



**HAL**  
open science

# Composition et dynamique du microbiote vaginal : facteurs associés et rôle dans l'infection par *Chlamydia* *trachomatis*

Jeanne Tamarelle

► **To cite this version:**

Jeanne Tamarelle. Composition et dynamique du microbiote vaginal : facteurs associés et rôle dans l'infection par *Chlamydia trachomatis*. Santé publique et épidémiologie. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLV097 . tel-02614316

**HAL Id: tel-02614316**

**<https://theses.hal.science/tel-02614316v1>**

Submitted on 20 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Composition et dynamique du microbiote vaginal : facteurs associés et rôle dans l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale n°570 de Santé Publique (EDSP)  
Spécialité de doctorat : Santé Publique - Epidémiologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 18 Décembre 2019, par

**JEANNE TAMARELLE**

Composition du Jury :

Pilar Francino PU, CSISP	Rapportrice
Rodolphe Thiébaud PU-PH, UB	Rapporteur
Laurence Meyer PU-PH, UPSUD	Présidente
Olivia Peuchant MCU-PH, UB	Examinatrice
Elisabeth Menu DR, CEA/UPS	Invitée
Elisabeth Delarocque-Astagneau PU-PH, UVSQ	Directrice de thèse
Jacques Ravel PU, UMB	Co-directeur de thèse



NNT : 2019SACLV097

## Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

préparée à  
l'Université de Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines

École doctorale 570 de Santé Publique  
Spécialité Santé Publique - Epidémiologie

Présentée par

Jeanne Tamarelle

# Composition et dynamique du microbiote vaginal : facteurs associés et rôle dans l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Thèse dirigée par Elisabeth Delarocque-Astagneau et Jacques Ravel

préparée au sein de l'unité Biostatistique, Biomathématique, Pharmacopidémiologie et Maladies  
Infectieuses

UMR1181 Inserm, UVSQ, Institut Pasteur

Soutenue publiquement à l'Institut Pasteur le 18 Décembre 2019

devant le jury composé de :

Mme. Pilar Francino	PU	CSISP	Rapportrice
M. Rodolphe Thiébaud	PU-PH	UB	Rapporteur
Mme. Laurence Meyer	PU-PH	UPSUD	Examinatrice (Présidente)
Mme. Olivia Peuchant	MCU-PH	UB	Examinatrice
Mme. Elisabeth Menu	DR	CEA/UPS	Invitée
Mme. Elisabeth Delarocque-Astagneau	PU-PH	UVSQ	Directrice de thèse
M. Jacques Ravel	PU	UMB	Directeur de thèse



Version du 23 décembre 2019



# Remerciements

En premier lieu je souhaiterais remercier les membres de mon jury, qui se sont rendus disponibles pour cette soutenance et ont accepté avec diligence d'évaluer mon travail de thèse. Voir dans cette assemblée une majorité de femmes toutes plus brillantes les unes que les autres m'intimide autant que me donne du courage.

Parmi ces femmes scientifiques que j'admire, il y a bien sûr Elisabeth, ma directrice de thèse, pour laquelle de simples remerciements ne suffiraient pas. Je tente néanmoins : merci pour ta remarquable disponibilité et ta confiance, qui m'ont permis de grandir en assurance et en autonomie. Je crois que c'est rare de trouver en sa directrice de thèse une telle qualité d'écoute. Quel plaisir de pouvoir commencer à formuler à voix haute un embryon d'idée sans savoir où ça nous mènera mais d'être certaine que l'autre prendra le train et saura finir la phrase. Merci d'avoir veillé sur ma santé mentale dans les moments les plus ubuesques. Je suis heureuse de t'avoir eue à mes côtés dans les pires et les meilleurs moments. Je n'aurais pas pu avoir meilleur accompagnatrice pour mes premiers pas d'épidémiologiste.

Et puis il y a Jacques, la générosité même. Serait-ce mon léger sentiment d'imposture qui me rend tout aussi émerveillée aujourd'hui qu'au premier jour que tu aies accepté d'être mon directeur de thèse ? Les seuls moments où j'ai douté de toi ont finalement été ceux où tu me signifiais à quel point tu trouvais que j'avais bien travaillé (il me semblait y avoir un abîme entre cette assertion et mon ressenti). Je mesure la chance que j'ai eue de t'avoir pour encadrant. Merci pour nos échanges, mes séjours dans ton laboratoire, tes relectures attentives et ton optimisme contagieux.

Je voudrais adresser tous mes remerciements à Pascale, ma directrice d'unité, et Didier mon directeur d'équipe, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'UMR1181 dans des conditions optimales. Merci à Anne pour le temps que tu m'as consacré pendant ces quelques années et ces connaissances précieuses que tu as partagées avec moi avec une douceur quasi angélique. Merci à Annick, Laurence, Lulla et Bich-Tram de faire vivre le labo, et à tous mes collègues présents et passés : Anna, Audrey, Mélanie, Marion, Mehdi, Félix, Lenaig, Jonathan, Rania, Lison, David, Armiya, Matthieu, Solen, Michael, Malamine, et tous les stagiaires qui apportent chacun un peu d'eux-mêmes dans cette unité. Merci de m'avoir écoutée débiter mes



longues tirades enflammées avec patience et bienveillance. Mention spéciale à Hélène, grâce à qui vous pouvez (oserais-je?) prendre plaisir à lire cette thèse (template  $\LaTeX$  disponible sur <https://github.com/helenea/phd-thesis>). Merci à l'équipe i-Share pour les galères partagées et les madeleines du réconfort : Laura, Julien, Juliette, Bénédicte.

Tout ce travail n'aurait pas été possible sans de nombreuses petites (et grandes) mains : Marie, et par extension tous les services support de l'Institut Pasteur, de l'UVSQ, de l'INSERM, et le personnel de l'école doctorale. Mention spéciale au service reprographie de Pasteur, que j'ai littéralement assiégé régulièrement. Pouvoir encore faire imprimer des documents avec professionnalisme sans avoir à imputer une ligne budgétaire ou à faire signer 4 supérieurs a été l'un des plaisirs secrets sans cesse renouvelés de ces années de thèse.

I would like to thank all the people working in Jacques Ravel's lab with whom I had the pleasure to work or share casual moments. In the first place, thanks to Rebecca, you are an amazing epidemiologist to me, and a hearty human being. Thanks to Bing for preparing the ground on CHARM but mostly for your friendship, your generosity and your openmindedness. Thanks to Michael, Lindsay, Johanna, Sarah, Elias, Vonetta, Mike, Riham and many others.

Je suis heureuse de passer cette première étape sur le chemin de la recherche académique à la suite et aux côtés de nombreux.ses scientifiques, et cela n'a été possible que grâce à la générosité et à la patience de personnes comme Michaël Bloom, Bertille de Barbeyrac, Servas Morré, Samuel Alizon, Agathe Subtil et bien d'autres.

J'adresse tous mes remerciements aux collaborateurs du projet i-Predict, notamment à l'équipe i-Predict de l'URC Ambroise Paré pour m'avoir poussée à développer ma capacité à travailler avec des personnes aux cultures de travail et aux méthodes différentes, au CNR car ça a été précieux pour moi de pouvoir travailler avec d'autres scientifiques dans une confiance et une amitié mutuelle, aux SIUMPPS nous ayant ouvert leurs portes pour l'étude i-Predict, aux gynécologues et à leurs équipes qui prennent soin de nos participantes en situation d'urgence, aux sage-femmes et CRC de l'étude pour votre travail fondamental et de surcroît difficile, et enfin en particulier aux participantes de l'étude i-Predict, ainsi qu'à toutes celles qui font avancer la recherche en se portant volontaires dans nos études cliniques.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude aux personnes ayant relu ma thèse : Merci Benjamin pour ta relecture rigoureuse et minutieuse de ma thèse, à Damien pour tes conseils avisés et à Félix pour ta ténacité.

Faire une thèse, c'est un petit peu plus que juste avoir un travail. On y met un peu de soi, et on n'y arrive que si l'on est aussi bien entouré en dehors du cadre professionnel et que l'on a la chance de pouvoir recharger les batteries auprès de ses proches. Pour ma part, j'ai la chance de pouvoir compter sur le soutien indéfectible de ma famille. Merci à mes parents, de ne jamais avoir brimé ma boulimie intellectuelle et de m'avoir portée pendant toutes ces années d'études (et avant!). Vous êtes mes modèles d'humanité, de solidarité, d'intégrité, de dépassement. Merci à mes frères et sœurs, je suis heureuse et fière d'être de votre fratrie, et à l'ensemble de la tribu Tamarelle pour ces moments de respiration à vos côtés au milieu de mes années de thèse.

Merci à la ribambelle de mes amis, si centraux dans ma vie. J'ai peur de ne pas être exhaus-

---

tive, alors même que c'est l'une des rares occasions que j'ai de vous exprimer mon immense gratitude et mon affection sans borne. Que serais-je sans mes scubes chéris et affiliés pour m'emmener dans les plus hautes sphères intellectuelles et affectives, ma fanfare invisible qui me fait vibrer, les membres du Potostère qui rendent tous les délires collectifs réalisables, la team Foune&Flore, tous mes *partners in crime*, les copains/copines d'étude et tant d'autres amis dont la présence bruyante ou silencieuse, à distance ou à proximité, me porte au quotidien ? Vous êtes merveilleux ! Je compte bien vous garder dans ma vie.

Merci à mon Félix, toi qui sais apaiser mon cerveau quand il s'emballe. Merci pour ta simplicité, ta sérénité, ta légèreté, ton équilibre, ta musique. *Le reste est au-delà des mots...*



# Productions scientifiques

## Articles de thèse publiés

### **Non-optimal vaginal microbiota after azithromycin treatment for *Chlamydia trachomatis* infection**

Tamarelle J, Ma B, Gajer P, Humphrys MS, Terplan M, Mark KS, Thiébaud ACM, Forney LJ, Brotman RM, Delarocque-Astagneau E, Bavoil PM and Ravel J  
*Journal of Infectious Diseases*, 2019, doi 10.1093/infdis/jiz499

### **The vaginal microbiota and its association with Human Papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* and *Mycoplasma genitalium* infections : a systematic review and meta-analysis**

Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, and Delarocque-Astagneau E  
*Clinical Microbiology and Infection*, vol. 25(1), 2019, doi 10.1016/j.cmi.2018.04.019

### **Vaginal microbiota composition and association with prevalent *Chlamydia trachomatis* infection : a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France**

Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaud ACM, Bébéar C, Ravel J, and Delarocque-Astagneau E  
*Sexually Transmitted Infections*, vol. 94(8), 2018, doi 10.1136/sextrans-2017-053346

## Article de thèse en cours de rédaction

### **Factors associated with transitions to and from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiota**

Tamarelle J, Shardell MD, Robinson C, Gravitt P, Zenilman JM, Ravel J and Brotman RM  
*Journal visé : Journal of Infectious Diseases*

## Articles connexes publiés

### The cervicovaginal microbiota-host interaction modulates *Chlamydia trachomatis* infection

Edwards V, Smith S, McComb E, Tamarelle J, Ma B, Humphrys M, Gajer P, Gwilliam K, Schaefer A, Lai S, Terplan M, Mark K, Brotman RM, Forney LJ, Bavoil PM, and Ravel J  
*mBio*, vol. 10(4), 2019, doi 10.1128/mBio.01548-19

### Early screening for *Chlamydia trachomatis* in young women for primary prevention of pelvic inflammatory disease (i-Predict) : study protocol for a randomised controlled trial

Tamarelle J, Thiebaut ACM, Sabin B, Bébéar C, Judlin P, Fauconnier A, Rahib D, Meaudé-Roufai L, Ravel J, Morré SA, de Barbeyrac B, Delarocque-Astagneau E, and i-Predict study group  
*Trials*, vol. 18(1), 2017, doi 10.1186/s13063-017-2211-1

## Conférences

### Vaginal microbiota composition and association with *Chlamydia trachomatis* infection among young women attending a STI clinic in France

Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaut ACM, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E

- 8th meeting of the European Society for Chlamydia Research, Oxford, United Kingdom, Septembre 2016, **poster**
- Colloque Microbiote et Santé, Paris, France, Novembre 2017, **poster**
- 12th Amsterdam Annual Chlamydia Meeting, Amsterdam, The Netherlands, Février 2017, **communication orale**

### i-Predict (Prevention of Diseases Induced by *Chlamydia trachomatis*) : un exemple d'essai interventionnel de prévention en population

Tamarelle J, Sabin B, Thiébaut ACM, Bébéar C, de Barbeyrac B, Delarocque-Astagneau E, i-Predict study group

- Colloque "Recherche interventionnelle en santé des populations", Paris, France, Novembre 2016, **poster**
- Séminaire de mi-parcours de l'AAP 2014 Prévention Primaire de l'INCA-IRéSP, Paris, France, Juin 2017, **communication orale**

### Long lasting impact of antibiotic treatment for *Chlamydia trachomatis* on the vaginal microbiome in young women : results from the CHARM cohort study

Tamarelle J, Ma B, Gajer P, Humphrys MS, Delarocque-Astagneau E, Forney LJ, Bavoil PM, Ravel J

- Keystone Symposium on "the Role of the Genital Tract Microbiome in Sexual and Reproductive Health (S6)", Cape Town, 11-16 Décembre 2018, **communication orale et poster**





# Table des matières

<b>Avant-propos</b>	<b>i</b>
<b>Remerciements</b>	<b>i</b>
<b>Productions scientifiques</b>	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xv</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xix</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>xxi</b>
<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Généralités sur les infections sexuellement transmissibles</b>	<b>3</b>
<b>2 Epidémiologie de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b>5</b>
2.1 Prévalence et incidence de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	5
2.1.1 Dans le monde . . . . .	5
2.1.2 En Europe . . . . .	5
2.1.3 En France . . . . .	6
2.2 Autres caractéristiques épidémiologiques . . . . .	6
2.3 Signes cliniques et complications . . . . .	7
2.4 Dépistage des infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	8
<b>3 Le microbiote vaginal comme écosystème particulier</b>	<b>11</b>
3.1 Généralités sur l'écologie microbienne . . . . .	11
3.2 Caractérisation du microbiote vaginal . . . . .	12
3.2.1 Composition, structure et fonction du microbiote vaginal . . . . .	12
3.2.2 Techniques de caractérisation . . . . .	13
3.2.3 Traitement statistique des données de microbiote . . . . .	14



<b>4</b>	<b>Questions de recherche</b>	<b>23</b>
4.1	Contexte . . . . .	23
4.2	Objectifs . . . . .	25
<b>I</b>	<b>Etude comparée de l'association entre microbiote vaginal et infections sexuellement transmissibles</b>	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>Introduction</b>	<b>29</b>
5.1	Infections sexuellement transmissibles d'importance clinique . . . . .	29
5.2	Rôle potentiel du microbiote vaginal dans la susceptibilité aux infections sexuellement transmissibles . . . . .	30
5.3	Objectif de la revue systématique . . . . .	30
<b>6</b>	<b>Méthodes de la revue systématique et méta-analyse</b>	<b>33</b>
6.1	Recherche documentaire . . . . .	33
6.2	Extraction de données . . . . .	34
6.3	Analyse statistique . . . . .	34
6.3.1	Mesure d'association . . . . .	34
6.3.2	Evaluation du risque de biais et hétérogénéité des études sélectionnées . . . . .	34
<b>7</b>	<b>Résultats</b>	<b>39</b>
7.1	Résultats de la recherche . . . . .	39
7.2	Association globale entre <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal à faible <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) . . . . .	40
7.3	Association globale entre trois autres infections sexuellement transmissibles d'importance clinique et microbiote vaginal . . . . .	41
7.4	Analyse de sous-groupes de l'association entre microbiote vaginal et infection par le papillomavirus humain ou par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	43
7.5	Risque de biais . . . . .	44
<b>8</b>	<b>Discussion</b>	<b>53</b>
8.1	Rappel des résultats . . . . .	53
8.2	Limites . . . . .	54
8.3	Conclusion . . . . .	55
<b>II</b>	<b>Etude du microbiote vaginal comme marqueur de l'infection prévalente par <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Justification</b>	<b>59</b>
9.1	Critères de dépistage . . . . .	59
9.2	Ciblage du dépistage de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	60
9.3	Objectif . . . . .	61
<b>10</b>	<b>Méthodes et données de l'étude française</b>	<b>63</b>
10.1	Schéma d'étude et population d'étude . . . . .	63
10.2	Dépistage de <i>Chlamydia trachomatis</i> et caractérisation du microbiote vaginal . . . . .	63
10.3	Regroupement hiérarchique et analyses statistiques . . . . .	64

<b>11 Résultats de l'étude française</b>	<b>65</b>
11.1 Caractéristiques sociodémographiques des participantes . . . . .	65
11.2 Composition et structure du microbiote vaginal chez des jeunes femmes en France	66
11.3 Association entre infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal .	68
11.3.1 Analyse par type d'état communautaire . . . . .	68
11.3.2 Analyse par phylotype . . . . .	69
<b>12 Méthodes et données de l'étude américaine</b>	<b>73</b>
12.1 Schéma d'étude . . . . .	73
12.2 Procédure de l'étude . . . . .	73
12.3 Préparation des échantillons, amplification génique de l'ARNr 16S et séquençage	74
12.4 Analyse statistique . . . . .	74
<b>13 Résultats de l'étude américaine</b>	<b>75</b>
13.1 Description de la cohorte . . . . .	75
13.2 Association entre la composition du microbiote vaginal et l'infection prévalente par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	80
13.2.1 Analyse par type d'état communautaire . . . . .	80
13.2.2 Analyse par phylotype . . . . .	81
<b>14 Discussion</b>	<b>87</b>
14.1 Rappel des résultats . . . . .	87
14.2 Mise en perspective avec la littérature . . . . .	89
14.3 Limites et orientations futures . . . . .	89
 <b>III Impact sur le microbiote vaginal de la clairance et du traitement antibiotique de <i>Chlamydia trachomatis</i></b>	 <b>93</b>
<b>15 Introduction</b>	<b>95</b>
15.1 Clairance de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	95
15.2 Facteurs associés à la dynamique du microbiote vaginal . . . . .	95
15.3 Traitement antibiotique de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	96
15.4 Objectif . . . . .	96
<b>16 Méthodes et données</b>	<b>97</b>
16.1 Rappel sur le schéma d'étude . . . . .	97
16.2 Rappel sur la préparation des échantillons, l'amplification génique de l'ARNr 16S et le séquençage . . . . .	98
16.3 Évaluation de la résistance aux antibiotiques . . . . .	98
16.4 Analyse statistique . . . . .	98
<b>17 Résultats</b>	<b>99</b>
17.1 Empreinte de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et du traitement azithro- mycine sur le microbiote vaginal . . . . .	99
17.1.1 Comparaison du microbiote vaginal à la visite 2 et chez les contrôles .	99
17.1.2 Comparaison du microbiote vaginal entre les visites 1 et 2 . . . . .	105
17.2 Durée de l'effet de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et du traitement azithromycine sur le microbiote vaginal . . . . .	109

