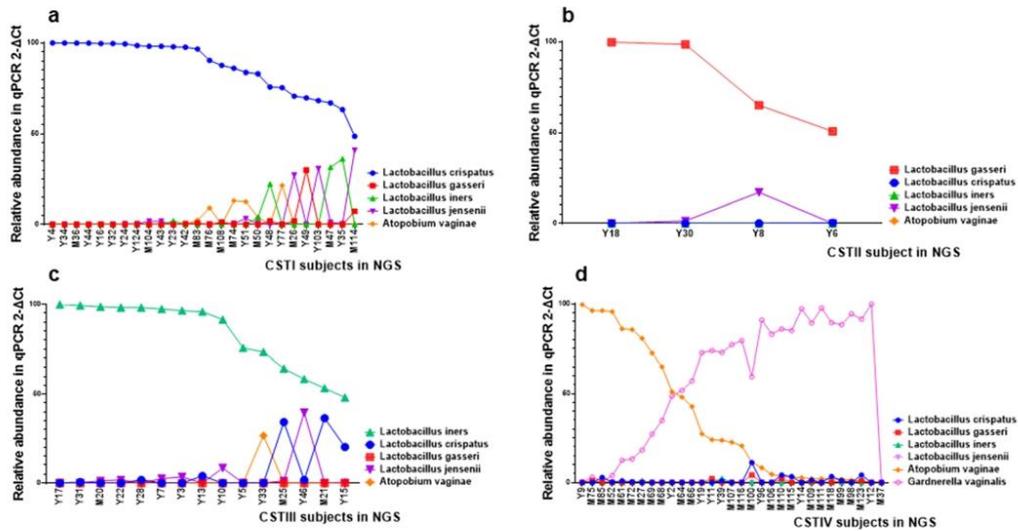


Fig. 6 Rapid qPCR method for CST identification. Relative abundance of six bacterial taxons in vaginal swab of young (Y) and menopausal (M) women were calculated by qPCR assay for each CST detected by NGS.

The dominant taxon confirmed the same major abundance for 96.3% of subjects with CST I (a), 80% of subjects with CST II (b), 50% of subjects with CST III (c), and 88.5% of subjects with CST IV (d)

estrogen levels (29 ± 40 pg/mL) compared with young women (126 ± 95 pg/mL) (Online Resource 3). It has also been reported that changes in the vaginal microbiota composition were associated with the noticeable hormonal shifts taking place throughout a woman's life. With menopause, estrogen levels and the glycogen content in the vaginal epithelium decreased significantly, thereby causing a decrease in lactobacilli prevalence [23]. Thus, this hypoestrogenism related to menopause must have induced a decline of glycogen level on the vaginal epithelium [24]. As glycogen is the preferred substrate for lactobacilli, the first consequence is a significant decrease in numbers of all lactobacilli, with a direct impact on CST composition. This situation was already observed in menopausal women where a decrease of lactobacilli, caused a vaginal pH enhancement, and only 39 to 55% of menopausal women carried a *Lactobacillus*-dominant vaginal microbial community [25]. Concerning individual estrogen variations, no correlation with the microbiota composition has been observed. This is in accord with the sampling realized at approximately the same time of the reproductive cycle in Y subjects. Other previously reported studies showed that the different fluctuations in vaginal microbiota composition during estrous cycle did not, overall, change the CST profiles [22, 26, 27].