17.3	Résistance à l'azithromycine de souches de <i>Lactobacillus iners</i> et <i>Gardnerella vaginalis</i> . . . . .	112
17.4	Transitions de CST entre visites selon le statut de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	114
<b>18</b>	<b>Discussion</b>	<b>117</b>
18.1	Rappel des résultats . . . . .	117
18.2	Limites . . . . .	118
18.3	Conclusions . . . . .	119
<b>IV</b>	<b>Etude des facteurs associés à la dynamique du microbiote vaginal</b>	<b>121</b>
<b>19</b>	<b>Introduction</b>	<b>123</b>
19.1	Rappels sur le microbiote vaginal . . . . .	123
19.2	Récurrence de la vaginose bactérienne . . . . .	123
19.3	Schémas de dynamiques du microbiote vaginal . . . . .	124
19.4	Facteurs associés aux modifications de microbiote vaginal . . . . .	124
19.5	Objectif . . . . .	124
<b>20</b>	<b>Méthodes et données</b>	<b>127</b>
20.1	Schémas d'étude . . . . .	127
20.1.1	Données de l'étude "Douching Cessation" . . . . .	127
20.1.2	Données de l'étude "Human Microbiome Project" . . . . .	127
20.2	Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S sur Illumina HiSeq . . . . .	128
20.3	Traitement des données post-séquençage . . . . .	128
20.4	Analyse statistique . . . . .	128
<b>21</b>	<b>Résultats</b>	<b>131</b>
21.1	Description des deux études . . . . .	131
21.2	Description des transitions entre CST . . . . .	136
21.3	Facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état LL-VMB . . . . .	136
21.3.1	Analyse chez les femmes des classes LC/LG/DA/DB/DC . . . . .	138
21.3.2	Analyse chez les femmes des classes LI/LID . . . . .	138
<b>22</b>	<b>Discussion</b>	<b>147</b>
22.1	Mise en perspective des résultats . . . . .	147
22.2	Limites . . . . .	149
22.3	Conclusions . . . . .	149
	<b>Conclusion</b>	<b>153</b>
<b>23</b>	<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>155</b>
23.1	Discussion des résultats principaux . . . . .	155
23.1.1	Le microbiote vaginal : marqueur d'infections sexuellement transmissibles	155
23.1.2	Dynamique du microbiote vaginal . . . . .	157
23.2	Perspectives en santé publique . . . . .	158
23.2.1	Vaginose bactérienne et santé sexuelle et reproductive . . . . .	158

23.2.2	L'écologie microbienne en santé publique . . . . .	159
23.2.3	Préservation de l'équilibre du microbiote vaginal . . . . .	159
23.3	Orientations futures . . . . .	160
23.3.1	Composition versus fonctionnalité du microbiote vaginal . . . . .	160
23.3.2	Susceptibilité de l'hôte . . . . .	161
<b>Annexes</b>		<b>163</b>
<b>A Ayant trait à la partie I</b>		<b>165</b>
A.1	Article . . . . .	165
A.2	Evaluation de la qualité des études sélectionnées dans la méta-analyse . . . . .	179
A.3	Analyse de sensibilité pour les infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> et <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . . . . .	182
A.4	Analyse de sous-groupe sur les cas incidents et cas prévalents d'infections à <i>Chlamydia trachomatis</i> et HPV . . . . .	182
<b>B Ayant trait à la partie II</b>		<b>185</b>
B.1	Article . . . . .	185
<b>C Ayant trait à la partie III</b>		<b>189</b>
C.1	Article . . . . .	189
C.2	Distribution des phylotypes de l'étude CHARM et de l'étude VM400 . . . . .	199
C.3	Tests de Student appariés sur l'abondance des phylotypes entre les visites 1 et 2 dans l'étude CHARM . . . . .	204
C.4	Test de sensibilité de souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l'azithromycine et la doxycycline . . . . .	205
<b>D Ayant trait à la partie IV</b>		<b>207</b>
D.1	Notification des menstruations dans les deux études . . . . .	207
D.2	Analyse non stratifiée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non dominé par des <i>Lactobacillus</i> . . . . .	207
<b>Bibliographie</b>		<b>215</b>



## Liste des figures

4.1	Histoire naturelle de l'infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	24
4.2	Représentation schématique des associations entre expositions, infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal . . . . .	25
7.1	Diagramme de flux du processus de sélection pour l'identification et l'inclusion des articles . . . . .	40
7.2	Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en <i>Lactobacillus</i> spp. et infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	41
7.3	Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en <i>Lactobacillus</i> spp. et infection par le papillomavirus humain . . . . .	42
7.4	Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en <i>Lactobacillus</i> spp. et infection par <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . . . . .	42
7.5	Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en <i>Lactobacillus</i> spp. et infection par <i>Mycoplasma genitalium</i> . . . . .	43
7.6	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	45
7.6	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	46
7.6	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et <i>Chlamydia trachomatis</i> . . . . .	47
7.7	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papillomavirus humain . . . . .	48
7.7	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papillomavirus humain . . . . .	49
7.7	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papillomavirus humain . . . . .	50
7.8	Diagrammes en entonnoir . . . . .	51
11.1	Abondance relative des 6 phylotypes bactériens vaginaux principaux, groupés par type d'état communautaire, chez 132 femmes en France, Juin 2015. . . . .	67

11.2	Heatmap des abondances relatives des taxons bactériens retrouvés dans les communautés bactériennes vaginales de 132 femmes en France, Juin 2015. . . . .	68
11.3	Proportions de types d'état communautaire chez 21 femmes CT-positives et 111 femmes CT-négatives en France, Juin 2015. . . . .	69
11.4	Évaluation de la corrélation des q-values calculées par les méthodes <i>DESeq2</i> et régression binomiale négative, pour la comparaison des phylotypes présents chez 132 femmes dans un CDAG en France, Juin 2015. . . . .	71
13.1	Organigramme du nombre de femmes avec des échantillons exploitables à chaque visite, dans une cohorte de 149 femmes à Baltimore, MD. . . . .	76
13.2	Heatmap des abondances relatives des phylotypes dans 395 échantillons de la cohorte prospective CHARM et 99 échantillons de l'étude transversale VM400. . . . .	79
13.3	Proportions des types d'états communautaires (CST) dans 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons contrôles VM400. . . . .	81
13.4	Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative, au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons contrôles VM400. . . . .	83
13.5	Évaluation de la corrélation des q-values des méthodes <i>DESeq2</i> et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 141 échantillons CHARM Visite 1 et 99 échantillons contrôles VM400. . . . .	85
15.1	Représentation schématique des associations entre expositions, infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal . . . . .	96
17.1	Proportions des types d'états communautaires (CST) dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), Visite 2 (CT-négatifs, 3 mois après le traitement), et dans les échantillons contrôles VM400. . . . .	100
17.2	Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative, au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 99 échantillons contrôles VM400. . . . .	101
17.3	Évaluation de la corrélation des q-values des méthodes <i>DESeq2</i> et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 74 échantillons CHARM Visite 2 et 99 échantillons contrôles VM400. . . . .	104
17.4	Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative, au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs). . . . .	107
17.5	Évaluation de la corrélation des q-values des méthodes <i>DESeq2</i> et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 141 échantillons CHARM Visite 1 et 74 échantillons CHARM Visite 2. . . . .	108
17.6	Proportions des types d'état communautaire dans les échantillons contrôles VM400 et les échantillons de l'étude CHARM Visite 1, Visite 2, Visite 3, et Visite 4. . . . .	109
17.7	Volcano plots des phylotypes différentiellement exprimés entre les échantillons CHARM des Visites 1, 2, 3 et 4. . . . .	110
17.8	Distribution de l'indice de diversité de Shannon dans les échantillons contrôles VM400 et les échantillons de l'étude CHARM Visite 1, Visite 2, Visite 3, et Visite 4. . . . .	111

17.9	Heatmap des p-values de comparaison deux-à-deux de la valeur moyenne de l'indice de diversité de Shannon dans les échantillons CHARM et les échantillons VM400, d'après les tests de Wilcoxon-Mann-Whitney et les tests de rangs signés de Wilcoxon. . . . .	112
17.10	Test de sensibilité antibactérienne sur des souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l'azithromycine et la doxycycline . . . . .	113
17.11	Trajectoires individuelles des femmes incluses dans la cohorte CHARM, en termes de types d'état communautaire (CST). . . . .	114
19.1	Représentation schématique des associations entre expositions, infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal . . . . .	125
21.1	Dynamique des types d'état communautaire (CST) au cours du temps par femme, dans l'étude "Douching cessation". . . . .	132
21.2	Dynamique des types d'état communautaire (CST) au cours du temps par femme, dans l'étude "Human Microbiome Project". . . . .	133
21.3	Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non dominé par des <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) en stratifiant sur le CST dominant des participantes, dans l'étude "Douching Cessation" et dans l'étude "Human Microbiome Project". . . . .	139
23.1	Représentation schématique des associations entre expositions, infection par <i>Chlamydia trachomatis</i> et microbiote vaginal . . . . .	160
A.1	Diagrammes en forêt des analyses de sensibilité entre microbiote vaginal déficient en <i>Lactobacillus</i> spp. et (a) <i>Chlamydia trachomatis</i> et (b) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> . . . . .	183
A.2	Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et (a) <i>Chlamydia trachomatis</i> et (b) HPV, pour les cas incidents versus prévalents d'infection. . . . .	184
D.1	Dynamique des types d'état communautaire (CST) et notification des menstruations au cours du temps par femme, dans l'étude "Douching Cessation". . . . .	208
D.2	Dynamique des types d'état communautaire (CST) et notification des menstruations au cours du temps par femme, dans l'étude "Human Microbiome Project". . . . .	209





## Liste des tableaux

3.1	Méthodes de calcul de distance entre groupes les plus utilisées . . . . .	19
6.1	Caractéristiques des études sélectionnées pour la méta-analyse. . . . .	36
11.1	Caractéristiques sociodémographiques et distribution des types d'état communautaire selon le statut <i>Chlamydia trachomatis</i> , chez 132 femmes en France, Juin 2015. . . . .	66
11.2	Description du total de séquences obtenues ( <i>totalcount</i> ) par échantillon, par séquençage du gène de l'ARNr 16S, au sein de 132 femmes positives et négatives pour <i>Chlamydia trachomatis</i> , en France, Juin 2015. . . . .	70
11.3	Espèces différenciellement exprimées au sein de 132 femmes positives et négatives pour <i>Chlamydia trachomatis</i> , en France, Juin 2015. . . . .	70
13.1	Caractéristiques à l'inclusion des 149 femmes incluses dans la cohorte prospective CHARM, à Baltimore, MD. . . . .	77
13.2	Résultats d'un modèle de régression logistique comparant 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) à 99 échantillons VM400 contrôles en termes de CST . . . . .	80
13.3	Description du total de séquences obtenues ( <i>totalcount</i> ) par échantillon, par séquençage du gène de l'ARNr 16S, dans l'étude CHARM et l'étude VM400. . . . .	82
13.4	Espèces différenciellement exprimées au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons VM400 contrôles, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons . . . . .	84
17.1	Résultats d'un modèle de régression logistique comparant 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) à 99 échantillons VM400 contrôles en termes de CST . . . . .	100
17.2	Espèces différenciellement exprimées au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 99 échantillons VM400 contrôles, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons . . . . .	102
17.3	Résultats d'un modèle de régression logistique à effets mixtes comparant 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) à 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) en termes de CST . . . . .	105

17.4	Espèces différentiellement exprimées au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons . . . . .	106
17.5	Tests de rangs signés de Wilcoxon pour des comparaisons deux-à-deux des moyennes de l'indice de diversité de Shannon pour chaque visite de la cohorte CHARM et pour les contrôles VM400 . . . . .	111
17.6	Matrices de transitions entre types d'état communautaire d'une visite à une autre chez 100 participantes de l'étude CHARM. . . . .	115
21.1	Caractéristiques à l'inclusion des femmes des classes LC/LG, LI/LID et DA/DB/DC, dans l'étude "Douching Cessation" et dans l'étude "Human Microbiome Project".	134
21.2	Nombre d'occurrences des CST et des variables dépendantes du temps par classe dans l'étude "Douching Cessation" et dans l'étude "Human Microbiome Project". . . . .	137
21.3	Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) dans l'étude "Douching Cessation", en stratifiant selon la classe. . . . .	140
21.4	Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) dans l'étude "Human Microbiome Project", en stratifiant selon la classe. . . . .	143
A.1	Evaluation de la qualité des études sélectionnées pour l'étude de l'association entre microbiote vaginal et infections sexuellement transmissibles, par l'échelle Newcastle-Ottawa, au regard de l'objectif de cette revue systématique. . . . .	180
C.1	Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 99 échantillons VM400 et 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon. . . . .	200
C.2	Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 99 échantillons VM400 et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon. . . . .	201
C.3	Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon. . . . .	203
C.4	Tests de Student appariés sur 74 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs). . . . .	204
C.5	Test de sensibilité antibactérienne sur des souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l'azithromycine et la doxycycline. . . . .	205
D.1	Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) dans l'étude "Douching Cessation".	210
D.2	Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des <i>Lactobacillus</i> (LL-VMB) dans l'étude "Human Microbiome Project". . . . .	212

## Liste des abréviations

<b>ACP</b>	Analyse en Composantes Principales
<b>ANAES</b>	Agence Nationale d'Accréditation et d'Evaluation en Santé
<b>ASV</b>	Amplicon Sequence Variant
<b>BVAB</b>	Bacterial-Vaginosis-Associated Bacteria
<b>CDAG</b>	Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control
<b>CeGIDD</b>	Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic
<b>CHARM</b>	Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management
<b>CIDDIST</b>	Centre d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST
<b>CMI</b>	Concentration Minimale Inhibitrice
<b>CPEF</b>	Centre de Planification et d'Education Familiale
<b>CST</b>	Community State Type
<b>CT</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
<b>DC</b>	Douching Cessation
<b>ECDC</b>	European Center for Disease Control
<b>HL-VMB</b>	High- <i>Lactobacillus</i> Vaginal Microbiota
<b>HMP-UMB</b>	Human Microbiome Project - University of Maryland - Baltimore
<b>HPV</b>	Papillomavirus Humain
<b>IGH</b>	Infection Génitale Haute
<b>IST</b>	Infection Sexuellement Transmissible
<b>LL-VMB</b>	Low- <i>Lactobacillus</i> Vaginal Microbiota
<b>MG</b>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<b>NG</b>	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale pour la Santé
<b>OTU</b>	Unité Taxonomique Opérationnelle
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>SIDA</b>	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
<b>SVM</b>	Support Vector Machine
<b>TMA</b>	Transcription-Mediated Amplification
<b>VB</b>	Vaginose Bactérienne
<b>VIH</b>	Virus de l'Immunodéficience Humaine



---

# Introduction

---



## Chapitre

# 1

## Généralités sur les infections sexuellement transmissibles

La santé de la femme, ou santé des femmes, est un champ de la santé publique et de la médecine s'intéressant aux problématiques de santé spécifiques aux femmes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) justifie ce focus particulier par l'existence de différences à la fois biologiques et socioculturelles.

« Le fait d'être un homme ou une femme a sur la santé des conséquences importantes, qui résultent à la fois des différences biologiques et sociales. La santé des femmes et des jeunes filles doit faire l'objet d'attention particulière parce que, dans de nombreuses sociétés, celles-ci sont désavantagées en raison de discriminations ancrées dans des facteurs socioculturels. Elles sont par exemple plus vulnérables face au VIH/SIDA. Parmi les facteurs socioculturels empêchant les femmes et les jeunes filles de bénéficier de services de santé de qualité et de parvenir au meilleur état de santé possible, on trouve :

- Des relations inégales entre hommes et femmes ;
- Des normes sociales qui réduisent leurs possibilités d'éducation et d'emploi rémunéré ;
- Une vision de la femme centrée exclusivement sur son rôle procréateur ;
- Des menaces ou de réelles violences physiques, sexuelles et émotionnelles. »

Par exemple, la santé mentale des femmes ou la santé reproductive et sexuelle sont incluses parmi ces problématiques de santé affectant spécifiquement les femmes. Une définition de la santé reproductive et sexuelle – ou santé génésique – a été établie lors de la Conférence internationale sur la population et le développement, au Caire en 1994.

« Par santé en matière de reproduction, on entend le bien-être général de la personne humaine, tant physique que mental et social, pour tout ce qui concerne l'appareil génital, ses fonctions et son fonctionnement, et non pas seulement l'absence de maladies ou d'infirmités. Cela suppose donc qu'une personne peut mener



une vie sexuelle satisfaisante en toute sécurité, qu'elle est capable de procréer et libre de le faire aussi souvent ou aussi peu souvent qu'elle le désire. Cette dernière condition implique qu'hommes et femmes ont le droit d'être informés et d'utiliser la méthode de planification familiale de leur choix, ainsi que d'autres méthodes de régulation des naissances, qui ne soient pas contraires à la loi, méthodes qui doivent être sûres, efficaces, abordables et acceptables, ainsi que le droit d'accéder à des services de santé qui permettent aux femmes de mener à bien grossesse et accouchement et donnent aux couples toutes les chances d'avoir un enfant en bonne santé ».

Même si la santé reproductive et sexuelle ne se limite pas qu'à l'absence de pathologies génitales, celles-ci peuvent influencer à la fois le bien-être physique mais aussi mental et social des femmes touchées par ces affections.

Parmi ces pathologies génitales, les infections sexuellement transmissibles ont été un sujet majeur de préoccupation ces dernières années en raison de leur recrudescence partout dans le monde. Le terme infection sexuellement transmissible (IST) regroupe d'une part les infections qui s'acquièrent par contact sexuel et vont affecter d'autres organes que les organes génitaux, voire l'ensemble de l'organisme, telles que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH à l'origine du SIDA) ou les virus de l'hépatite B et C ; et d'autre part, les infections qui s'acquièrent par contact sexuel et restent cantonnées aux organes génitaux, comme l'infection virale au Papillomavirus Humain (HPV), les infections bactériennes à *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Treponema pallidum* (agent de la syphilis, pouvant évoluer en maladie systémique) ou les infections parasitaires à *Trichomonas vaginalis*. C'est cette deuxième catégorie d'IST à laquelle nous nous intéressons et pour lesquelles les données indiquent une recrudescence en France et dans le monde.

L'infection par HPV est la plus prévalente des IST puisqu'il n'existe pas de traitement pour cette infection virale. Jusqu'à 80% des femmes seront infectées par HPV au cours de leur vie [1]. D'un point de vue de santé publique, la problématique autour de cette infection concerne surtout l'acceptabilité de la vaccination, le dépistage et le traitement des complications de l'infection par HPV, que sont les dysplasies cervicales et le cancer du col de l'utérus.

En 2012, l'estimation de prévalence mondiale de *N. gonorrhoeae* était de 0,8% (IC 0,6–1,0%) chez les femmes de 15 à 49 ans, soit 27 millions d'adultes porteurs de *N. gonorrhoeae* à travers le monde, tandis qu'elle était de 5,0% (IC 4,0–6,4%) pour la trichomonase, soit 101 millions de personnes affectées, et de 0,5% (IC 0,4–0,6%) pour la syphilis, soit 18 millions de personnes affectées [2].

Récemment, une autre IST bactérienne est apparue comme potentiellement problématique. L'infection par *M. genitalium* concernait 2,0% des femmes à faible risque et 7,3% des femmes à risque élevé [3], soit à un niveau proche des autres IST bactériennes.

Malgré tout, l'infection par *C. trachomatis* reste la plus prévalente des IST bactériennes. C'est donc cette IST qui a été choisie comme sujet de recherche de cette thèse, et comme modèle d'étude pour l'analyse du rôle du microbiote vaginal dans l'histoire naturelle des IST.