Taking into account all these observations, we can consider that the vaginal microbiome of Algerian women keeps a normal dynamic with age. Nevertheless, this age-dependent imbalance in the vaginal microbiota is known as a risk-factor for vaginal infections in postmenopausal women. To estimate the

risks for bacterial vaginosis (BV) for Algerian postmenopausal women, a comparison of CST profiles and a qualitative comparison of the microbiota composition were performed on Y and M subjects (Fig. 7; Online Resource 4). Lactobacilli dominated CST (I, II, III, and V), either diminished or disappeared in M subjects (Fig. 7a), and sixteen species seem completely lost in menopausal women (Fig. 7b). These included *Actinomyces naeslundii*, identified as an antagonist of *Candida albicans* with protective effect against mycosis [27], and *Carnobacterium maltaromaticum* that is also a beneficial bacterium used in the dairy industry for lactic acid and bacteriocin production [28]. On the other hand, the rate of anaerobe-dominated CST IV increased in M subjects (Fig. 7a) and 253 new species occupied the vaginal microbiome of menopausal women (Fig. 7b). Of note, *Prevotella*, *Dialister*, or *Bacteroides* species were reported to be involved in bacterial vaginosis [29, 30], and *Actinomyces* species can lead to actinomycosis [31]. A new equilibrium may operate in the vaginal microbiota of menopausal women due to hormonal changes. Nevertheless, the risk of vaginosis remains considerably increased in menopausal women [32]. In our work, the clinical case history of 5 postmenopausal subjects presenting the CST IV profile (M111, M109, M106, M118, and M69) also suggested this risk (Online Resource 1). For a personalized monitoring of CST profile evolution, especially in menopausal transition period, the qPCR method could be very useful as a rapid method of detection of the CST in a vaginal swab.

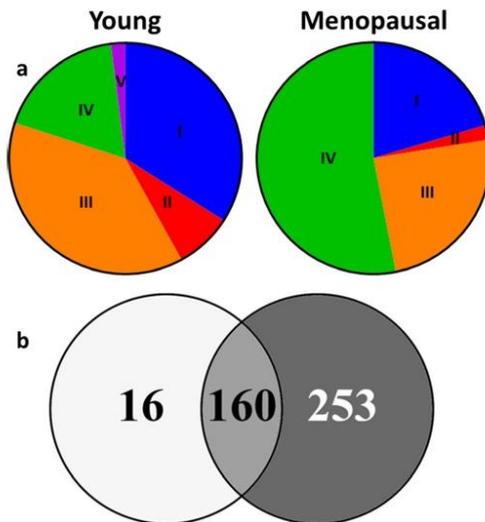


Fig. 7 Age dynamics of vaginal microbiota. **a** CST ratio in young and menopausal women (I-IV). **b** Venn diagram representing the number of species found in young (white circle) and menopausal women (black circle)

Ethnic Framework

To determine the vaginal microbiota profiles of Algerian women, in an ethnic context, we compared the CST patterns of the Y subjects with the results of similar studies carried out in different parts of the world such as a large North American cohort comprising four ethnic groups (Caucasian, African, Hispanic, and Asian) [10], as well as with cohorts of Nigerian [33], British [34], Dutch, Turkish, and Moroccan women [15] (Online Resource 5). Interestingly, regardless of the geographical relocation of the women, the ethnic particularities of the CST composition are maintained. The CST I was predominant for Caucasian groups, CST IV for African and Hispanic, and CST III for Asian, Turkish, and Moroccan cohorts. Turkish and Moroccan groups stand out also for their high proportion of CST II and V. Algerian group presented the CST III (38%) and CST I (34%) as major groups, followed by CST IV (18%), CST II (8%), and CST V (2%) (Fig. 8). The reasons for these differences within ethnic groups are unknown and possibly can be linked to genetic differences such as their innate and adaptive immune systems [35], the composition and quantity of their vaginal secretions, and ligands on epithelial cell surfaces [10]. These factors certainly shape vaginal communities, but in addition, human habits and practices, including personal hygiene, birth methods, and sexual behaviors, can also exert strong influences [36].