## Chapitre

# 2

## Epidémiologie de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

### 2.1 Prévalence et incidence de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

#### 2.1.1 Dans le monde

En 2012, l'estimation de prévalence mondiale de l'infection par *C. trachomatis* était de 4,2% chez les femmes de 15 à 49 ans (IC 95% 3,7-4,7), et 2,7% (IC 95% 2,0-3,6) chez les hommes, soit environ 127 millions d'adultes vivant avec cette infection à travers le monde. En multipliant par la durée moyenne d'infection, cela correspond à 131 millions de nouveaux cas de d'infection par an. Ce chiffre comparé aux deux décennies précédentes indique une augmentation de l'incidence de l'infection par *C. trachomatis* : 89 millions en 1995, 92 millions en 1999, 101 millions en 2005 et 106 millions en 2008. Le taux d'incidence annuel de l'infection est estimé à 38 pour 1000 chez les femmes et 33 pour 1000 chez les hommes [2].

Ces estimations produites par l'OMS sont fondées sur une méta-analyse de la littérature et sur les précédentes estimations de prévalence (2005 et 2008), mais la prévalence et l'incidence vraies de l'infection par *C. trachomatis* sont difficilement estimables car les enquêtes de prévalence sont financièrement trop coûteuses. De plus, il s'agit d'une infection asymptomatique dans la plupart des cas et les estimations d'incidence reposant sur des systèmes de surveillance qui rapportent les nouveaux cas diagnostiqués ne sont donc pas parfaitement fiables [4].

#### 2.1.2 En Europe

Les données européennes sont fournies par le European Center for Disease Control (ECDC) sur la base du nombre de cas rapportés. Ces données ne permettent pas de distinguer une

augmentation de l'incidence de l'infection d'une augmentation du nombre de tests réalisés, d'une amélioration de la notification ou d'une augmentation de la couverture du système de surveillance. Dans le rapport annuel 2018, les données portaient sur 26 pays dont 22 seulement ont un système de surveillance intégré avec déclaration obligatoire, et 4 pour lesquels les données proviennent d'un réseau sentinelle (participation volontaire). De plus, les définitions de cas utilisées peuvent varier avec une majorité des pays utilisant la définition standard de l'Union Européenne, 5 pays utilisant une définition de cas nationale et 4 pays ne précisant pas quelle définition est utilisée.

Ainsi, sur 26 pays pour lesquels les données étaient disponibles, le nombre de cas d'infection par *C. trachomatis* est passé de 358 489 en 2010, soit 178,9 cas pour 100 000 habitants, à 396 128 en 2014, soit 187,8 cas pour 100 000 habitants [5]. En 2017, le nombre de cas était passé à 409 646, soit 146,2 cas pour 100 000 habitants. Le taux le plus bas était de 0,1 pour 100 000 habitants à Chypre ou en Roumanie, et le taux le plus haut à 649,6 pour 100 000 habitants pour l'Islande (suivie du Danemark et de la Norvège) [6], mais l'interprétation des variations observées entre pays doit prendre en compte l'hétérogénéité entre pays dans le nombre de tests réalisés.

### 2.1.3 En France

En France, les données de surveillance collectées au niveau national et rapportées à l'ECDC sont basées sur un réseau sentinelle de laboratoires, et non un système de surveillance avec déclaration obligatoire. Ainsi, le nombre de cas rapportés est passé de 12 932 à 17 672 entre 2013 et 2017 mais ne permet pas de calculer un taux du fait de l'absence d'un dénominateur [6].

La dernière estimation de prévalence de l'infection par *C. trachomatis* reposait sur une étude de prévalence datant de 2005 et était de 1,6% (IC 95% 1,0-2,5) chez les femmes de 18 à 44 ans et de 1,4% (IC 95% 0,8-2,6) chez les hommes de la même tranche d'âge, en-dessous des estimations mondiales [7]. Dans la tranche d'âge des 18-24 ans, cette prévalence était de 3,6% (IC 95% 1,9-6,8) chez les femmes et de 2,4% (IC 95% 1,0-5,7) chez les hommes.

Une étude plus récente de 2012 (Chlamyweb) a mesuré la positivité à l'infection via un recrutement de participantes en ligne. La positivité était de 8,3% chez les femmes de 18 à 24 ans et de 4,4% chez les hommes de la même tranche d'âge. Cependant, la positivité n'est qu'une approximation de la prévalence réelle, il n'est donc pas possible d'inférer que l'infection est en augmentation en France. Mais les données disponibles au niveau mondial, européen et national indiquent toutes clairement que l'infection reste faiblement voire pas du tout contrôlée, malgré l'existence d'un test fiable de dépistage et d'un traitement efficace.

## 2.2 Autres caractéristiques épidémiologiques

La **tranche d'âge** 18-24 ans est la plus affectée par l'infection en France [7]. Au niveau européen, la tranche d'âge 20-24 ans est la plus affectée, suivie de la tranche 15-19 ans (ECDC), aussi bien chez les hommes que chez les femmes. Ce résultat est également retrouvé dans d'autres pays du monde comme les États-Unis [8], avec un taux rapporté d'infection chez les

15-24 ans quatre fois supérieur à celui de la population générale [9, 10].

Le **ratio homme/femme** de l'infection est estimé à 0,7 en Europe (ECDC). Plus de cas sont détectés chez les femmes que chez les hommes dans la plupart des pays européens.

Certains paramètres épidémiologiques sont difficiles à estimer du fait de raisons éthiques évidentes. Ainsi, la **probabilité de transmission** d'une personne infectée vers une personne non-infectée ne peut être étudiée prospectivement qu'en laissant dans l'ignorance le ou la futur(e) partenaire, ce qui est éthiquement inacceptable. La modélisation mathématique permet de pallier ce problème en cherchant à estimer les paramètres reproduisant le plus les données observées. Plusieurs estimations de probabilité de transmission de l'homme vers la femme (en l'absence de préservatif) sont ainsi disponibles dans la littérature : 12,9% (IC 95% 9,6-20,6) pour chaque rapport sexuel avec un homme infecté [11], ou 24,7%, d'après des méthodes de modélisation mathématique [12]. La probabilité de transmission semble moins élevée de la femme vers l'homme avec une estimation de 16,3% en moyenne en l'absence de préservatif également d'après cette dernière étude [12]. Chez les femmes, l'estimation de la **clairance naturelle** de *C. trachomatis* pose également des questions éthiques. Elle est possible dans des cas d'études rétrospectives sur des échantillons congelés dans le cadre d'une autre étude par exemple. Les estimations de clairance de la littérature indiquent qu'environ la moitié des infections par *C. trachomatis* sont résolues spontanément au bout d'un an [13]. À noter que cela n'élucide par la question de savoir si des effets néfastes peuvent déjà avoir eu lieu.

Chez les femmes dépistées pour *C. trachomatis* et traitées efficacement par antibiotiques, le **taux de réinfection** est estimé à entre 20 et 30 pour 100 personnes-années [14, 15]. De plus, le délai médian de la réinfection est estimé à entre 4 et 5 mois [14]. Il semblerait que le taux de réinfection soit plus important chez les femmes ayant eu une infection persistante et ayant été traitées par antibiotiques que chez celles ayant résolu l'infection spontanément [16]. Concernant les raisons de ces réinfections, une étude prospective de jeunes femmes aux Etats-Unis avec données de génotype de *C. trachomatis* a mis en évidence que 54,6% des réinfections présentaient des génotypes différents de *C. trachomatis* que ce soit avec le même partenaire ou pas, 13,7% étaient probablement liées à des échecs de traitement, 17,5% étaient des probables réinfections avec le même partenaire (même génotype) et 12% étaient des possibles réinfections avec un partenaire différent (mais le même génotype) [17].

## 2.3 Signes cliniques et complications

Chez les hommes, l'infection par *C. trachomatis* est asymptomatique dans environ 90% des cas [18]. Lorsqu'elle est symptomatique, l'infection se manifeste par des écoulements au niveau du pénis, des démangeaisons et une sensation de brûlure au moment de la miction. Chez les femmes, l'infection est asymptomatique dans 30 à 90% des cas, selon les pays [18]. La bactérie infecte les cellules du col de l'utérus, provoquant une inflammation de cette région (cervicite). Les symptômes pouvant se manifester sont des douleurs pendant les rapports, des saignements inhabituels entre les règles, des écoulements vaginaux inhabituels et une sensation de brûlure à la miction. Si l'infection n'est pas traitée par des antibiotiques adaptés, la bactérie peut remonter l'appareil génital jusqu'aux trompes de Fallope et provoquer une inflammation de l'endomètre (endométrite) ou des trompes (salpingite), communément dénommée infec-

tion génitale haute (IGH). Le spectre des IGH comprend également les abcès tubo-ovariens et la péritonite pelvienne [19]. Il est estimé qu'environ 10% des infections par *C. trachomatis* évoluent vers des IGH [20, 21]. Sur l'ensemble des IGH, il est estimé que 10 à 20% des IGH sont liées à des infections par *C. trachomatis* [22, 23]. Sur le long terme, ces inflammations chroniques sont responsables de lésions et peuvent mener à une infertilité tubaire ou à des grossesses extra-utérines. Cependant, les IGH peuvent aussi être causées par d'autres pathogènes, comme *Neisseria gonorrhoeae* ou *Mycoplasma genitalium*, tandis qu'aucun pathogène n'est retrouvé pour une autre partie des diagnostics d'IGH [22]. Un tiers des grossesses extra-utérines [24, 25] et entre 45% et 65% des infertilités tubaires [26, 27] sont attribuées à *C. trachomatis*. En revanche, la proportion de cas d'infection par *C. trachomatis* évoluant vers des infertilités tubaires est faible et estimée à entre 0,1 et 6% [28, 29].

Le traitement de l'infection génitale basse par *C. trachomatis* repose sur des antibiotiques administrés par voie orale : soit par 1 g d'azithromycine en une prise unique, soit par 100 mg de doxycycline deux fois par jour pendant une semaine [30]. Les deux traitements ont une efficacité très élevée, à 96% pour l'azithromycine contre 97% pour la doxycycline. La différence d'efficacité serait de 2,6% (IC 95% 0,5-4,7) en faveur de la doxycycline d'après une méta-analyse de 2014 [31].

Le traitement de l'IGH (une fois l'infection ascendante ayant atteint les voies hautes) consiste en l'administration de ceftriaxone 1 g en une prise intramusculaire plus doxycycline 100 mg et métronidazole 500 mg deux fois par jour pendant 10 jours par voie orale (recommandations 2019 du Conseil National des Gynécologues et Obstétriciens Français). Cependant, rien ne permet d'affirmer que le traitement de l'infection basse ou haute par *C. trachomatis* empêche la survenue des complications qui pourraient s'être déjà installées, d'où l'intérêt d'un dépistage précoce.

## 2.4 Dépistage des infections à *Chlamydia trachomatis*

En France, les recommandations de dépistage émanent d'un rapport d'évaluation de l'Agence Nationale d'Accréditation et d'Évaluation en Santé (ANAES) de 2003 indiquant que le dépistage opportuniste des infections uro-génitales à *C. trachomatis* de manière systématique uniquement dans les populations à risque est justifié. Ces populations à risque sont définies comme celles se présentant dans les Centres Gratuits d'Information, de Dépistage et de Diagnostic (CeGIDD - anciennement Centres de Dépistage Anonymes et Gratuits (CDAG) et Centres d'Information, de Dépistage et de Diagnostic des IST (CIDDIST)), ainsi que dans les Centres de Planification et d'Éducation Familiale (CPEF) et les Centres d'interruption volontaire de grossesse. Ce dépistage s'applique aux femmes de moins de 25 ans et aux hommes de moins de 30 ans, ainsi qu'éventuellement aux personnes fréquentant ces Centres et ayant eu plus d'un partenaire dans l'année écoulée. De plus, il appartient à la personne infectée d'informer son partenaire d'une potentielle contamination et de l'inciter à se faire dépister et traiter.

Ces recommandations ont été revues par la Haute Autorité de Santé (HAS) sur demande de la Direction Générale de la Santé en Septembre 2018. La HAS élargit ainsi le dépistage opportuniste systématique à la médecine de ville (généralistes, gynécologues, sage-femmes) pour les femmes de moins de 25 ans mais aussi pour les femmes de plus de 25 ans et de moins de 18 ans présentant des facteurs de risque (plus d'un partenaire dans l'année, changement récent

de partenaire, coinfection avec une autre IST ou infection du partenaire, antécédent d'IST, entre autres) [32].

Malgré l'application de ces recommandations de dépistage depuis 2003, l'incidence des infections à *C. trachomatis* ne semble pas baisser. Les nouvelles recommandations de la HAS cherchent à élargir le dépistage à un ensemble plus important de la population, notamment chez toutes les jeunes femmes de 18 à 25 ans, tout en restant opportuniste (pas de sollicitation de la population cible mais uniquement à l'occasion de consultations dans les lieux sus-mentionnés).

Cependant, les estimations de risque d'infection et d'évolution vers des complications au niveau populationnel ne rendent pas compte de l'hétérogénéité inter-individuelle, où le risque d'être infecté, de présenter des symptômes et d'évoluer vers des complications peut varier grandement d'une personne à l'autre en fonction de caractéristiques propres de l'individu. Il peut dépendre notamment des caractéristiques de l'hôte, et c'est la raison pour laquelle la santé sexuelle ne se définit pas uniquement comme l'absence de pathologie. Un bon équilibre de la flore vaginale - ou microbiote vaginal – participe de la bonne santé sexuelle et reproductive d'une femme.



## Chapitre

# 3

## Le microbiote vaginal comme écosystème particulier

### 3.1 Généralités sur l'écologie microbienne

**L'écologie** se définit comme l'étude scientifique des interactions qui détermine la distribution et l'abondance des organismes [33]. Le terme **distribution** fait référence au lieu où ces organismes interagissent, tandis que le terme **abondance** fait référence au nombre d'organismes présents dans un endroit donné. Ces lieux où les organismes interagissent constituent des systèmes écologiques ou **écosystèmes**. Les voies génitales représentent un écosystème où interagissent les bactéries, les virus, les champignons et les parasites du microbiote vaginal, ainsi que l'hôte. Dans le monde du vivant, ces équilibres sont nécessairement des **équilibres dynamiques** puisque l'existence et la croissance des différents organismes se heurtent à l'existence et à la croissance des autres. De plus, une abondance stable peut donner l'impression d'un équilibre statique mais être en réalité un cycle perpétuel de multiplication ou reproduction et de destruction. L'existence d'un équilibre dynamique implique que l'ajout ou le retrait d'un organisme modifie nécessairement cet équilibre dynamique. En effet, des organismes individuels similaires forment des populations, qui entre elles constituent des communautés. Ces communautés forment ensemble dans un espace donné un écosystème. Ces **niveaux biologiques d'intégration** s'emboîtent comme des cubes de taille croissante, résultant en une dépendance de l'équilibre de l'écosystème vis-à-vis de tous les organismes individuels que l'on retrouve en son sein. Pour être plus précis, les **populations** sont des groupes d'individus de la même espèce, tandis que les **communautés** sont des groupes d'espèces vivant dans le même espace [33].

Les communautés d'organismes microscopiques - que ce soit des bactéries, des champignons, des parasites ou même des virus - habitant le corps humain constitue ce que l'on appelle le **microbiote** humain (du grec ancien *mikros* « petit » et *biotos* « vie »). Il y a en réalité plusieurs microbiotes chez l'humain puisque les communautés résidant dans l'intestin ou dans



les voies respiratoires, ou encore dans les voies génitales ou sur la peau, sont toutes très différentes [34] et ne sont pas corrélées entre elles [35]. L'ensemble des gènes de ces microbes est dénommé **microbiome**. Dans l'étude du ou des microbiotes humains, l'essentiel des travaux se sont concentrés sur le monde bactérien, et très peu sur les autres microbes présents dans ces écosystèmes [36]. C'est notamment le cas du microbiote vaginal, où la majorité des travaux ont porté sur les bactéries jusqu'à présent. Ce travail de thèse est centré autour de l'étude du microbiote vaginal, dans sa dimension uniquement bactérienne.

En termes d'analyses statistiques, l'un des principes fondateurs de l'écologie selon lequel *une population ne peut pas croître sans limites* implique que l'on ne peut pas étudier séparément l'absence ou la présence d'une population sans prendre en compte que l'absence d'une population correspond nécessairement à la présence d'une ou de plusieurs autres populations. Cette remarque s'applique également lors de l'analyse de l'abondance des populations en présence. Deux autres paramètres rentrent en jeu : la **pathogénicité** de certaines espèces, qui fait qu'une espèce à haut pouvoir pathogène même en faible abondance peut être plus néfaste qu'une large abondance d'une autre espèce ; et la **redondance fonctionnelle** de certaines espèces, qui implique que l'absence d'une espèce peut être compensée en termes fonctionnels par la présence d'une autre, les deux espèces étant ainsi équivalentes au regard d'une certaine fonction. Des **mécanismes de compensation** peuvent être à l'œuvre lors de l'ajout ou du retrait d'une espèce bactérienne, ne permettant pas de raisonner de manière purement arithmétique.

## 3.2 Caractérisation du microbiote vaginal

Nous avons précédemment clarifié que ce travail de thèse s'intéressait essentiellement au monde bactérien, mais le monde bactérien peut être caractérisé de diverses manières : par la liste des espèces bactériennes en présence, par leur quantité, par leurs associations en communautés, par l'ensemble des gènes qu'elles présentent (le microbiome) et expriment, par les fonctions qu'elles assurent, ou encore par les métabolites qu'elles produisent. En effet, la présence d'une bactérie ne permet pas d'établir le rôle que celle-ci joue. Il existe au sein d'une même espèce bactérienne une diversité dans les gènes que les bactéries présentent (par exemple une souche d'une espèce peut présenter une résistance aux antibiotiques qu'une autre souche de cette même espèce ne présente pas). Mais même quand ce gène est présent, l'expression de ce gène et sa traduction en fonction biologique n'est pas nécessairement assurée puisque d'autres éléments extérieurs tels que la présence d'une autre espèce bactérienne ou des signaux envoyés par l'hôte de ce microbiote peuvent réguler l'expression d'un gène.

### 3.2.1 Composition, structure et fonction du microbiote vaginal

Le terme **composition** fait référence à la liste des bactéries retrouvées dans un prélèvement et leur quantité. Les méthodes moléculaires actuelles ciblent des gènes présents uniquement dans le monde bactérien et, grâce à des variations de ces gènes, identifient les espèces bactériennes en présence et leur quantité. Ces techniques amènent à la génération de tables de données où pour chaque prélèvement sont renseignées les données de comptage de chaque espèce bactérienne.

Le terme **structure** fait référence à l'équilibre de bactérie en présence et aux communautés (ou *clusters*) retrouvées dans un échantillon. Il fait donc référence à un niveau biologique d'intégration supérieur, par rapport à la simple composition bactérienne d'un échantillon, et au fait que des populations bactériennes se structurent en communautés.

Le microbiote vaginal peut aussi être étudié à la lumière de ses **fonctions**, c'est-à-dire à ce que ce microbiote accomplit ou induit comme processus biologique. Ces fonctions sont descriptibles à travers le microbiome et les gènes en présence, mais également à travers le transcriptome puisque les gènes peuvent être régulés et s'exprimer ou ne pas s'exprimer dans des conditions particulières. L'expression des gènes (**transcriptomique**) se traduit ensuite en termes de protéines produites par les bactéries (**protéomique**) ou de métabolites (**métabolomique**). Toutes ces dimensions fonctionnelles sont difficiles à appréhender et ajoutent des niveaux de complexité à la compréhension du rôle du microbiote vaginal.