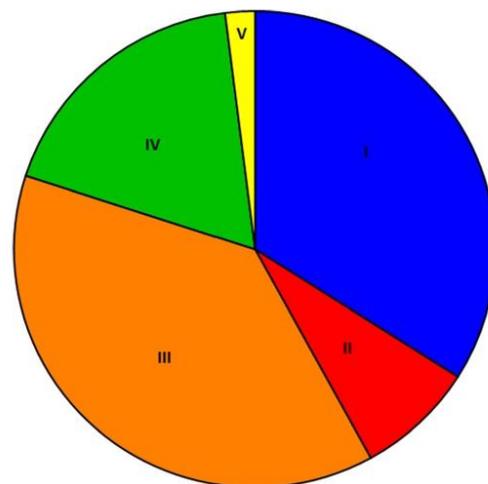


Fig. 8 Algerian CST profiles. For a cohort of 50 women in reproductive age, the CST III and CST I were found the major groups in vaginal microbiota (38 and 34%, respectively), followed by CST IV (18%), CST II (8%), and CST V (10%)

Conclusion

In this study, we have examined for the first time an Algerian cohort of 50 young women of childbearing age and 50 menopausal women by performing a 16S rRNA gene targeted metagenomic analysis of the individual vaginal microbiota. The bacterial composition and CSTs were identified for these two healthy states, and a normal age dynamic was observed. The transition from childbearing to menopausal status was accompanied by an increasing of the anaerobe community that became dominant and was estimated to be 3 times more important. Hormonal changes were correlated with low lactobacilli abundance. These changes predispose menopausal women to BV, which is why we developed the monitoring system of CST profile evolution by a rapid qPCR method reported here. The ethnic comparison revealed a particular microbiota profile for Algerian women, with a dominance of CST III and CST I, and this finding should be taken into consideration for different diagnostics, clinical investigations, or treatments.

Acknowledgments Liza Ouarabi received a PhD scholar fellowship from the Algerian-French governments through the PROFAS program. The authors thank Dr. Brahim Ouarabi for kindly providing samples used in this study. Similarly, the authors thank Dr. Rabia Ladjouzi for his assistance with the qPCR assessment. The authors are indebted to Dr. S. W. Elson for critical reading and English improvement of the manuscript.

Funding The Région des Hauts-de-France provided the Alibiotech CPER/FEDER 2016-2021 grant, which was partly used here for the metagenomic analyses.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest The authors declare that there is no conflict of interest.