Ce travail de thèse est centré sur l'étude de la composition et de la structure des communautés bactériennes des voies génitales des femmes.

### 3.2.2 Techniques de caractérisation

Trois méthodes de caractérisation du microbiote vaginal sont actuellement largement utilisées par les cliniciens et les scientifiques.

Cliniquement, le microbiote vaginal est catégorisé en deux grands types par l'utilisation des **critères d'Amsel**, définissant ainsi un état sain du microbiote vaginal, et un état pathologique appelée vaginose bactérienne (VB). Les critères d'Amsel permettent d'établir un diagnostic positif si au moins 3 des critères cliniques suivants sont présents : 1) sécrétions vaginales grises, homogènes et adhérentes à la paroi vaginale, 2) pH vaginal supérieur à 4,5, 3) odeur vaginale caractérisée de poisson avarié après mise en contact des pertes vaginales avec quelques gouttes d'hydroxyde de potassium à 10% ("*sniff test*" positif), et 4) présence de *clue cells* (au moins 20%) à l'examen microscopique à l'état frais des sécrétions vaginales [37]. La présence de *clue cells* et l'odeur caractéristique reflètent l'absence de bactéries du genre *Lactobacillus*, et la présence de bactéries anaérobies strictes et facultatives. En effet ces bactéries anaérobies strictes et facultatives sont supposées produire des amines comme la putrescine, la cadavérine et la triméthylamine qui réagissent en présence d'hydroxyde de potassium et forment des isocyanides (ou carbylamines) dont l'odeur caractérisée est celle de poisson avarié. De plus, ces amines réagissent avec les protons du milieu vaginal et font augmenter le pH vaginal. Ces critères présentent l'avantage de pouvoir être évalués facilement et d'ajouter une dimension phénotypique ou fonctionnelle à la caractérisation du microbiote vaginal, par la présence notamment de symptômes comme les sécrétions vaginales, symptômes qui pourraient se révéler tout aussi indicatif d'un état « sain » ou « pathologique » que la simple composition bactérienne. Pour répondre à cette question, la présence de symptômes est donc à évaluer au regard de la composition bactérienne, or ces critères ne permettent pas une résolution suffisamment importante pour distinguer les espèces ou genres en présence. De plus, d'autres espèces retrouvées dans l'écosystème vaginal de personnes « saines », comme *Lactobacillus spp.*, possèdent également la capacité génétique de produire ces amines [38], ce qui ne permet pas une réelle caractérisation microbiologique du microbiote vaginal via les critères d'Amsel.

Le **score de Nugent** est un score fondé sur la composition microbiologique du microbiote vaginal par détermination microscopique. Le score de Nugent dénombre les *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis* et bâtonnets Gram-négatifs incurvés sur un frottis vaginal à coloration de Gram [39]. Un score entre 7 et 10 indique une VB (pas de *Lactobacillus*, mais un nombre important de *G. vaginalis* et de morphotypes en bâtonnets Gram-négatifs incurvés) tandis qu'un score entre 0 et 3 correspond à un microbiote « normal » (de nombreux morphotypes *Lactobacillus*) et un score entre 4 et 6 à un microbiote intermédiaire. Même s'il est plus précis sur la composition bactérienne que les critères d'Amsel, ce score ne présente pas de résolution suffisamment importante pour distinguer ni les différentes espèces de *Lactobacillus*, qui pourraient se comporter différemment dans l'environnement vaginal, ni les différents genres et espèces de bactéries Gram-négatif.

Le **séquençage moléculaire** et à haut débit d'amplicons du gène de l'ARN ribosomal 16S a permis une caractérisation améliorée et en profondeur de la composition du microbiote vaginal [40–42]. Les séquences ainsi générées peuvent être regroupées entre elles par similarité jusqu'à un certain seuil, définissant ainsi des **Unités Taxonomiques Opérationnelles** (OTU). Ces OTU ne représentent pas forcément la phylogénie bactérienne mais correspondent à un degré de similarité génique. Alternativement, les séquences générées peuvent être comparées à des séquences ADN de référence auxquelles correspondent des taxons (espèces, genres ou familles). Cette approche par **phylotypes** peut se heurter à un manque de séquences de référence correspondant aux rangs taxonomiques les plus bas, tels que l'espèce pour certains genres. À noter que cette caractérisation moléculaire peut aussi reposer sur le séquençage d'autres gènes bactériens, tels que le gène de la *chaperonine-60* (*cpn60*) [43].

L'utilisation de cette dernière technique de caractérisation génère des tables de données de grande dimension puisque plusieurs centaines de phylotypes ou OTU peuvent être retrouvés dans un prélèvement vaginal. Cela implique un traitement statistique adapté à ces données de microbiote de grande dimension.

### 3.2.3 Traitement statistique des données de microbiote

Lorsque chacune des espèces bactériennes d'un écosystème tel que le microbiote vaginal est étudiée séparément, nous ne prenons pas en compte les effets d'équilibre, d'interdépendances ou de compensation entre espèces. C'est pourquoi il est nécessaire d'approcher la complexité de cet écosystème en combinant deux types d'analyses, correspondant à deux niveaux biologiques d'intégration : l'étude séparée des populations bactériennes spécifiques (au sens étymologique du terme : *qui qualifie une espèce*) et l'étude des équilibres communautaires bactériens.

#### Populations bactériennes spécifiques

Le séquençage génomique de l'ARNr 16S bactérien permet d'obtenir un nombre de spécimens (famille, genre ou espèce bactérienne) dans un prélèvement vaginal. Ce nombre total de spécimens (*totalcount*) peut varier d'une personne à l'autre, ou d'un prélèvement à l'autre.

**Données de comptage** Les données de microbiote dont nous disposons correspondent à des données de comptage de séquences, c'est-à-dire que nous avons le nombre de séquences pour

chaque espèce présente dans un échantillon. Cependant, le nombre total de séquences, connu sous le nom de profondeur de séquençage (*depth of coverage* ou *library size* ou *totalcount*) peut varier grandement d'un échantillon à un autre, par exemple si l'échantillonnage vaginal n'a pas été fait de la même manière. Cette grande variabilité de la profondeur de séquençage représente donc un premier écueil des données de microbiote. En effet, plus la profondeur de séquençage est grande, plus l'on a de spécimens dans l'échantillon, et plus l'on a de chances d'observer des bactéries.

Pour pallier ce premier écueil et normaliser la taille de la librairie, quatre approches ont été proposées. La première consiste à **raréifier** les données de comptage, c'est-à-dire à fixer une taille de librairie (ou nombre total de séquence par échantillon) minimum et à ramener tous les échantillons de taille de librairie supérieure à ce minimum par sous-échantillonnage aléatoire. Cette approche présente le double inconvénient d'omettre une partie des données disponibles, soit donc de perdre en puissance statistique, et d'introduire une variabilité supplémentaire du fait du sous-échantillonnage aléatoire. La deuxième approche consiste à fixer une taille de librairie minimale également, mais à ramener tous les échantillons de taille supérieure à ce minimum par une simple **mise à l'échelle** proportionnelle. Cette deuxième approche ne règle toutefois pas la question de l'omission d'une partie des données et de la perte de puissance statistique. La troisième approche consiste à prendre en compte les variations de taille de librairie par une variable de **pondération d'échelle** (*offset*). La quatrième approche consiste à rapporter l'abondance de chaque espèce bactérienne à la taille de la librairie d'un échantillon et à obtenir ainsi une **abondance relative**.

Lorsque l'on travaille sur des espèces bactériennes, on analyse séparément chaque espèce et son lien avec une issue clinique (*outcome*). Il s'agit de **données de comptage**, pour lesquelles on utilise classiquement des régressions de Poisson de type

$$\log(\lambda_i) = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} \quad (3.1)$$

avec  $E(Y) = \text{var}(Y) = \lambda$

*Nota Bene* : l'estimation des paramètres  $\beta$  est faite avec la méthode du maximum de vraisemblance.

La régression de Poisson est adaptée à la modélisation de variable dépendante discrète à distribution asymétrique.

Mais lorsque de très grande valeurs sont observées dans les données de comptage, comme c'est le cas lorsqu'une bactérie est absente chez beaucoup d'individus mais peut atteindre plusieurs milliers d'exemplaires dans un prélèvement, la variance est alors beaucoup plus grande que la moyenne, on dit qu'il y a surdispersion des données, ou **hétéroscédasticité**. La raréfaction ou l'utilisation de l'abondance relative permettent de normaliser les variances, mais ce faisant elles sous-estiment les variances et augmentent le risque d'erreurs de type I (faux positifs) [44]. Deux autres possibilités existent pour pallier ce deuxième écueil des données de microbiote. La première est d'utiliser la **régression binomiale négative**. L'équation est la même mais inclut un terme de dispersion.

$$\log(\lambda_i) = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \sigma \epsilon_i \quad (3.2)$$

avec  $E(Y) = \lambda$  et  $var(Y) = \lambda + \lambda^2/k$

Une autre possibilité pour pallier le problème de surdispersion des données est de procéder à une **transformation de stabilisation de la variance** (*variance stabilizing transformation*). Pour un modèle de Poisson où  $E(Y) = var(Y) = \lambda$ , il est possible de stabiliser la variance en utilisant la transformation  $Y \rightarrow \sqrt{Y}$ . Pour un modèle de régression binomiale où  $var(Y) \propto \lambda - \lambda^2$ , il est possible d'utiliser la transformation  $Y \rightarrow \arcsin\sqrt{Y}$ , tandis que pour un modèle de type lognormal où  $var(Y) \propto \lambda^2$ , la transformation à utiliser sera de type  $Y \rightarrow \log(Y)$ .

**Packages d'analyse de données de comptage** L'analyse des données de comptage par régression binomiale négative est implémentée dans le *package DESeq2* sur R [45]. Ce package permet d'estimer la dépendance moyenne-variance dans des données de comptage issues de séquençage à haut débit, et de tester l'expression différentielle de biomarqueurs (ici des phylotypes) via des modèles de régression binomiale négative.

L'analyse se décompose en trois étapes :

1. Estimer les facteurs de taille (*SizeFactors* ou *normalizationFactors*)
2. Estimer la dispersion des données (*dispersion*)
3. Tester statistiquement les coefficients d'une régression binomiale négative sur une issue clinique

**Données de comptage à excès de zéros** En plus de la surdispersion des données de comptage dans des données de microbiote, si la profondeur de séquençage est limitée, il est possible que des bactéries ne soient pas détectées dans un prélèvement alors qu'elles étaient présentes en faible quantité, ce qui induit un excès de zéros. On utilise alors une régression binomiale négative avec sur-représentation de zéros (*zero-inflated negative binomial regression*). Il s'agit de prendre en compte deux processus à l'œuvre dans les données de comptage : d'une part, quand il y a exposition à un évènement, l'évènement peut ne pas survenir ou survenir une fois, deux fois etc. Un zéro peut donc représenter la non-survenue d'un évènement alors même qu'il y avait exposition à l'évènement. D'autre part, il peut ne pas y avoir d'exposition à l'évènement du tout, ce qui empêche d'observer l'évènement alors qu'il aurait pu advenir. Ou alors, la durée d'exposition est trop faible pour qu'on puisse décemment observer l'évènement. En données de microbiote, cela se traduit ainsi : une bactérie peut être absente car elle est réellement absente dans cet écosystème, ou absente parce que l'échantillonnage était trop peu abondant pour pouvoir l'observer alors même qu'elle était peut-être présente dans l'écosystème en faible abondance. Dans ce deuxième cas, on ne peut observer l'évènement mais pour des raisons techniques, on parle alors de zéro technique.

La régression binomiale négative avec sur-représentation de zéros est un modèle qui combine à la fois un processus de Bernoulli (absence/présence) correspondant à l'excès de zéros techniques, et un processus binomial négatif (comptage des bactéries en présence, avec possibilité d'absence « réelle » de la bactérie).

Dans les deux parties du modèle (*zero-inflated* et *count model*), on prend en compte la profondeur de séquençage (*totalcount*) pour normaliser les quantités de spécimens observés entre les différents échantillons, en utilisant une pondération d'échelle (*offset(totalcount)*).

Une deuxième possibilité est d'utiliser des *packages* statistiques qui implémentent des modèles adaptés à cet excès de zéros tout en permettant de normaliser les comptes de bactéries qui varient grandement d'un échantillon à l'autre. Le *package* R *metagenomeSeq* permet cette prise en compte de zéros excessifs [46].

## Diversité

La diversité peut s'exprimer au sein d'une espèce, par exemple par des variations génétiques permettant l'adaptabilité de certains organismes individuels au sein d'une espèce dans certaines conditions (certaines souches d'une espèce bactérienne peuvent présenter une résistance aux antibiotiques tandis que d'autres souches y sont sensibles), mais aussi au sein d'une communauté (la  $\alpha$ -diversité) ou entre plusieurs communautés (la  $\beta$ -diversité).

La  $\alpha$ -diversité fait référence au nombre d'espèces retrouvées dans une communauté (*species richness*). Elle peut être mesurée par différents indices tels que l'indice de *Chao1*. Elle peut être combinée à une mesure d'uniformité (*evenness*), qui mesure la proximité en quantité des différentes espèces en présence (sont-elles présentes en quantités équivalentes ou dans des proportions très déséquilibrées?), tels que l'indice de diversité de Simpson. L'indice de diversité de Shannon combine ces mesures de richesse et d'uniformité des espèces d'une communauté. Il s'exprime ainsi :

$$H = - \sum_{(i=1)}^S p_i \log_2 p_i \quad (3.3)$$

L'indice de Simpson quant à lui, créé par Simpson en 1965 mesure la probabilité que deux individus tirés au sort dans la communauté bactérienne soient de la même espèce. Il s'exprime ainsi :

$$L = \sum_{(i=1)}^S [n_i(n_i - 1)]/[N(N - 1)] \quad (3.4)$$

Cette formule étant égale à 0 quand la diversité est maximale, il est possible d'inverser cette formulation pour obtenir l'indice de diversité de Simpson :

$$D = 1 - \sum_{(i=1)}^S [n_i(n_i - 1)]/[N(N - 1)] \quad (3.5)$$

Où  $S$  est la richesse spécifique soit le nombre d'espèces en présence, et  $p_i$  la proportion de l'espèce  $i$  par rapport au nombre total d'espèces  $S$ .

Contrairement à la  $\alpha$ -diversité qui mesure la diversité au sein d'un échantillon, la  $\beta$ -diversité fait référence à la diversité observée entre échantillons, par exemple dans une population humaine [47]. Elle mesure la similitude ou la différence de composition ou de structure bactérienne entre deux échantillons.

## Communautés bactériennes

Quand des populations de bactéries se mélangent pour former des communautés, un équilibre des populations va se former, et les fonctions assurées par la communauté peuvent être réparties entre les espèces en présence. Les fonctions assurées par une population bactérienne peuvent donc changer selon qu'elle agit seule, ou en communauté avec d'autres populations bactériennes. C'est pourquoi une analyse par population bactérienne doit être combinée à une analyse des équilibres communautaires.

Par ailleurs, quand une population bactérienne est absente d'un prélèvement, cela signifie que d'autres populations se sont accaparées la niche écologique, donc étudier une population bactérienne sans prendre en compte les effets de remplacement peut mener à des erreurs. L'absence d'une espèce « a » peut signifier la présence d'une espèce « b », ou d'une espèce « c ». Et si les deux espèces « b » et « c » ont des actions antagonistes, les résultats de l'analyse par espèce ne permettront pas de mettre en évidence d'action ou d'association pour l'espèce « a ».

Pour travailler sur des données de communautés bactériennes, un nombre arbitraire de communautés types ont été établies, fondées sur la similarité de leur composition. Ces types d'état communautaire (*community state types – CST*) n'ont pas de définition précise, mais correspondent à des tendances observées. Elles sont heureusement suffisamment différentes les unes des autres pour pouvoir clairement les identifier, et pour pouvoir classer un nouvel échantillon vaginal dans l'un ou l'autre de ces CST. La littérature scientifique actuelle identifie 5 grands types d'état communautaire [48] quelle que soit la population étudiée à travers le monde, eux-mêmes divisés en sous-catégories. La composition d'une communauté bactérienne n'est donc pas aléatoire et le champ des possibles équilibres n'est pas infini.

**Regroupement hiérarchique** Il existe plusieurs méthodes non supervisées de caractérisation des types d'état communautaire. La première de ces méthodes est le **regroupement hiérarchique** (*hierarchical clustering*). Le principe est le suivant :

- Les échantillons vaginaux sont comparés deux-à-deux en terme de composition bactérienne, et une **distance** est calculée pour chaque paire d'échantillon. Pour  $n$  échantillons, on obtient une matrice symétrique de distance de dimension  $n \times n$ , avec  $n^2/2 - n/2$  valeurs de distance uniques. La méthode pour calculer la similarité, la dissimilarité ou la distance est arbitraire. Les distances les plus communément utilisées sont la **distance euclidienne** et la **distance de Jensen-Shannon**. Le choix de l'une de ces méthodes se fait sur sa capacité à mettre en exergue des groupes cohérents, à démarcations nettes. La méthode choisie est celle permettant la meilleure introspection dans les données.

- Les deux échantillons les plus similaires sont regroupés en un **groupe** (*cluster*) et la distance entre ce groupe et les autres échantillons est recalculée.
- Sur la base de cette nouvelle matrice à dimension  $(n - 1) \times (n - 1)$  (puisque'il y a maintenant un groupe à la place de deux échantillons), les deux échantillons ou le groupe et l'échantillon ou les deux groupes les plus similaires sont regroupés.

Cette démarche est réitérée jusqu'à ce qu'il ne reste que deux groupes, qui sont alors regroupés en un seul. La manière de regrouper les échantillons en un groupe et de comparer ce groupe aux autres échantillons ou aux autres groupes en termes de distance est également arbitraire. Il est possible par exemple de calculer la moyenne des mesures d'abondance de chaque espèce bactérienne entre les deux échantillons à regrouper et de comparer ces valeurs moyennes d'abondance d'une espèce bactérienne aux valeurs d'abondance de la même espèce pour les autres échantillons, puis de regrouper les deux clusters ou l'échantillon et le cluster pour lesquels cette distance est minimale. Cette méthode porte le nom de **liaison centroïde** (*centroid linkage*). Il est possible de comparer un échantillon à un groupe en le comparant à son élément le plus proche, et non à la moyenne de tous les éléments le composant, ce qui correspond à la méthode de **liaison simple** (*single-linkage*). L'autre extrême consisterait à comparer un échantillon à un groupe en le comparant à son élément le plus éloigné, ce qui porte le nom de **liaison complète** (*complete-linkage*). La **liaison de Ward** consiste à calculer la somme des déviations au carré des éléments de deux groupes vis-à-vis du centre du groupe résultant de la fusion de deux groupes.