References

- Bourrat P, Griffiths PE (2018) Multispecies individuals. *Hist Philos Life Sci* 40:33. <https://doi.org/10.1007/s40656-018-0194-1>
- Suárez J (2020) The stability of traits conception of the hologenome: an evolutionary account of holobiont individuality. *Hist Philos Life Sci* 42:11. <https://doi.org/10.1007/s40656-020-00305-2>
- Haldar S, Kapil A, Sood S, Sengupta S (2016) Female reproductive tract microbiome in gynecological health and problems. <https://doi.org/10.1016/j.jrhm.2016.11.007>
- Younes JA, Lievens E, Hummelen R, van der Westen R, Reid G, Petrova MI (2018) Women and their microbes: the unexpected friendship. *Trends Microbiol*. 26:16–32. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.07.008>
- Tumbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, Sogin ML, Jones WJ, Roe BA, Affourtit JP, Egholm M, Henrissat B, Heath AC, Knight R, Gordon JI (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457:480–484. <https://doi.org/10.1038/nature07540>
- Zárate S, Taboada B, Yocupicio-Monroy M, Arias CF (2017) Human virome. *Arch. Med. Res.* 48:701–716. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2018.01.005>
- Wylie KM, Wylie TN, Cahill AG et al (2018) The vaginal eukaryotic DNA virome and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 219:189. e1–189.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2018.04.048>
- Limon JJ, Skalski JH, Underhill DM (2017) Commensal fungi in health and disease. *Cell Host Microbe* 22:156–165. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.002>
- Anahtar MN, Gootenberg DB, Mitchell CM, Kwon DS (2018) Cervicovaginal microbiota and reproductive health: the virtue of simplicity. *Cell Host Microbe* 23:159–168. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.01.013>
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tackett CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Fomey LJ (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108(Suppl 1):4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>
- Amabebe E, Anumba DOC (2018) The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* 5. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00181>
- Kroon SJ, Ravel J, Huston WM (2018) Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. *Fertil. Steril.* 110:327–336. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.036>
- Hickey RJ, Zhou X, Pierson JD, Ravel J, Forney LJ (2012) Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. *Transl. Res.* 160:267–282. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.02.008>
- Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM (2016) Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas* 91:42–50. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.05.015>
- Borgdorff H, van der Veer C, van Houdt R, Alberts CJ, de Vries HJ, Bruisten SM, Snijder MB, Prins M, Geerlings SE, Schim van der Loeff MF, van de Wijgert JHHM (2017) The association between ethnicity and vaginal microbiota composition in Amsterdam, the Netherlands. *PLoS One* 12:e0181135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181135>
- Sanglard LP, Schmitz-Esser S, Gray KA, Linhares DCL, Yeoman CJ, Dekkers JCM, Niederwerder MC, Serão NVL (2020) Investigating the relationship between vaginal microbiota and host genetics and their impact on immune response and farrowing traits in commercial gilts. *J. Anim. Breed. Genet.* 137:84–102. <https://doi.org/10.1111/jbg.12456>
- Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM (2009) Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 47:721–726. <https://doi.org/10.1128/JCM.01384-08>
- De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H et al (2007) Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. *BMC Microbiol.* 7:115. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-115>
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1919–1925
- Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3:1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Freitas AC, Bocking A, Hill JE, Money DM, VOGUE Research Group (2018) Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. *Microbiome* 6(1):117. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0502-8>
- Gajer P, Brotman RM, Bai G et al (2012) Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science Translational Medicine* 4:132ra52. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003605>
- Huang B, Fettweis JM, Brooks JP, Jefferson KK, Buck GA (2014) The changing landscape of the vaginal microbiome. *Clin. Lab. Med.* 34:747–761. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2014.08.006>
- Leckie KJ (2010) What is the evidence for the role of oestrogen in the prevention of recurrent urinary tract infections in postmenopausal women? An evidence-based review. *Journal of Clinical Gerontology and Geriatrics* 1:31–35. <https://doi.org/10.1016/j.jcgg.2010.10.008>
- Mitchell CM, Waetjen LE (2018) Genitourinary changes with aging. *Obstet. Gynecol. Clin. N. Am.* 45:737–750. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2018.07.010>
- Chaban B, Links MG, Jayaprakash TP, Wagner EC, Bourque DK, Lohn Z, Albert AYK, van Schalkwyk J, Reid G, Hemmingsen SM, Hill JE, Money DM (2014) Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome* 2:23. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-23>
- Bradley F, Birse K, Hasselrot K, Noël-Romas L, Introini A, Wefer H, Seifert M, Engstrand L, Tjemplund A, Broliden K, Burgener AD (2018) The vaginal microbiome amplifies sex hormone-associated cyclic changes in cervicovaginal inflammation and epithelial barrier disruption. *Am. J. Reprod. Immunol.* 80:e12863. <https://doi.org/10.1111/aji.12863>
- Mohamad NAH, Arzmi MH, Othman N (2019) Genome comparison of *Actinomyces naeslundii* with known probiotics. *IJUM Medical Journal Malaysia* 18 (2). <https://journals.ijum.edu.my/kom/index.php/ijm/article/view/642>
- Afzal MI, Jacquet T, Delaunay S, Borges F, Millière JB, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C (2010) Carnobacterium maltaromaticum: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiol.* 27:573–579. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.019>
- Rampersaud R, Randis TM, Ratner AJ (2012) Microbiota of the upper and lower genital tract. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 17:51–57. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.08.006>

31. Diop K, Dufour J-C, Levasseur A, Fenollar F (2019) Exhaustive repertoire of human vaginal microbiota. *Human Microbiome Journal* 11:100051. <https://doi.org/10.1016/j.humic.2018.11.002>
32. van de Wijgert JH, Jaspers V (2016) Incorporating microbiota data into epidemiologic models: examples from vaginal microbiota research. *Ann. Epidemiol.* 26:360–365. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2016.03.004>
33. Dareng EO, Ma B, Famooto AO et al (2016) Prevalent high-risk HPV infection and vaginal microbiota in Nigerian women. *Epidemiol. Infect.* 144:123–137. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000965>
34. MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS et al (2015) The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci. Rep.* 5:1–9. <https://doi.org/10.1038/srep08988>
35. Si J, You HJ, Yu J, Sung J, Ko GP (2017) *Prevotella* as a hub for vaginal microbiota under the influence of host genetics and their association with obesity. *Cell Host Microbe* 21:97–105. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.11.010>
36. Schwebke JR (2009) New concepts in the etiology of bacterial vaginosis. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 11:143–147. <https://doi.org/10.1007/s11908-009-0021-7>

Résumé

Cette étude est la première dans son genre en Algérie. Elle a pour principal objectif la mise en évidence de la particularité de l'écosystème microbien vaginal chez les femmes algériennes saines, en âge de procréer et ménopausées. Elle a été réalisée sur une centaine d'échantillons vaginaux fournis par le service de gynécologie d'un établissement hospitalier privé (Bejaia, Algérie). Pour chaque femme, un examen clinique, un prélèvement vaginal et un dosage d'œstradiol ont été effectués. La composition microbienne a été déterminée par une analyse métagénomique ciblée des régions V1-V3 de l'ADNr 16S (bactéries) et des ITS1-ITS2 de l'ADNr 5,8 S (levures). Les résultats du séquençage d'Illumina ont été confirmés par qPCR. Un profil spécifique de la composition et de la dynamique du microbiote des femmes algériennes interrogées a été établi en type d'état communautaire (CST) basé sur les espèces dominantes de *Lactobacillus*. La composition des levures vaginales a également été abordée pendant la vie fertile et la ménopause. Toutes les données concernant les paramètres physiologiques des femmes ont été exploitées afin de voir le lien possible entre ces derniers et la composition du microbiote ou du mycobiote vaginal. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les fluctuations hormonales, l'indice de masse corporelle et la composition microbienne de cette niche. Connaître la composition des communautés vaginales stables en état homéostatique est devenu un objectif médical principal pour les femmes algériennes. Des probiotiques personnalisés ainsi que des analyses d'exposome personnalisées pourraient être proposés pour une meilleure prise en charge de la dysbiose vaginale ou de la gêne à la ménopause.

Mots clés : microbiote vaginal, mycobiote vaginal, métagénomique, *Lactobacillus*, qPCR, CST.

Abstract

This study is the first of its kind in Algeria. Its main objective is to highlight the particularity of the vaginal microbial ecosystem in healthy Algerian women of childbearing age and in the menopause. It was carried out on a hundred vaginal samples provided by the gynaecology department of a private hospital establishment (Bejaia, Algeria). For each woman, a clinical examination, a vaginal sampling and a quantification of oestradiol were performed. Microbial composition was determined by targeted metagenomic analysis of the V1-V3 regions of the 16S rDNA (bacteria) and STI1-STI2 of the 5.8S rDNA (yeasts). Illumina sequencing results were confirmed by qPCR. A specific profile of the composition and dynamics of the microbiota of the Algerian interviewed women was established in Community State Type (CST) based on the dominant *Lactobacillus* species. The composition of vaginal yeasts was also addressed during fertile life and menopause. All data concerning the physiological parameters of women were exploited to see the possible link between these and the composition of the vaginal microbiota or mycobiota. No correlation could be established between hormonal fluctuations, body mass index and the microbial composition of this niche. Knowing the composition of stable vaginal communities in a homeostatic state has become a primary medical objective for Algerian women. Personalised probiotics as well as personalised exposome analyses could be proposed for a better management of vaginal dysbiosis or menopausal discomfort.