TABLE 3.1 – Méthodes de calcul de distance entre groupes les plus utilisées

Méthode	Définition	Equation mathématique
<i>Single-linkage</i>	Distance entre les éléments les plus proches de deux groupes	$D(c_1, c_2) = \min_{x_1 \in c_1, x_2 \in c_2} (D(x_1, x_2))$
<i>Complete-linkage</i>	Distance entre les éléments les plus éloignés de deux groupes	$D(c_1, c_2) = \max_{x_1 \in c_1, x_2 \in c_2} (D(x_1, x_2))$
<i>Average linkage</i>	Distance moyenne de toutes les distances deux-à-deux des éléments de deux groupes	$D(c_1, c_2) = \frac{1}{c_1} * \frac{1}{c_2} * \sum_{x_1 \in c_1} \sum_{x_2 \in c_2} D(x_1, x_2)$
<i>Centroid linkage</i>	Distance entre la moyenne (soit le centre) des éléments de deux groupes	$D(c_1, c_2) = D\left(\left(\frac{1}{c_1} * \sum_{x \in c_1} \vec{x}\right), \left(\frac{1}{c_2} * \sum_{x \in c_2} \vec{x}\right)\right)$
<i>Ward linkage</i>	Ecart-type minimal entre les éléments des deux groupes vis-à-vis du centre du groupe résultant de la fusion des deux groupes ( <i>aggregate deviation</i> )	$TotalDistance_{c_1 \cup c_2} = \sum_{x \in c_1 \cup c_2} D(x, \mu_{c_1 \cup c_2})^2$

La distance choisie permet de comparer les échantillons entre eux, tandis que le type de liaison choisie permet de comparer des groupes entre eux, ou des groupes avec des échantillons.



La limite de la liaison simple est que cela regroupe les échantillons et les groupes de proche en proche, et ne permet pas d'identifier des groupes sphériques clairement différents les uns des autres. La liaison complète donne l'équivalent du diamètre du nouveau regroupement si l'on représente les échantillons sur un plan, et cherche donc à minimiser ce diamètre pour former des groupes les plus compacts possibles. La liaison moyenne a la propriété d'être moins affectée par les valeurs extrêmes. La liaison de Ward ne cherche pas à minimiser le diamètre final du groupe résultant de la fusion de deux groupes comme dans le cas d'une liaison complète, mais à minimiser l'écart-type entre les éléments des deux groupes et le centre du groupe ainsi formé (tableau 3.1).

L'une des limites majeures du regroupement hiérarchique est que chaque classification est relative à l'échantillon total de l'étude (par exemple l'ensemble des prélèvements vaginaux disponibles dans une étude). Dans le pire des cas, un même échantillon vaginal pourrait être classé dans deux groupes différents selon la composition vaginale des autres échantillons vaginaux, et notamment des échantillons les plus similaires, pour deux groupes peu différenciés. C'est pourquoi il est important d'avoir des groupes aussi compacts que possible, aux bords clairs, et donc de choisir les distances entre échantillons et entre groupes permettant ces regroupements compacts. Cela est d'autant plus facile qu'il y a peu de groupes à définir. En effet, plus l'on s'approche d'un niveau de granularité important dans la définition des groupes, plus les groupes sont proches et plus le risque de misclassification est important. Il est par exemple plus facile de faire des erreurs de classement d'un échantillon entre les sous-types CST III-A et CST III-B, qu'entre les types CST III et CST I.

*Nota Bene* : le regroupement hiérarchique s'effectue sur des données normalisées, par exemple en travaillant en abondance relative, et non en abondance absolue des populations bactériennes.

**Analyse en composantes principales** Une deuxième méthode non supervisée de caractérisation des types d'état communautaire est l'analyse en composantes principales ou ACP (*Principal Component Analysis - PCA*). L'ACP est basée sur le principe de la projection géométrique des points d'un espace à hautes dimensions sur un nombre restreint de dimensions. De nouvelles variables sont créées (appelées composantes), correspondant à des combinaisons linéaires des variables utilisées au départ, de telle sorte que ces composantes captent une grande partie de la variabilité des données. Le nombre de combinaisons linéaires des variables initiales est potentiellement infini. L'ACP permet de choisir le nombre de composantes principales que l'on souhaite retenir. Autant de composantes que de variables initiales sont générées mais elles sont classées selon la part de variabilité des données qu'elles capturent. On peut utiliser la ou les deux ou les trois premières composantes pour représenter les données sur un espace uni-, bi- ou tri-dimensionnel tout en conservant l'essentiel de l'information sur la variabilité des données.

Les données représentées sur le nouveau système de coordonnées peuvent apparaître comme des amas de points plus ou moins distincts, que l'on peut alors partitionner en groupes. Dans le cas du microbiote vaginal, les groupes obtenus correspondent aux types d'état communautaire obtenus par regroupement hiérarchique, avec un continuum entre certains groupes [42]. De ce fait, le regroupement hiérarchique permet de mettre en évidence des groupes plus compacts et plus faciles à délimiter.

À l'instar du regroupement hiérarchique, cette méthode est limitée par le fait que la classification est relative à l'échantillon total de l'étude. Elle peut donc varier et classer différemment certaines observations si des échantillons sont ajoutés ou enlevés de l'échantillon total. Pour obtenir une classification robuste qui ne dépende pas de la taille et de la nature de l'échantillon total, il est nécessaire de passer par des méthodes de classification supervisées, comme le *support vector machine*.

**Support Vector Machine** Le *support vector machine* (SVM) est un algorithme permettant de trouver le meilleur modèle séparant des données en deux ou plusieurs groupes. Pour deux groupes, possédant deux dimensions (ou deux espèces bactériennes dans notre cas), le SVM va permettre de déterminer l'équation de la ligne séparant au mieux les points des deux groupes sur un plan à 2 dimensions. Pour cela, l'algorithme maximise les deux distances séparant les deux points appartenant à deux groupes différents les plus proches par rapport à la ligne tracée, aussi appelées les marges. Les points les plus proches sont appelés les vecteurs-support, d'où le nom de la méthode. Cette méthode marche également pour des données avec plus de deux groupes, et plus de 2 dimensions. Le SVM va alors calculer les différentes lignes, ou plans, ou même hyperplans permettant de séparer au mieux des groupes donnés.

Pour cela, il est nécessaire de fournir à l'algorithme des données déjà classées en groupes. Ce que le modèle pourra faire par la suite est de classer tout nouvel échantillon dans ce plan à plusieurs dimensions, séparé par des hyperplans, c'est-à-dire de déterminer à quel groupe appartient le nouvel échantillon.

L'utilisation d'un SVM a été rendue possible par la récente génération de données de séquençage du microbiote vaginal. En effet, plusieurs études à travers le monde ont été menées depuis une dizaine d'années pour décrire la composition du microbiote vaginal dans différentes populations, avec des méthodes comparables. La large base de données résultante a été classée en différents CST par regroupement hiérarchique, et cette classification a été utilisée pour entraîner l'algorithme SVM et déterminer les hyperplans séparant les différents groupes. Par la suite, il est possible de prédire l'appartenance à un groupe de tout nouvel échantillon vaginal en fonction de sa composition en populations bactériennes.

*Nota Bene* : Pour se faire, il est nécessaire que la composition en populations bactériennes des échantillons ait été normalisée, par exemple en travaillant en abondance relative, et non en abondance absolue des populations bactériennes.



## Chapitre

# 4

## Questions de recherche

### 4.1 Contexte

*C. trachomatis* est la bactérie pathogène responsable de l'IST la plus prévalente dans le monde, notamment chez les jeunes femmes. Jusqu'à présent, le contrôle de cette infection a reposé sur la prévention primaire (notamment l'usage du préservatif) et le dépistage spontané ou planifié. Malgré ces efforts, son incidence et sa prévalence sont en constante augmentation, et l'incidence est probablement sous-estimée du fait que l'infection est essentiellement asymptomatique. Ces données motivent le développement de solutions comme la recherche sur un vaccin anti-*Chlamydia*, qui bien que nécessaire est aussi problématique. En effet, si l'objectif d'un tel vaccin est de réduire drastiquement la prévalence globale de l'infection, un effort de vaccination considérable serait nécessaire (l'infection disparaîtrait au bout de 20 ans avec une couverture de 100% des garçons et des filles avant le début de la vie sexuelle [49]). Étant donnée la faible adhésion pour le vaccin du papillomavirus dans la même tranche d'âge (moins de 20% en France [50]), cette stratégie est peu prometteuse. En revanche, si la stratégie ne consiste pas à réduire le réservoir de l'infection mais uniquement à éviter l'évolution de l'infection vers une IGH, alors il est nécessaire de cibler les individus à risque afin d'augmenter le coût-efficacité de cette stratégie. Le ciblage d'une population repose sur l'identification de marqueurs biologiques ou sociodémographiques, et est également un enjeu dans le dépistage de l'infection par *C. trachomatis*.

Mais au-delà de l'acquisition de l'infection, d'autres aspects de l'infection sont clés. L'**histoire naturelle** de l'infection par *C. trachomatis* fait référence à toutes les étapes du processus infectieux, depuis la colonisation de l'hôte par la bactérie, l'infection, la coévolution, la clairance naturelle ou par traitement, la réinfection, et l'évolution vers des complications (figure 4.1). *C. trachomatis* étant une bactérie pathogène stricte, les étapes de colonisation et d'infection sont indissociables et correspondent à la phase d'acquisition de la bactérie. Dans cette histoire naturelle, les caractéristiques épidémiologiques observées en population indiquent plusieurs zones d'ombre : tous les contacts sexuels non protégés avec une personne infectée ne mènent pas

à une infection ; la plupart des infections sont asymptomatiques ; la moitié des infections se résolvent spontanément dans l'année en l'absence de traitement ; il existe une proportion non négligeable de réinfections dans un laps de temps relativement court (un an) ; enfin, seules certaines femmes vont présenter à moyen terme des IGH. Ces éléments dépendent nécessairement en partie de caractéristiques intrinsèques de l'hôte, et pas seulement d'expositions externes – e.g. pratiques sexuelles –, comme la génétique ou le microbiote vaginal. Ce constat ouvre la porte à la possibilité d'identifier des biomarqueurs de l'infection aux différentes étapes de l'histoire naturelle de celle-ci.

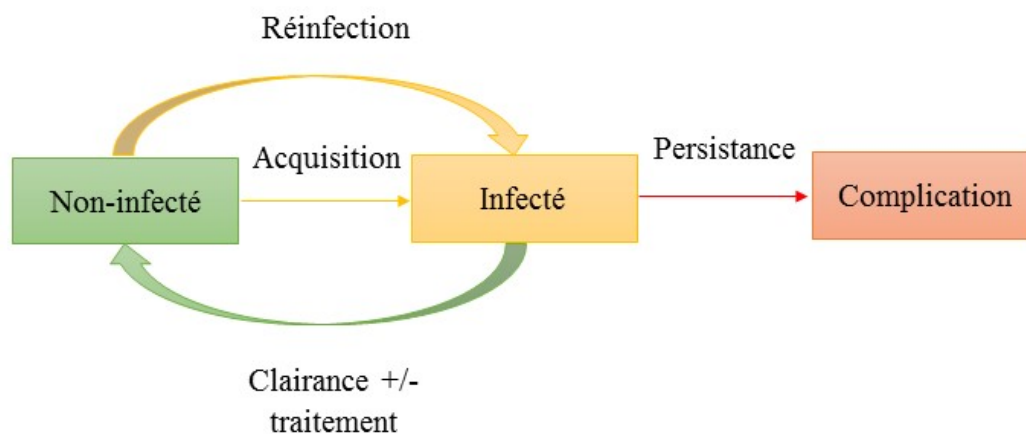


FIGURE 4.1 – Histoire naturelle de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Par ailleurs, nous savons que le microbiote vaginal joue le rôle crucial de barrière microbologique de la muqueuse vaginale, d'autant plus crucial qu'à la différence de la peau, les muqueuses sont extrêmement perméables. Les bactéries en présence, notamment *Lactobacillus* spp., préviennent les infections par la compétition écologique, la production d'acide lactique permettant de maintenir un pH faible (pH<4,0), et la production de bactériocines spécifiques de pathogènes. Ces fonctions sont assurées par des microbiotes vaginaux qui varient en composition selon l'hôte.

Dans le domaine de l'infection par le VIH, il a été démontré qu'un microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* et où des bactéries anaérobies étaient retrouvées en grand nombre était associé à une prévalence quatre fois plus élevée d'infections par le VIH [51]. De plus, en travaillant sur des cas incidents, le taux d'acquisition de l'infection par le VIH est également quatre fois plus élevé chez les femmes présentant un microbiote vaginal pauvre en *Lactobacillus* [52]. Certains mécanismes biologiques ont été mis en évidence, comme une plus grande inflammation des voies génitales et la présence de lymphocytes T CD4+, qui expliquent cette plus grande susceptibilité.

De même, il est possible que le microbiote vaginal joue un rôle important dans la susceptibilité vis-à-vis de l'infection par *C. trachomatis* mais également à d'autres étapes de l'histoire naturelle de celle-ci. La disponibilité de nouvelles techniques moléculaires depuis un peu plus

d'une décennie a permis de mieux caractériser le microbiote vaginal. Comme nous l'avons vu, le microbiote vaginal est un écosystème dans lequel plusieurs espèces bactériennes (mais aussi des virus et des eucaryotes) vivent en équilibre dynamique. Ce microbiote vaginal est donc fluctuant et susceptible d'être modifié au cours du temps par un ensemble d'expositions, parmi lesquelles les pratiques sexuelles et pratiques d'hygiène intime, mais aussi l'exposition aux antibiotiques et la présence de pathogène.

## 4.2 Objectifs

Dans cette thèse nous nous intéressons donc à ce triangle d'associations entre expositions, microbiote vaginal et infection par *C. trachomatis* (figure 4.2). L'objectif général de cette thèse est **d'étudier la composition et la dynamique du microbiote vaginal, ses facteurs associés et son rôle dans l'infection par *C. trachomatis*.**

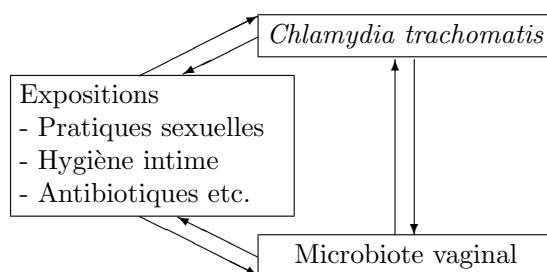


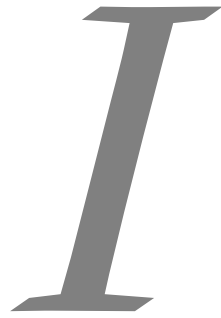
FIGURE 4.2 – Représentation schématique des associations entre expositions, infection par *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal.

Cet objectif de thèse se décline en plusieurs questions spécifiques :

- Existe-t-il des marqueurs « microbiotaux » de l'infection par *C. trachomatis* ?
- La composition et la structure du microbiote vaginal sont-elles modifiées par l'infection par *C. trachomatis* et la prise d'un traitement antibiotique ?
- Quels sont les facteurs permettant d'expliquer des variations de microbiote vaginal prédisposant ainsi à l'acquisition d'IST ?

L'étude de ces questions s'est structurée en quatre parties, dont les deux premières portent sur l'association entre l'infection par *C. trachomatis* et le microbiote vaginal et les deux suivantes sur les facteurs associés à la composition et à la dynamique du microbiote vaginal. La partie I consiste en un travail d'étude comparée avec trois autres IST génitales d'importance clinique. La partie II porte sur l'association entre microbiote vaginal et infection par *C. trachomatis* dans deux études en France et aux Etats-Unis. La troisième partie porte sur l'impact de la prise d'antibiotique dans le traitement de l'infection par *C. trachomatis* sur le microbiote vaginal. Enfin, la partie IV s'intéresse aux facteurs associés à la dynamique du microbiote vaginal.





---

**Etude comparée de l'association entre  
microbiote vaginal et infections  
sexuellement transmissibles**

---





## Chapitre

# 5

## Introduction

Ce chapitre et les chapitres suivants (6, 7 et 8) présentent des travaux ayant fait l'objet d'une publication dans « Clinical Microbiology and Infection » (Appendice A).

### 5.1 Infections sexuellement transmissibles d'importance clinique

Le papillomavirus humain (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Mycoplasma genitalium* sont quatre des infections génitales les plus prévalentes. Elles touchent principalement les jeunes adultes et peuvent évoluer vers des complications majeures sur le long terme. En 2012, il y avait 127 et 27 millions d'adultes vivant respectivement avec *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* à travers le monde [2]. Les deux infections sont majoritairement asymptomatiques [18]. Si elle n'est pas traitée, l'infection par *C. trachomatis* peut mener à des IGH, des grossesses extra-utérines et de l'infertilité tubaire [53]. L'infection par *C. trachomatis* est également associée à des issues de grossesse défavorables telle que la chorioamnionite [54], l'accouchement prématuré [55], et le faible poids à la naissance [56]. *M. genitalium* est une IST émergente. Sa prévalence dans les populations à faible risque et à haut risque à travers le monde est estimée à 2,0% et 7,3% respectivement [3]. Il est suggéré qu'elle est associée à l'urétrite, la cervicite [57], l'IGH [58] et l'infertilité tubaire [59]. Ces éléments combinés à sa haute prévalence proche de celle de *C. trachomatis*, en font un sujet de préoccupation. Les infections par HPV sont fortement associées au cancer de col de l'utérus [60–63], en particulier les génotypes HPV 16 et 18. Jusqu'à 80% des femmes seront infectées par HPV au cours de leur vie [64].

## 5.2 Rôle potentiel du microbiote vaginal dans la susceptibilité aux infections sexuellement transmissibles

Cependant, tous les contacts sexuels avec ces pathogènes ne débouchent pas sur une infection, et toutes les infections n'évoluent pas en complications sur le long terme, ce qui suggère que des facteurs tels que le microbiote vaginal, l'immunité innée et adaptative de l'hôte, les capacités adaptatives (*fitness*) du pathogène et sa charge pourraient moduler l'histoire naturelle de ces infections. Le séquençage moléculaire et à haut débit d'amplicons du gène de l'ARN ribosomal 16S a permis une caractérisation améliorée et en profondeur de la composition du microbiote vaginal [40–42]. Ces études ont identifié plusieurs types de microbiotes vaginaux qui sont soit dominés par une espèce de *Lactobacillus* parmi quatre (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* et *L. jensenii*), soit caractérisés par un manque de *Lactobacillus* spp. et un ensemble divers de bactéries anaérobies strictes et facultatives. Ce dernier type est associé à un score de Nugent élevé, un outil de recherche utilisé pour diagnostiquer la vaginose bactérienne (VB). Le score de Nugent dénombre le nombre de *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis* et bâtonnets Gram-négatifs incurvés sur un frottis vaginal à coloration de Gram. Un score entre 7 et 10 indique une VB (pas de *Lactobacillus*, mais un nombre important de *G. vaginalis* et de morphotypes en bâtonnets Gram-négatifs incurvés) tandis qu'un score entre 0 et 3 correspond à un microbiote « normal » (de nombreux morphotypes *Lactobacillus*) et un score entre 4 et 6 à un microbiote intermédiaire. Cliniquement, la VB est évaluée par l'utilisation des critères d'Amsel, qui établit un diagnostic positif si au moins 3 des critères cliniques suivants sont présents :

1. sécrétions vaginales grisâtres, homogènes et adhérentes à la paroi vaginale,
2. pH vaginal supérieur à 4.5,
3. odeur vaginale caractérisée de poisson avarié après mise en contact des pertes vaginales avec quelques gouttes d'hydroxyde de potassium à 10% ("sniff test" positif),
4. présence de *clue cells* (au moins 20%) à l'examen microscopique à l'état frais des sécrétions vaginales.

Quelle que soit la manière dont elle est diagnostiquée, la VB peut être associée à une odeur rapportée par les patientes, des sécrétions vaginales inhabituelles et des démangeaisons, mais dans de nombreux cas elle peut être asymptomatique. Nous faisons l'hypothèse que le microbiote vaginal interagit avec les pathogènes sexuellement transmissibles de deux manières : des microbiotes vaginaux différents peuvent contribuer différenciellement à la physiopathologie des infections génitales et de leurs séquelles, et les pathogènes sexuellement transmissibles peuvent influencer la composition du microbiote vaginal. Cette interaction biologique putative à double sens devrait donc être reflétée par une association statistique à la fois dans les études transversales et les études longitudinales. Une connaissance approfondie de ces aspects pourrait poser les fondements nécessaires pour le développement de probiotiques qui pourraient constituer une approche de prévention et/ou de restauration plus efficace et plus simple. Notre revue constitue un premier pas vers une clarification des interrelations entre pathogènes sexuellement transmissibles et microbiote vaginal.

## 5.3 Objectif de la revue systématique

L'objectif de cette revue systématique est d'évaluer l'association statistique entre *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, et les infections par HPV, quatre des IST les plus com-

---

munes, et le microbiote vaginal, dans les études transversales et dans les études longitudinales.



## Chapitre

# 6

## Méthodes de la revue systématique et méta-analyse

### 6.1 Recherche documentaire

Medline et le Web of Science ont été sondées de Janvier 2000 à Décembre 2016 (dernière recherche le 1er janvier 2017) pour toutes les études pertinentes sur l'association entre microbiote vaginal et les infections à HPV, *C. trachomatis*, *M. genitalium* et *N. gonorrhoeae*.

Les termes utilisés pour la recherche étaient ("human papillomavirus" OR "Chlamydia trachomatis" OR "Neisseria gonorrhoeae" OR "Mycoplasma genitalium") AND (\*genital OR vagin\*) AND ("microbiota" OR "microbiome" OR "vaginosis" OR "lactobacill\*"). Les listes de références des publications ont été fouillées manuellement pour obtenir des références additionnelles.

Les titres et les résumés d'articles ont été revus par JT et EDA et seules les publications pertinentes ont été retenues pour lecture complète. Pour être éligibles pour l'analyse, les articles publiés devaient correspondre aux critères d'inclusion suivants :

- Association entre une des infections susmentionnées et l'état du microbiote, caractérisé par séquençage d'amplicons du gene de l'ARNr 16S, score de Nugent [39], critères d'Amsel [37] ou la seule présence de *clue cells* [65]
- Population humaine et féminine
- Schémas d'étude en cohorte, transversal ou interventionnel
- Méthodes pour la détection des IST fondées sur la PCR

Critères d'exclusion :

- Population positive pour le VIH (sauf si stratifié sur le statut VIH) ou proportion de participantes positives pour le VIH supérieure à 10% de l'échantillon total
- Grossesse
- Revues de littérature, lettres et éditoriaux

— Faible taille d'échantillon (<30)

## 6.2 Extraction de données

Pour chaque étude, les données suivantes ont été extraites : date de publication, auteurs, schéma d'étude, population d'étude, tranche d'âge, taille d'échantillon, lieu de l'étude, méthodes pour la caractérisation du microbiote et le diagnostic d'IST, mesure de l'association ou données brutes, prévalence de la VB si applicable, prévalence de l'IST d'intérêt (tableau 6.1).

Pour cette méta-analyse, nous avons dichotomisé le microbiote vaginal en deux catégories, nommément microbiote vaginal à faible *Lactobacillus* (*low-Lactobacillus vaginal microbiota* - LL-VMB) et microbiote vaginal à haut *Lactobacillus* (*high-Lactobacillus vaginal microbiota* - HL-VMB). LL-VMB est caractérisé par un manqué de *Lactobacillus* et un large éventail de bactéries anaérobies strictes et facultatives. Cette définition corrèle bien la catégorie 7-10 du score de Nugent et un test d'Amsel positif, ainsi que la présence de *clue cells*. HL-VMB correspond à des types d'états communautaires dominés par *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* ou *L. jensenii*, un score de Nugent entre 0 et 6, et un test d'Amsel négatif.

## 6.3 Analyse statistique

### 6.3.1 Mesure d'association

Un modèle à effets aléatoires supposant l'hétérogénéité des études, inclus dans la commande *metan* de Stata 14.0 a été utilisé pour résumer les tailles d'effet (*effect size* – ES). Les tailles d'effet étaient soit des odds-ratios (OR), des risques relatifs (RR), des hazard ratios (HR) ou des ratios de taux d'incidence (IRR). Quand une mesure d'association ajustée était disponible avec des informations sur les facteurs de confusion, cette mesure et son intervalle de confiance (IC) à 95% étaient utilisés pour la méta-analyse plutôt que l'estimation brute. Quand aucune mesure d'association n'était disponible, les données brutes étaient utilisées pour calculer un OR et son IC à 95% par la méthode de Mantel-Haenzel. Les estimations d'association extraites des études sélectionnées et leurs IC sont présentés sur des diagrammes en forêt (*forest plots*).

### 6.3.2 Evaluation du risque de biais et hétérogénéité des études sélectionnées

Pour chaque IST considérée dans cette revue, des graphiques en entonnoir (*funnel plots*) ont été réalisés pour évaluer l'existence d'un biais de publication. Ces graphiques ont été combinés à des tests d'egger. Le test bilatéral Q d'homogénéité de Cochran [66] et la statistique  $I^2$  ont été utilisés pour évaluer l'hétérogénéité des mesures d'association au sein des études incluses dans la méta-analyse. Des analyses de sous-groupes ont été effectuées quand le test Q était statistiquement significatif au risque de 5% ou si la statistique  $I^2$  était supérieure à 50%, pour identifier les sources potentielles d'hétérogénéité. Le test bilatéral Q d'homogénéité de Cochran a également été utilisé pour comparer les sous-groupes.

La qualité méthodologique des études sélectionnées au seul regard de l'objectif de recherche de cette revue a été évaluée par le biais de l'échelle de Newcastle-Ottawa, qui consiste en un système de points ("*star system*"), avec un maximum de 9 étoiles à attribuer par étude (tableau A.1).

Des analyses de sensibilité ont été effectuées pour *N. gonorrhoeae* et *C. trachomatis* excluant deux études qui présentaient leur score de Nugent en trois groupes : 0-3, 4-6 et 7-10 et fournissaient des estimations de mesure d'association en prenant la catégorie 0-3 comme référence au lieu des catégories 0-3 et 4-6 ensemble (Francis *et al.* (2014), Brotman *et al.* (2010), voir figure A.1).



TABLE 6.1 – Caractéristiques des études sélectionnées pour la méta-analyse.

Ref	Année	Auteur 1	Pays	Type d'étude	Type de données	Dates étude	Age*	Population	N**	Caractérisation	IST
[67]	2001	Castle PE	Costa Rica	Etude cas-témoin prévalente nichée	A l'inclusion	Recrutées 1993-1994	18-ND	Population générale	193	Nugent	HPV
[68]	2001	Moscicki AB	USA	Cohorte prospective	Longitudinales	1990-2000	13-21	Planification familiale	105	Amsel	HPV
[69]	2002	Ness RB	USA	Cohorte prospective	A l'inclusion	Recrutées 05/1999-06/2001	16-36	Cliniques IST, planification familiale	1181	Nugent	CT, NG
[70]	2002	Wiesenfeld HC	USA	Etude transversale	Transversales	1998-2001	15-30	Cliniques IST, partenaire avec uréthrite	255	Nugent	CT
[57]	2003	Manhart LE	USA	Etude transversale	Transversales	1984-1986	16-45	Cliniques IST	719	Amsel	MG
[71]	2003	Mao C	USA	Cohorte prospective	Longitudinales	Recrutées 09/1990-08/1997	18-24	Etudiantes	516	Amsel	HPV
[72]	2003	Yen S	USA	Cohorte prospective	A l'inclusion	Recrutées 06/1999-06/2000	17-33	Entrée dans les US Marine Corps	1674	Nugent	CT, NG
[73]	2004	Garcia PJ	Pérou	Etude transversale	Transversales	12/1997-06/1998	18-67	Clubs de mères dans villages reculés	745	Nugent, Amsel	CT
[74]	2005	Uma S	Inde	Etude transversale	Transversales	06/2004-12/2004	18-40	Travailleuses du sexe	582	Nugent	CT, NG
[75]	2007	Kaul R	Kenya	Essai contrôlé randomisé	Longitudinales	1998-2002	18-52	Travailleuses du sexe	416	Nugent	CT, NG
[76]	2008	Allsworth JE	USA	Etude transversale	Transversales	2001-2004	20-49	Population générale	1055	Nugent	HPV
[77]	2009	Kapiga S	Afrique du Sud	Cohorte prospective	Longitudinales	Recrutées 06/2003-10/2004	16-62	Population générale	479	Nugent	CT, NG

Ref	Année	Auteur 1	Pays	Type d'étude	Type de données	Dates étude	Age*	Population	N**	Caractérisation	IST
[78]	2009	Nam KH	Corée du Sud	Etude transversale	Transversales	09/2002-05/2006	ND-ND	Cytologie cervicale anormale	473	Amsel	HPV
[79]	2009	Rahkola P	Finlande	Etude transversale	Transversales	ND-ND	18-69	Frottis normal ou cytologie cervicale anormale	257	Clue cells	HPV
[80]	2009	Verteramo R	Italie	Etude transversale	Transversales	2000-2006	17-57	Gynécologie	857	Amsel	HPV
[81]	2009	Yoshimura K	Japon	Etude transversale	Transversales	01/2007-12/2007	ND-ND	Cervicites ou symptômes proches	406	Nugent	CT
[82]	2010	Brotman RB	USA	Cohorte prospective	Longitudinales	1999 - 2002	15-44	Consultation de routine	3077	Nugent	CT, NG
[83]	2010	Oakeshott P	UK	Cohorte prospective	Longitudinales	2004-2007	16-28	Etudiantes	873	Nugent	MG
[84]	2010	Znazen A	Tunisie	Etude transversale	Transversales	08/2007-09/2007	Moy. 34	Travailleuses du sexe	188	Nugent	CT
[85]	2011	Caiyan X	Chine	Etude transversale	Transversales	03/2007-09/2009	25-54	Population générale	6185	Amsel	HPV
[86]	2011	Marconi C	Brésil	Etude transversale	Transversales	06/2006-02/2008	18-45 (pour 86.6%)	Symptômes génitaux	142	Nugent	CT
[87]	2011	Wiley DJ	USA	Essai contrôlé randomisé	A l'inclusion	10/1998-10/1999	16-23	Population générale	2255	Amsel	HPV
[88]	2012	Oakeshott P	UK	Cohorte prospective	Longitudinales	2004-2007	16-27	Etudiantes	821	Nugent	HPV
[89]	2013	Bradshaw CS	Australie	Cohorte prospective	Longitudinales	Recrutées 05/2007-08/2008	16-25	Cliniques IST, planification familiale	1093	Nugent	CT, NG
[90]	2013	Lazenby GB	Tanzanie	Etude transversale	Transversales	ND-ND	30-60	Villages ruraux	323	Nugent	HPV
[91]	2013	Watson-Jones D	Tanzanie	Essai contrôlé randomisé	A l'inclusion	10/2007-07/2010	10-25	Etudiantes, planification familiale	117	Nugent	HPV

Ref	Année	Auteur 1	Pays	Type d'étude	Type de données	Dates étude	Age*	Population	N**	Caractérisation	IST
[92]	2014	Aghaizu A	UK	Cohorte prospective	Longitudinales	2004-2007	16-27	Etudiantes	907	Nugent	CT
[93]	2014	Brotman RB	USA	Cohorte prospective	Longitudinales	12/2005-03/2007	22-53	Population générale, Gynécologie	32	16S	HPV
[94]	2014	Francis SC	Tanzanie	Cohorte prospective	Longitudinales	2008-2010	18-44	Travailleuses de bars et hotels	956	Nugent	CT, NG
[95]	2014	Huppert JS	USA	Etude transversale	Transversales	07/2006-08/2008	14-22	Teen Health Center ou Urgences	209	Amsel	MG
[96]	2015	Abbai NS	Afrique du Sud	Essai contrôlé randomisé	Longitudinales	2003-2005	18-49	Planification familiale	435	Amsel	CT, NG
[97]	2015	Caixeta RC	Brésil	Etude transversale	Transversales	01/2008-02/2009	15-25	Centres de soins	251	Clue cells	HPV
[98]	2015	Liu J	Chine	Etude transversale	Transversales	07/2013-06/2014	18-66	Gynécologie	4290	Amsel	HPV
[99]	2015	Marks MA	Thaïlande	Cohorte prospective et rétrospective	A l'inclusion	2002-2003	20-37	Planification familiale	1201	Amsel	HPV
[100]	2015	Mitra A	UK	Etude transversale	Transversales	ND-ND	23-45	Gynécologie (colposcopie)	117	16S	HPV
[101]	2015	Mongelos P	Paraguay	Etude transversale	Transversales	10/2010-11/2011	Méd. 30	Population indigène	181	Nugent	HPV, CT
[102]	2015	Oh HY	Corée du Sud	Cohorte prospective	A l'inclusion	03/2006-01/2015	18-65	Gynécologie/ Oncologie	120	16S	HPV
[103]	2015	Peres AL	Brésil	Etude transversale	Transversales	ND-ND	18-60	Centres de soins	673	Clue cells	HPV
[104]	2016	Van der Veer C	NL	Etude transversale	Transversales	09/2013-12/2014	ND-ND	Cliniques IST, partenaire infecté	93	16S	CT

IST : Infection sexuellement transmissible; HPV : Human Papillomavirus; CT : *Chlamydia trachomatis*; NG : *Neisseria gonorrhoeae*; MG : *Mycoplasma genitalium*; ND : Non défini; IQR : Interquartile range; USA : Etats-Unis, UK : Royaume-Uni; NL : Pays-Bas.

\*Fourchette d'âge quand disponible, âge moyen, âge médian ou proportion d'un groupe d'âge autrement.

\*\*La taille d'échantillon correspond à l'échantillon utilisé pour déterminer l'association entre une certaine IST et la composition du microbiote vaginal.

## Chapitre

# 7

## Résultats

### 7.1 Résultats de la recherche

La recherche a produit 390 articles publiés sur Medline et 664 sur le Web of Science. Après retrait des articles en double et exclusion sur la base de la langue ou de l'inadéquation évaluée après lecture des titres et résumés, 105 articles ont été retenus pour lecture complète. Nous avons exclu 72 articles ne correspondant pas aux critères d'inclusion. Après ajout de 6 articles via recoupement des listes de références, il restait 39 articles pour l'analyse (figure 7.1 page 40). Parmi ces 39 articles, 11 utilisaient les critères d'Amsel, 20 le score de Nugent, 3 la présence de *clue cells* et un article utilisait à la fois les critères d'Amsel et le score de Nugent pour la caractérisation de l'état LL-VMB, tandis que 4 utilisaient le séquençage génique de l'ARNr 16S pour la caractérisation du microbiote vaginal. Parmi les 39 études sélectionnées, 19 correspondaient à des cohortes et 20 à des études transversales. Des données longitudinales sur le microbiote vaginal et les IST étaient disponibles pour 13 des 19 cohortes, tandis que pour les 6 autres seules des données à l'inclusion étaient disponibles, dû au fait que l'association entre microbiote vaginal et IST n'était pas toujours l'objectif principal des études sélectionnées. Les études de cohorte permettaient d'identifier les cas d'infection incidente, mais même avec des cas incidents, le microbiote vaginal n'était pas toujours évalué en amont de l'infection, mais plutôt à la même visite que l'infection incidente, ou après l'infection dans seulement une étude (Bradshaw et al. 2013). Quand le microbiote vaginal était évalué en amont de l'infection, le délai entre les deux événements variait de 3 mois à 2 ans. Un total de 17 articles a été utilisé pour évaluer l'association entre microbiote vaginal et *C. trachomatis* (n=12 810), 20 pour HPV (n=20 022 individus), 8 pour *N. gonorrhoeae* (n=8 799), et 4 pour *M. genitalium* (n=2 894) (tableau 6.1).

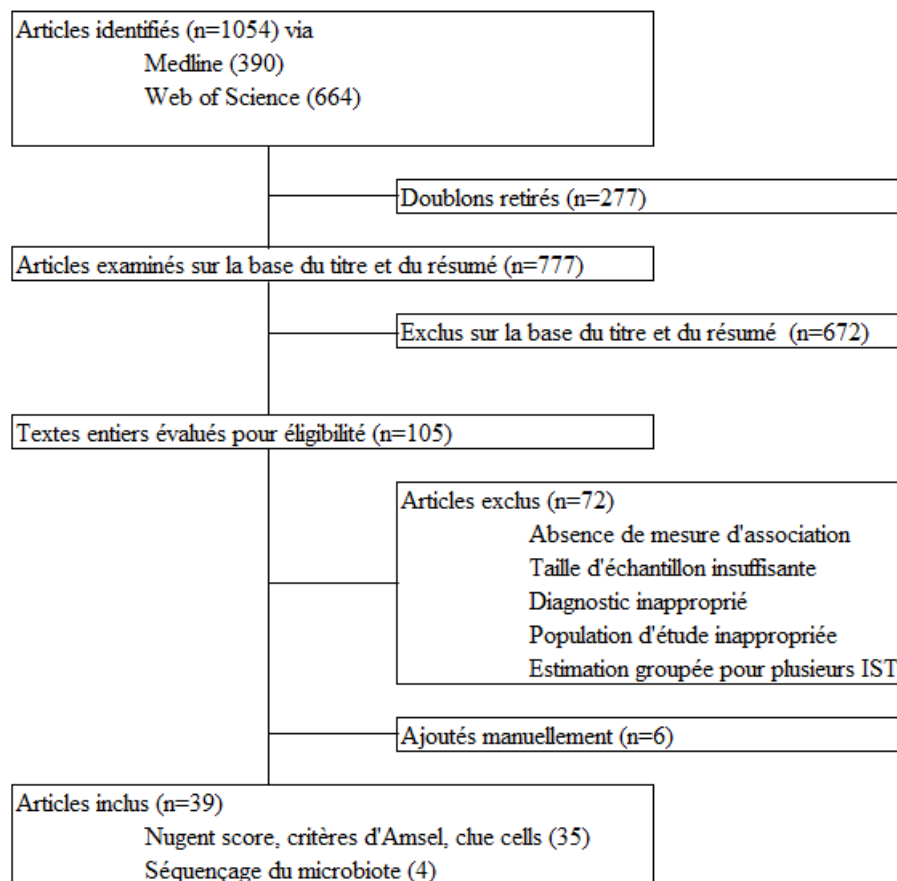


FIGURE 7.1 – Diagramme de flux du processus de sélection pour l'identification et l'inclusion des articles.

IST : Infection sexuellement transmissible

## 7.2 Association globale entre *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal à faible *Lactobacillus* (LL-VMB)

Dans les études sélectionnées pour l'infection par *C. trachomatis* et dans les populations étudiées, la proportion de femmes infectées allait de 4,8% à 72,9%. Sur l'ensemble des études, la proportion de femmes présentant un LL-VMB variait de 3,1% à 70,9%. Pour *C. trachomatis*, les mesures d'association avec un LL-VMB variaient de 0,70 (IC95% 0,40-1,20) à 5,24 (IC95% 1,86-14,81). Neuf études sur 17 montraient une association significative. Le test Q d'hétérogénéité montrait également un résultat significatif ( $p = 0,018$ ) (figure 7.2 page 41). Les sources potentielles d'hétérogénéité ont été explorées par le biais d'analyses de sous-groupes (voir section 7.4).