Key words: vaginal microbiota, vaginal mycobiota, metagenomics, *Lactobacillus*, qPCR, CST.

ملخص

هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في الجزائر. هدفها الرئيسي هو تسليط الضوء على خصوصية النظام البيئي الميكروبي المهبل في النساء الجزائريات الأصحاء في سن الإنجاب وفي سن اليأس. تم إجراء هذا البحث لأول مرة في الجزائر على مائة عينة مهبلية لنساء قدمها قسم أمراض النساء في مستشفى خاص (بجاية ، الجزائر). تم إجراء فحص سريري لكل شخص وعينة مهبلية واختبار V1- استراديول. تم تحديد التركيب الميكروبي من خلال التحليل الميتاجينومي المستهدف لمناطق (الخمائر). تم تأكيد نتائج S rDNA من 5.8 STII-STI2 (البكتيريا) و S rDNA من 16 V3 تم إنشاء ملف تعريف محدد لتكوين وديناميكيات الكائنات qPCR بواسطة Illumina تسلسل بناءً على (CST) الحية الدقيقة للنساء الجزائريات اللواتي تمت مقابلتهم في نوع الدولة المجتمعية السائدة. كما تم تناول تكوين الخمائر المهبلية خلال فترة الخصوبة *Lactobacillus* أنواع وانقطاع الطمث. تم استغلال جميع البيانات المتعلقة بالمعلومات الفسيولوجية للنساء لمعرفة الصلة المحتملة بين هذه وتكوين الكائنات الحية الدقيقة المهبلية أو الفطريات. لا يمكن إنشاء علاقة بين التقلبات الهرمونية ومؤشر كتلة الجسم والتركيب الميكروبي لهذا المكانة. أصبحت معرفة تكوين المجتمعات المهبلية المستقرة في حالة التماثل الساكن هدفاً طبيياً أساسياً للمرأة الجزائرية. يمكن اقتراح البروبيوتيك المخصص بالإضافة إلى تحاليلات العرض الشخصية لتحسين إدارة دسباقتريوز المهبل أو الانزعاج بعد انقطاع الطمث

الكلمات الأساسية: العصيات اللبنية, CST, qPCR, الجراثيم المهبلية ، الفطريات المهبلية ، الميتاجينومات

Résumé

Cette étude est la première dans son genre en Algérie. Elle a pour principal objectif la mise en évidence de la particularité de l'écosystème microbien vaginal chez les femmes algériennes saines, en âge de procréer et ménopausées. Elle a été réalisée sur une centaine d'échantillons vaginaux fournis par le service de gynécologie d'un établissement hospitalier privé (Bejaia, Algérie). Pour chaque femme, un examen clinique, un prélèvement vaginal et un dosage d'œstradiol ont été effectués. La composition microbienne a été déterminée par une analyse métagénomique ciblée des régions V1-V3 de l'ADNr 16S (bactéries) et des ITS1-ITS2 de l'ADNr 5,8 S (levures). Les résultats du séquençage d'Illumina ont été confirmés par qPCR. Un profil spécifique de la composition et de la dynamique du microbiote des femmes algériennes interrogées a été établi en type d'état communautaire (CST) basé sur les espèces dominantes de *Lactobacillus*. La composition des levures vaginales a également été abordée pendant la vie fertile et la ménopause. Toutes les données concernant les paramètres physiologiques des femmes ont été exploitées afin de voir le lien possible entre ces derniers et la composition du microbiote ou du mycobiote vaginal. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les fluctuations hormonales, l'indice de masse corporelle et la composition microbienne de cette niche. Connaître la composition des communautés vaginales stables en état homéostatique est devenu un objectif médical principal pour les femmes algériennes. Des probiotiques personnalisés ainsi que des analyses d'exposome personnalisées pourraient être proposés pour une meilleure prise en charge de la dysbiose vaginale ou de la gêne à la ménopause.