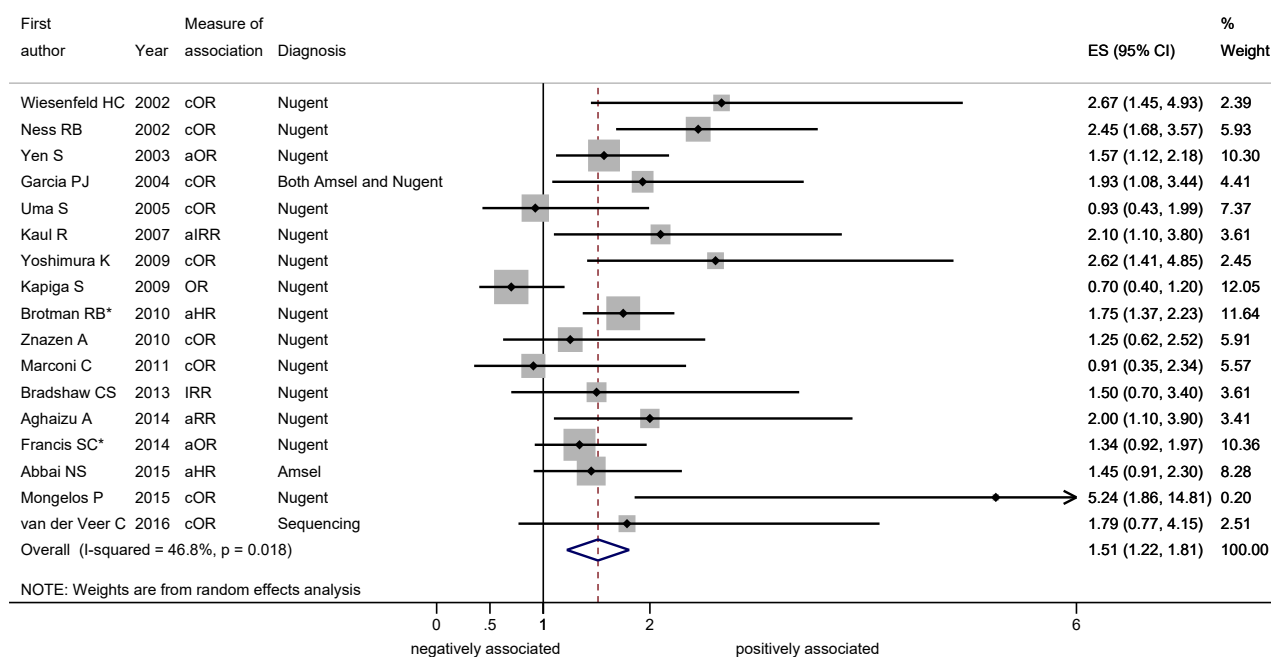


FIGURE 7.2 – Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* spp. et infection par *Chlamydia trachomatis* (CT).

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.

### 7.3 Association globale entre trois autres infections sexuellement transmissibles d'importance clinique et microbiote vaginal

Dans les études sélectionnées pour les trois autres IST d'importance clinique, les résultats sont présentés en figure 7.3, figure 7.4 et figure 7.5, page 42. La proportion de femmes infectées allait de 9,9% à 79,5% dans les études portant sur HPV, de 0,7% à 9,9% pour *N. gonorrhoeae*, et de 2,5% à 13,8% pour *M. genitalium* (quand disponible dans les études transversales ou à l'inclusion pour les études longitudinales). Pour HPV, les mesures d'association avec un LL-VMB allaient de 0,60 (IC95% 0,30-1,19) à 2,75 (IC95% 0,27-28,04). Six études sur 20 montraient une association significative entre microbiote vaginal et infection par HPV. Ces études étaient significativement hétérogènes ( $p < 0,001$ ). Les études sélectionnées pour *N. gonorrhoeae* n'étaient pas significativement hétérogènes ( $p = 0,276$ ), et les mesures d'association variaient de 0,80 (IC95% 0,50-1,40) à 3,75 (IC95% 0,39-36,24) avec une seule étude montrant une association significative. Pour *M. genitalium*, trois études indiquaient des estimations d'association similaires, allant de 0,44 (IC95% 0,13-1,54) à 0,50 (IC95% 0,10-3,40), mais une étude rapportait une estimation d'association de 6,09 (IC95% 1,98-18,50).

Pour *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, les analyses de sensibilité excluant les études pour lesquelles les estimations d'association prenaient comme catégorie de référence du score de Nugent la catégorie 0-3 au lieu de l'ensemble des individus des catégories 0-3 et 4-6 réunies, ne modifiaient pas les résultats significativement (figure A.1, page 183).

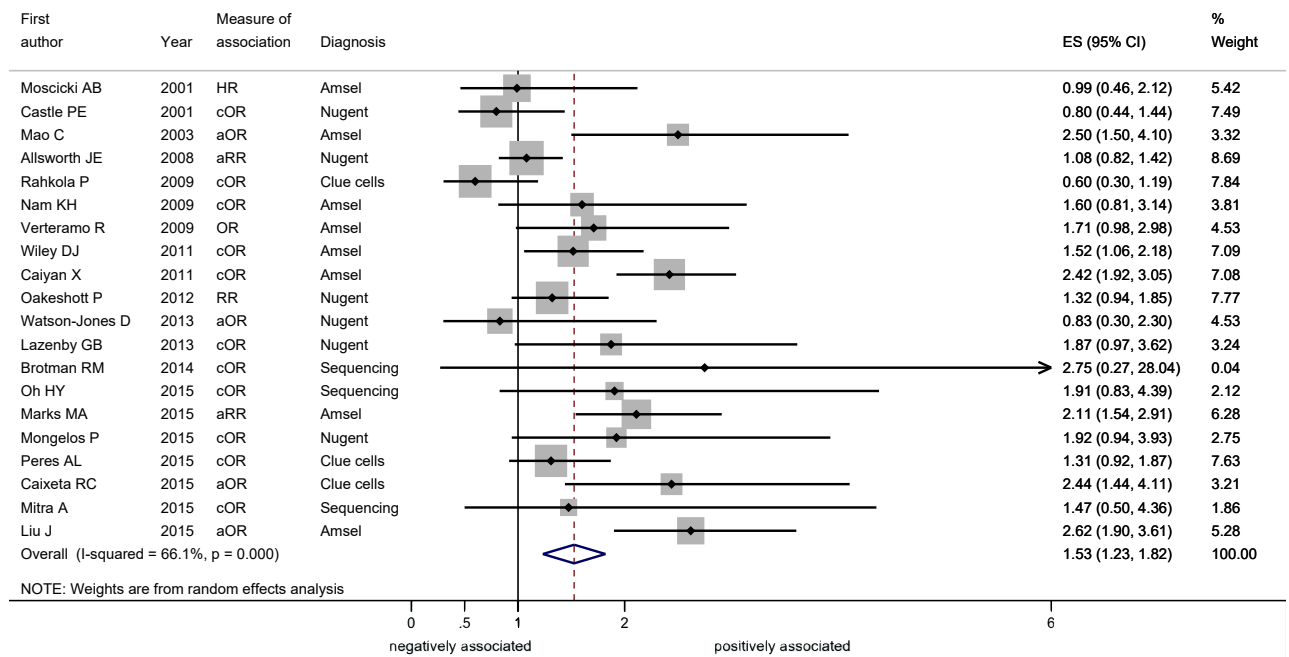


FIGURE 7.3 – Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* spp. et infection par le papillomavirus humain (HPV).

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.

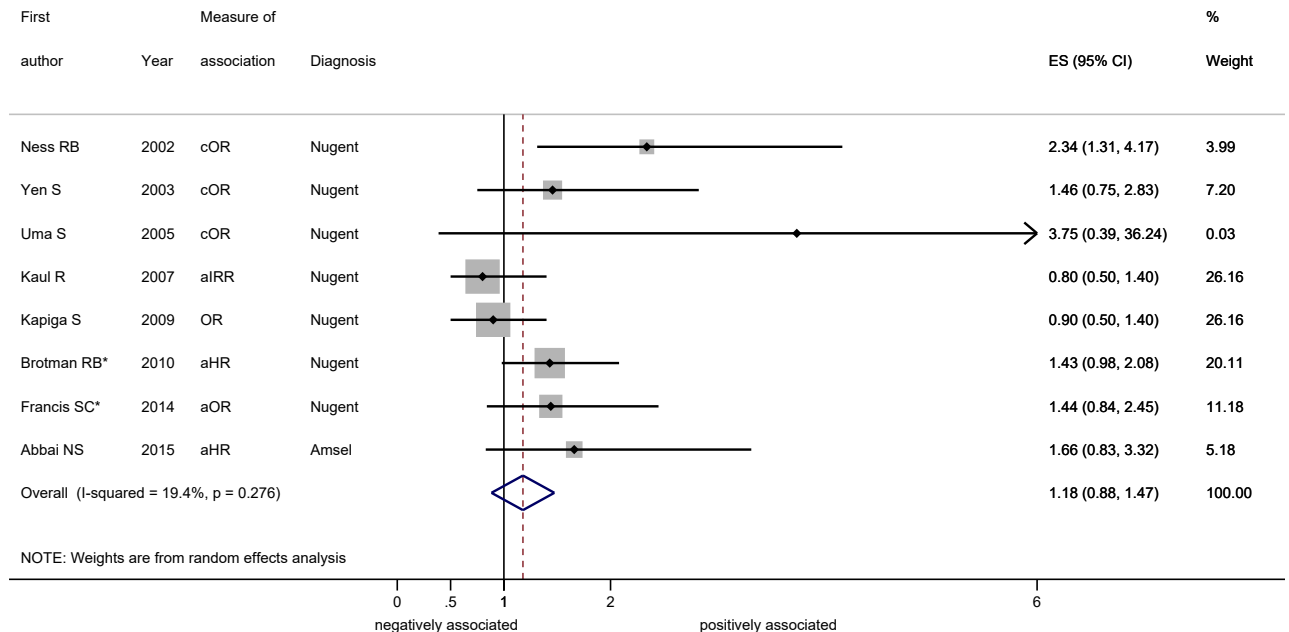


FIGURE 7.4 – Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* spp. et infection par *Neisseria gonorrhoeae* (NG).

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.

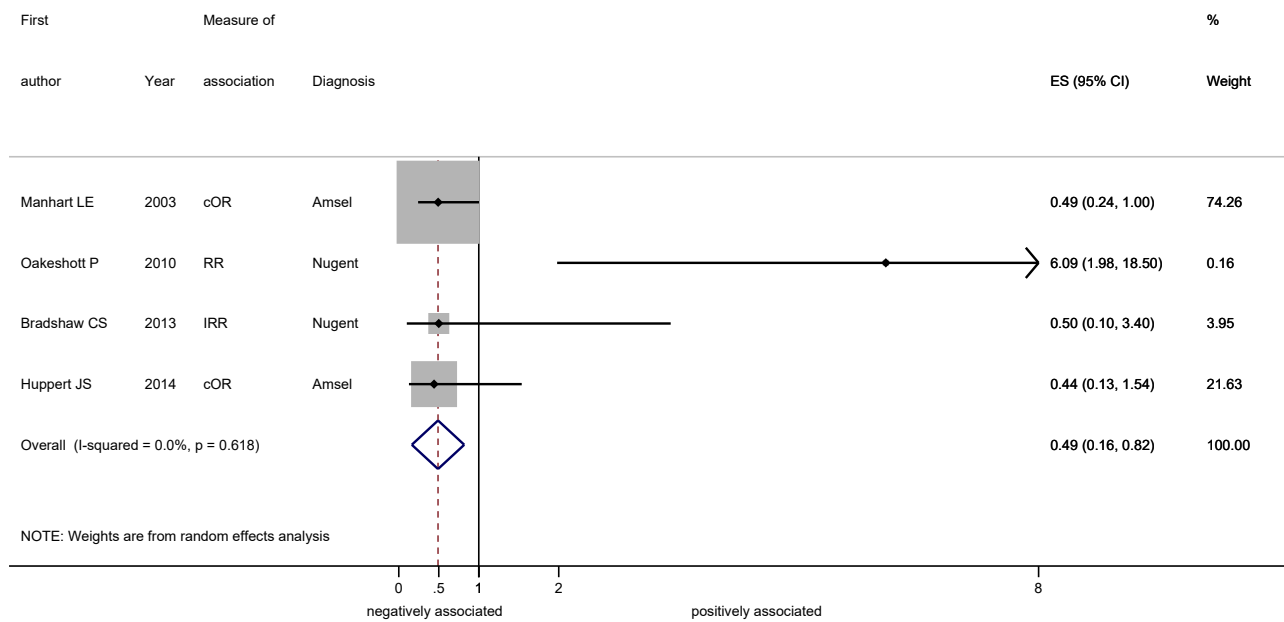


FIGURE 7.5 – Diagrammes en forêt de l'association entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* spp. et infection par *Mycoplasma genitalium* (MG).

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.

## 7.4 Analyse de sous-groupes de l'association entre microbiote vaginal et infection par le papillomavirus humain ou par *Chlamydia trachomatis*

Pour *C. trachomatis*, quand les mesures d'association étaient restreintes à une classe d'âge plus jeune (<40 ans), les résultats étaient moins hétérogènes et les mesures d'association étaient consistantes sur l'ensemble des études, suggérant une association positive entre microbiote vaginal et infection par *C. trachomatis* (figure 7.6). La différence de site d'étude (aire géographique) était un autre facteur important contribuant à l'hétérogénéité des résultats pour *C. trachomatis* mais aussi pour HPV (figure 7.7). Bien que la stratification par site d'étude menait à des groupes d'études plus petits et ainsi moins de puissance statistique, les mesures d'association étaient plus uniformes. Pour HPV, les études conduites en Asie montraient des mesures d'association plus élevées qu'ailleurs, et les résultats de ces études étaient cohérents entre eux ( $I^2 = 0,0\%$ ,  $p = 0,635$ ).

Comme les études sélectionnées fournissaient des types de mesure d'association différents (OR, RR, HR ou IRR) qui ne sont pas parfaitement comparables, nous avons évalué si le type de mesure d'association pouvait en partie expliquer l'hétérogénéité observée entre les études. Pour *C. trachomatis* et HPV, aucun effet clair du type de mesure d'association sur l'hétérogénéité

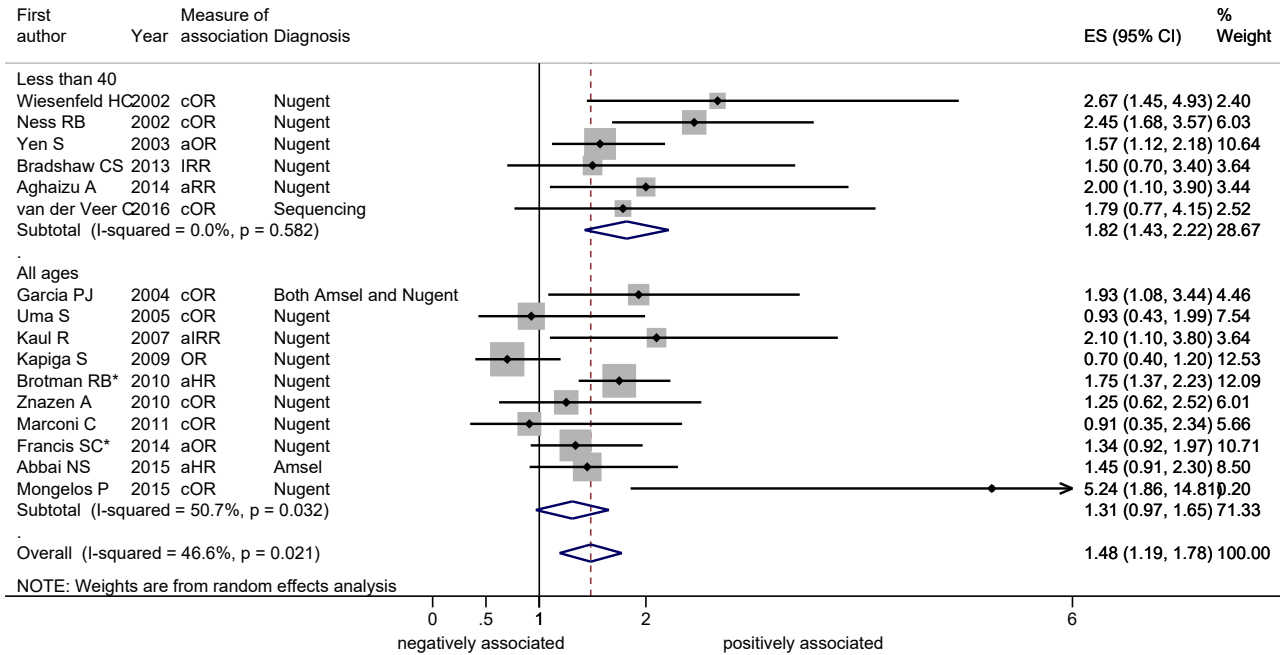


n'a pu être mis en évidence. Les mesures d'association étaient légèrement plus hautes pour les mesures ajustées comparées aux mesures brutes pour à la fois *C. trachomatis* et HPV, et homogènes entre elles seulement pour *C. trachomatis*. Les mesures d'association ne différaient pas entre les études où le microbiote vaginal était caractérisé en amont de l'IST et les études où les deux étaient évalués au même moment, les résultats étaient toujours hautement hétérogènes. De plus, une analyse de sous-groupe sur les cas incidents versus les cas prévalents d'infection présentée en figure A.2 (page 184) ne montre pas d'effet clair de ce facteur. Enfin, la méthode de caractérisation du microbiote vaginal n'expliquait pas l'hétérogénéité observée entre les études pour *C. trachomatis*. Quand les résultats étaient restreints aux études utilisant le score de Nugent, les résultats étaient toujours très hétérogènes. Cependant, pour HPV, une tendance pour des mesures d'association plus élevées a été observée quand la méthode utilisée était les critères d'Amsel.