Mots clés : microbiote vaginal, mycobiote vaginal, métagénomique, *Lactobacillus*, qPCR, CST.

Abstract

This study is the first of its kind in Algeria. Its main objective is to highlight the particularity of the vaginal microbial ecosystem in healthy Algerian women of childbearing age and in the menopause. It was carried out on a hundred vaginal samples provided by the gynaecology department of a private hospital establishment (Bejaia, Algeria). For each woman, a clinical examination, a vaginal sampling and a quantification of œstradiol were performed. Microbial composition was determined by targeted metagenomic analysis of the V1-V3 regions of the 16S rDNA (bacteria) and STI1-STI2 of the 5.8S rDNA (yeasts). Illumina sequencing results were confirmed by qPCR. A specific profile of the composition and dynamics of the microbiota of the Algerian interviewed women was established in Community State Type (CST) based on the dominant *Lactobacillus* species. The composition of vaginal yeasts was also addressed during fertile life and menopause. All data concerning the physiological parameters of women were exploited to see the possible link between these and the composition of the vaginal microbiota or mycobiota. No correlation could be established between hormonal fluctuations, body mass index and the microbial composition of this niche. Knowing the composition of stable vaginal communities in a homeostatic state has become a primary medical objective for Algerian women. Personalised probiotics as well as personalised exposome analyses could be proposed for a better management of vaginal dysbiosis or menopausal discomfort.

Key words: vaginal microbiota, vaginal mycobiota, metagenomics, *Lactobacillus*, qPCR, CST.

ملخص

هذه الدراسة هي الأولى من نوعها في الجزائر. هدفها الرئيسي هو تسليط الضوء على خصوصية النظام البيئي الميكروبي المهبلية في النساء الجزائريات الأصحاء في سن الإنجاب وفي سن اليأس. تم إجراء هذا البحث لأول مرة في الجزائر على مائة عينة مهبلية لنساء قدمها قسم أمراض النساء في مستشفى خاص (بجاية ، الجزائر). تم إجراء فحص سريري لكل شخص وعينة مهبلية واختبار استراديول. تم تحديد التركيب الميكروبي من خلال التحليل الميتاجينومي المستهدف لمناطق V1-V3 من 16S rDNA و STI1-STI2 من 5.8S rDNA (البكتيريا) و ITS1-ITS2 من 5.8S rDNA (الخمائر). تم تأكيد نتائج تسلسل Illumina (الخمائر) بواسطة qPCR. تم إنشاء ملف تعريف *Lactobacillus* بناءً على أنواع (CST) محدد لتكوين وديناميكيات الكائنات الحية الدقيقة للنساء الجزائريات اللواتي تمت مقابلتهن في نوع الدولة المجتمعية السائدة. كما تم تناول تكوين الخمائر المهبلية خلال فترة الخصوبة وانقطاع الطمث. تم استغلال جميع البيانات المتعلقة بالمعلومات الفسيولوجية للنساء لمعرفة الصلة المحتملة بين هذه وتكوين الكائنات الحية الدقيقة المهبلية أو الفطريات. لا يمكن إنشاء علاقة بين التقلبات الهرمونية ومؤشر كتلة الجسم والتركيب الميكروبي لهذا المكانة. أصبحت معرفة تكوين المجتمعات المهبلية المستقرة في حالة التماثل الساكن هدفًا طبيًا أساسيًا للمرأة الجزائرية. يمكن اقتراح البروبيوتيك المخصص بالإضافة إلى تحليلات العرض الشخصية لتحسين إدارة دسباقتريوز المهبل أو الانزعاج بعد انقطاع الطمث

الكلمات الأساسية: العصبية اللبنيّة ، CST ، qPCR الجراثيم المهبلية ، الفطريات المهبلية ، الميتاجينوميات