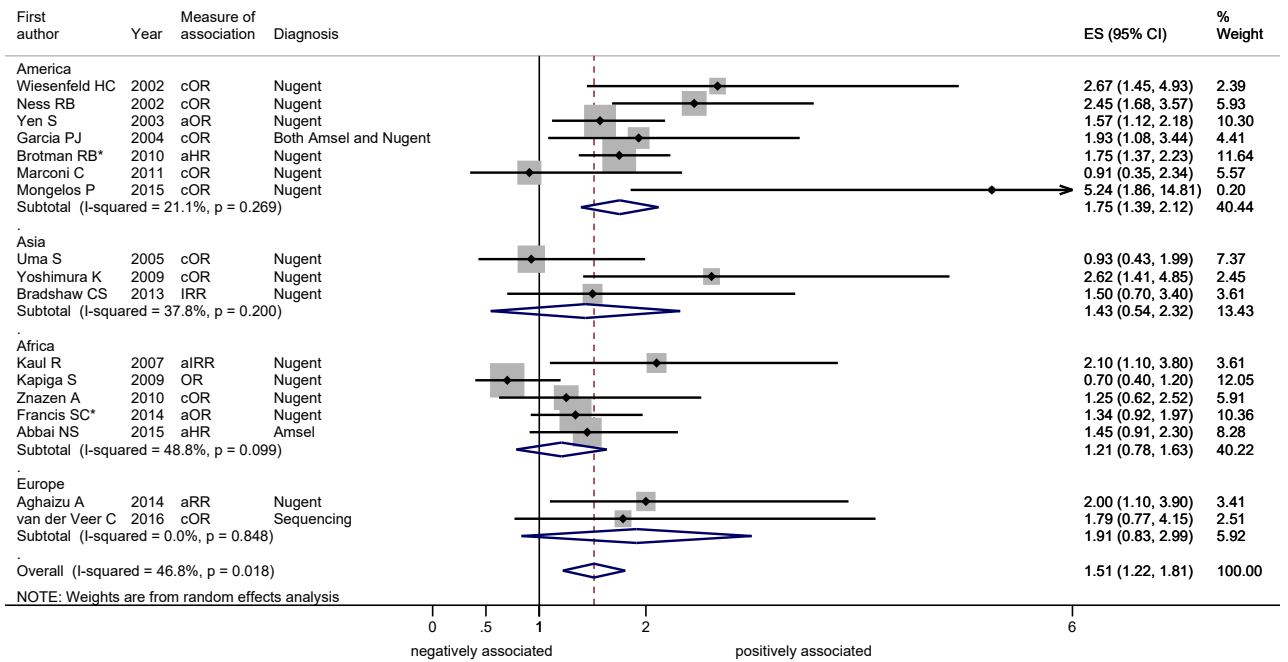
## 7.5 Risque de biais

Des graphiques en entonnoir et des tests d'Egger ont été effectués pour chaque IST et aucun biais de publication n'a pu être mis en évidence pour aucune des IST considérées (figure 7.8 page 51), graphiquement comme par le biais du test d'Egger.

La qualité méthodologique a été évaluée par l'échelle Newcastle-Ottawa. Toutes les études sélectionnées ont reçu une notation d'au moins 5 étoiles sur 9, indiquant une qualité méthodologique haute ou moyenne et un impact limité sur le risque de biais (tableau A.1 page 180). Les études avec les scores les plus bas sur cette échelle (5 étoiles sur 9 pour 4 des 39 études) présentaient des schémas d'études transversaux et manquaient d'ajustement sur d'importants cofacteurs pour l'acquisition d'une IST, en particulier des facteurs liés à une exposition sexuelle récente (e.g. nombre de partenaires dans le dernier mois/année).

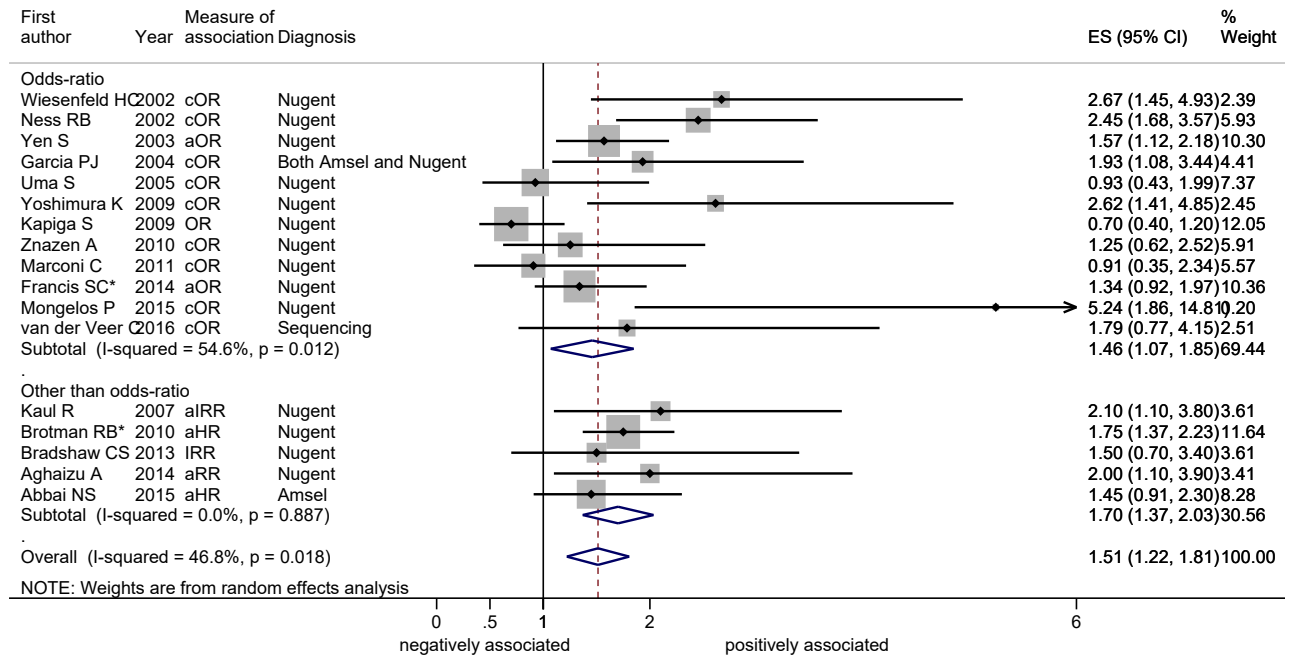


(a) Groupe d'âge

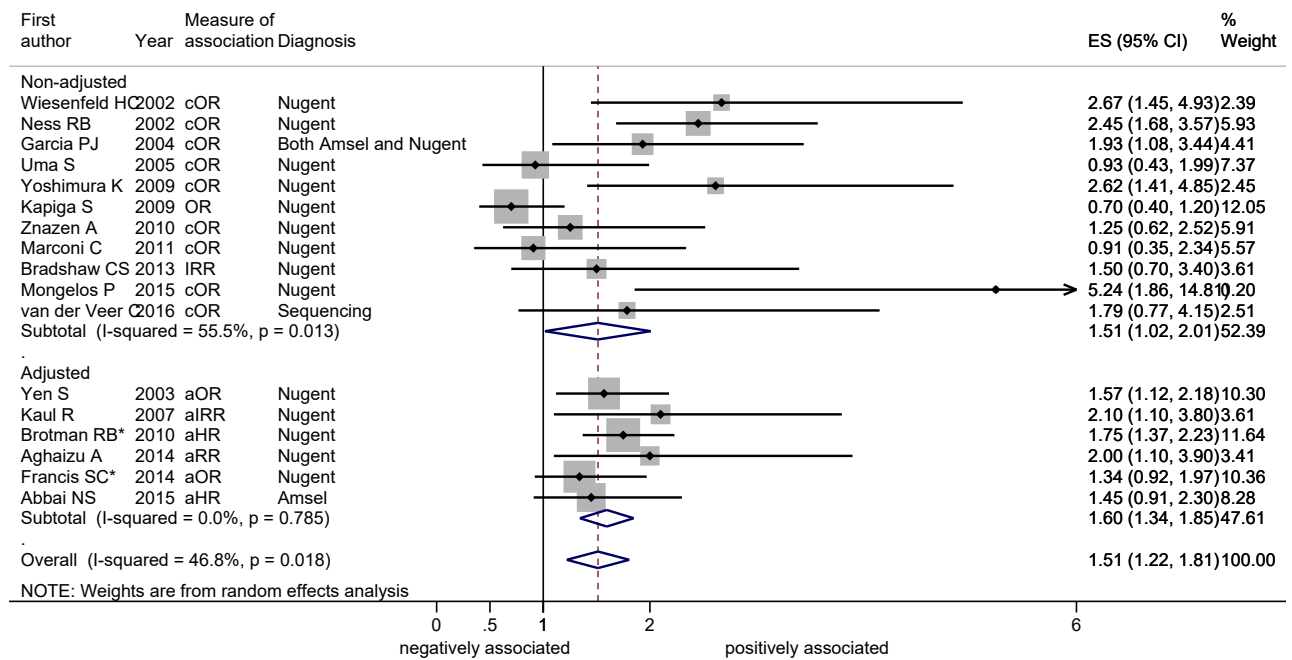


(b) Site d'étude

FIGURE 7.6 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et *Chlamydia trachomatis* (CT), par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant, après ou en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal.

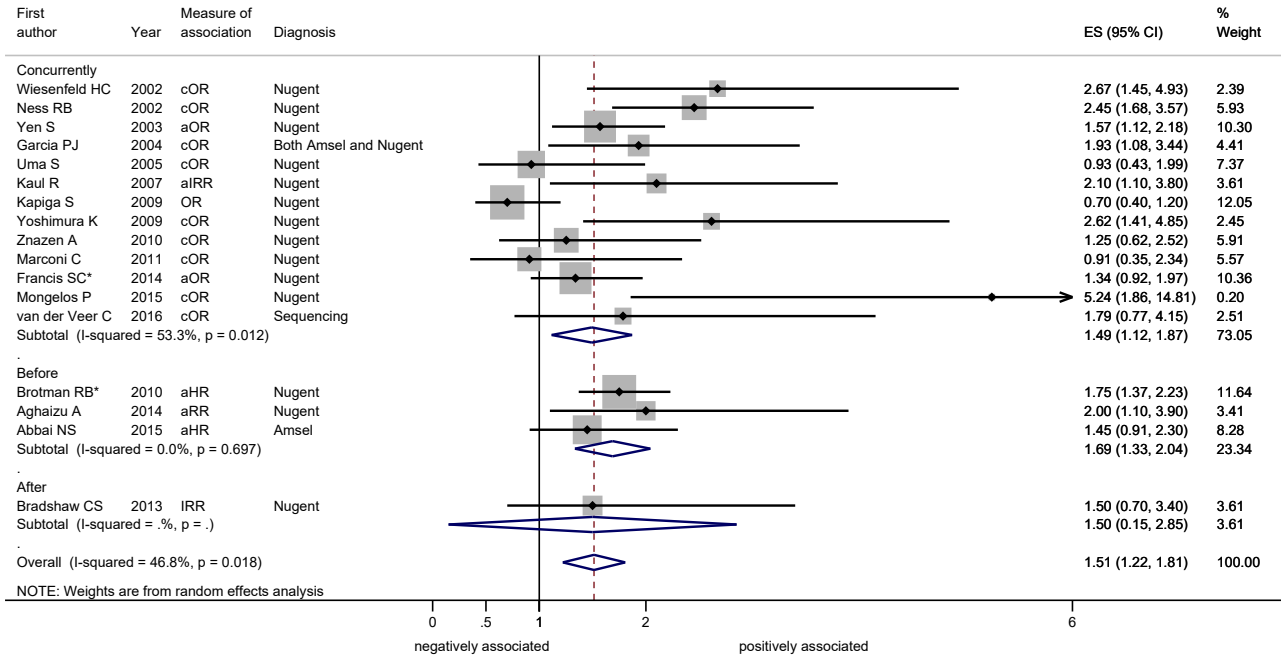


(c) Type de mesure d'association

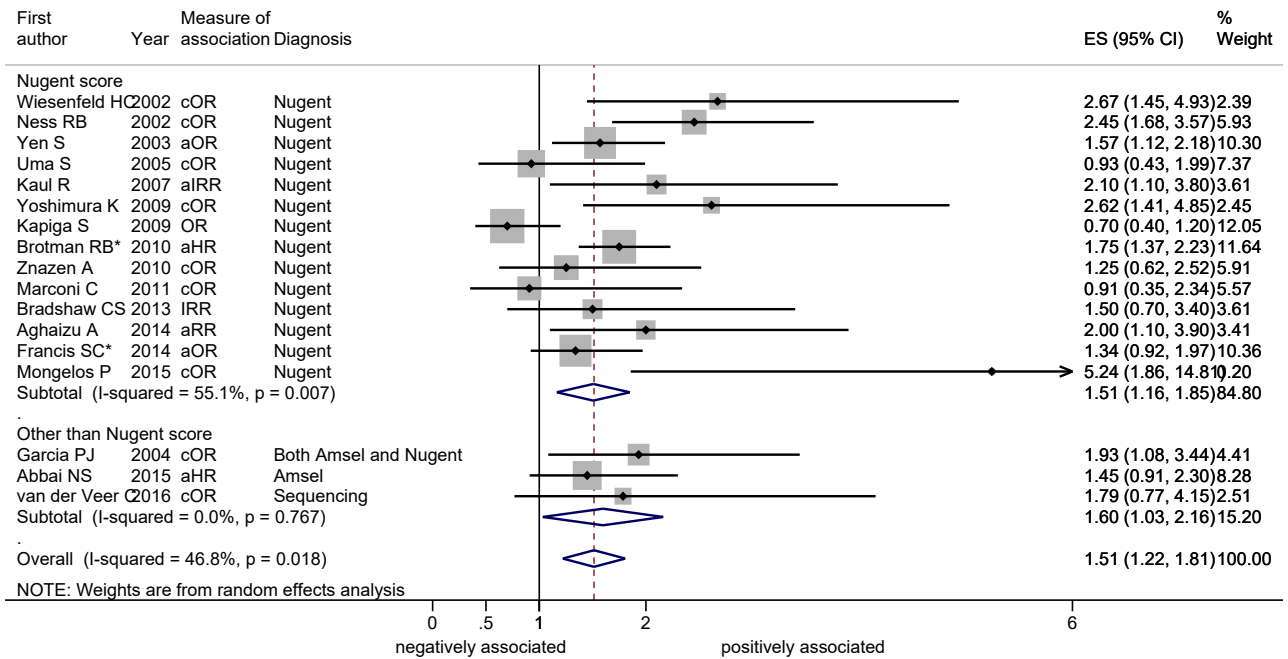


(d) Ajustement

FIGURE 7.6 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et *Chlamydia trachomatis* (CT), par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant, après ou en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal (cont.).

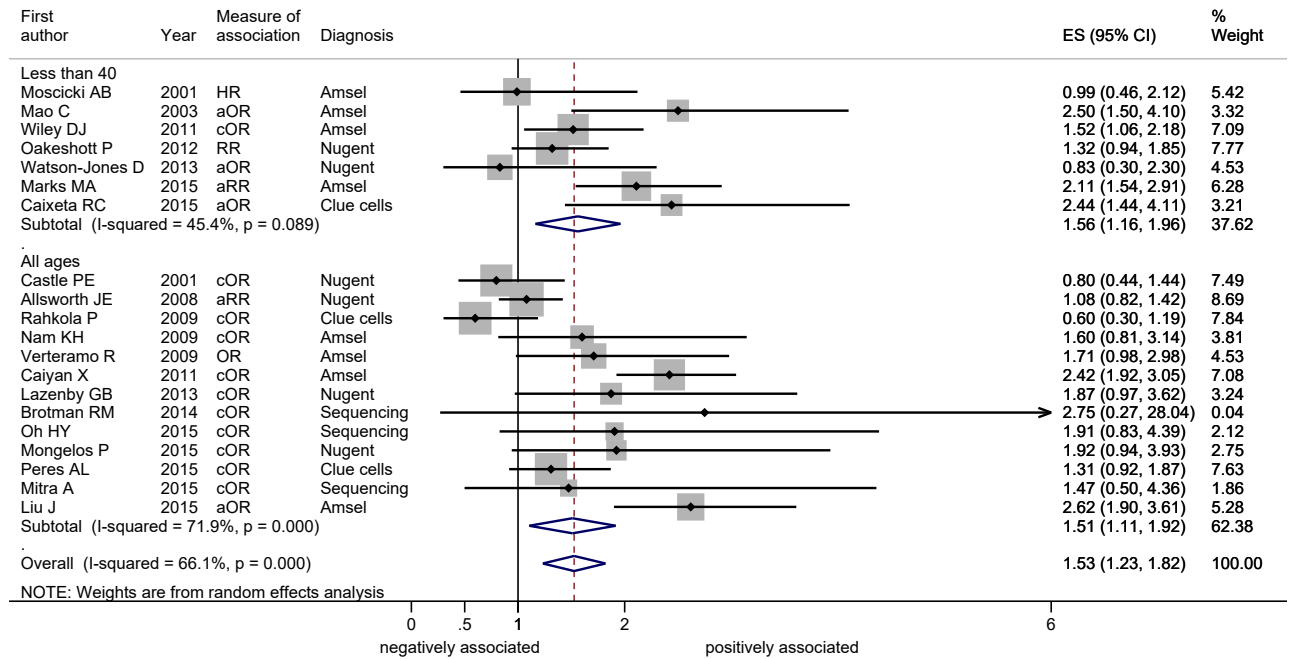


(e) Evaluation du microbiote avant versus en même temps

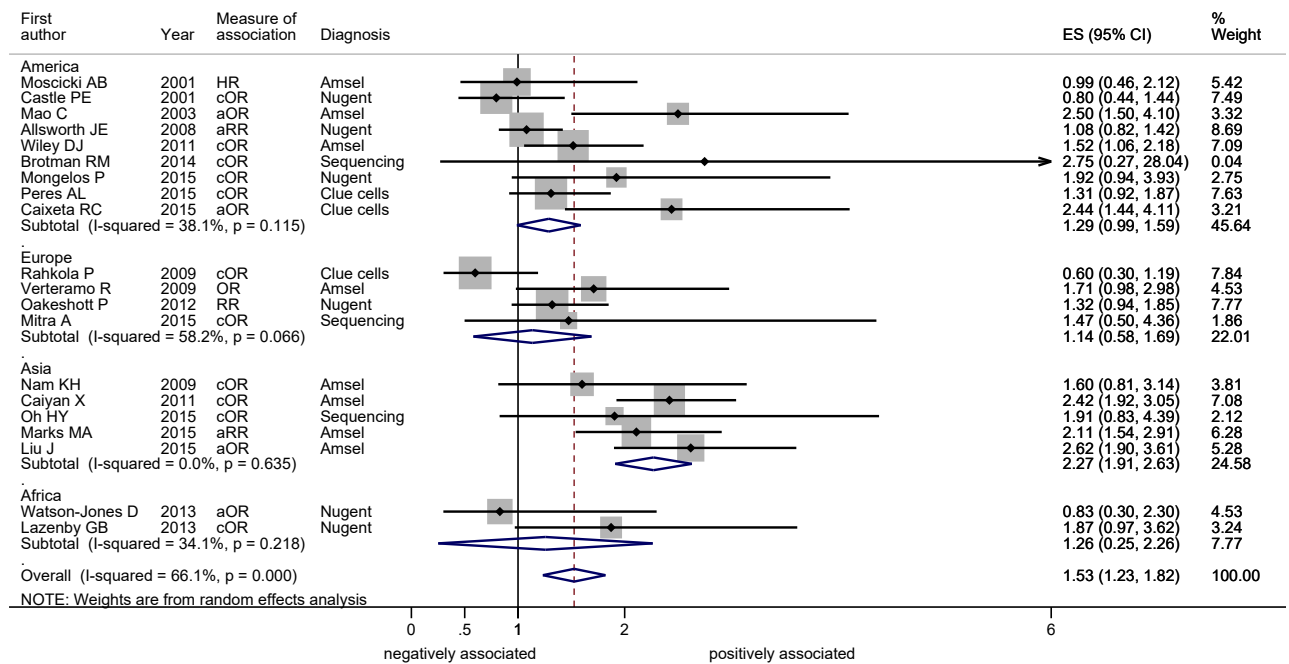


(f) Méthode de caractérisation du microbiote

FIGURE 7.6 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et *Chlamydia trachomatis* (CT), par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant, après ou en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal (cont.).

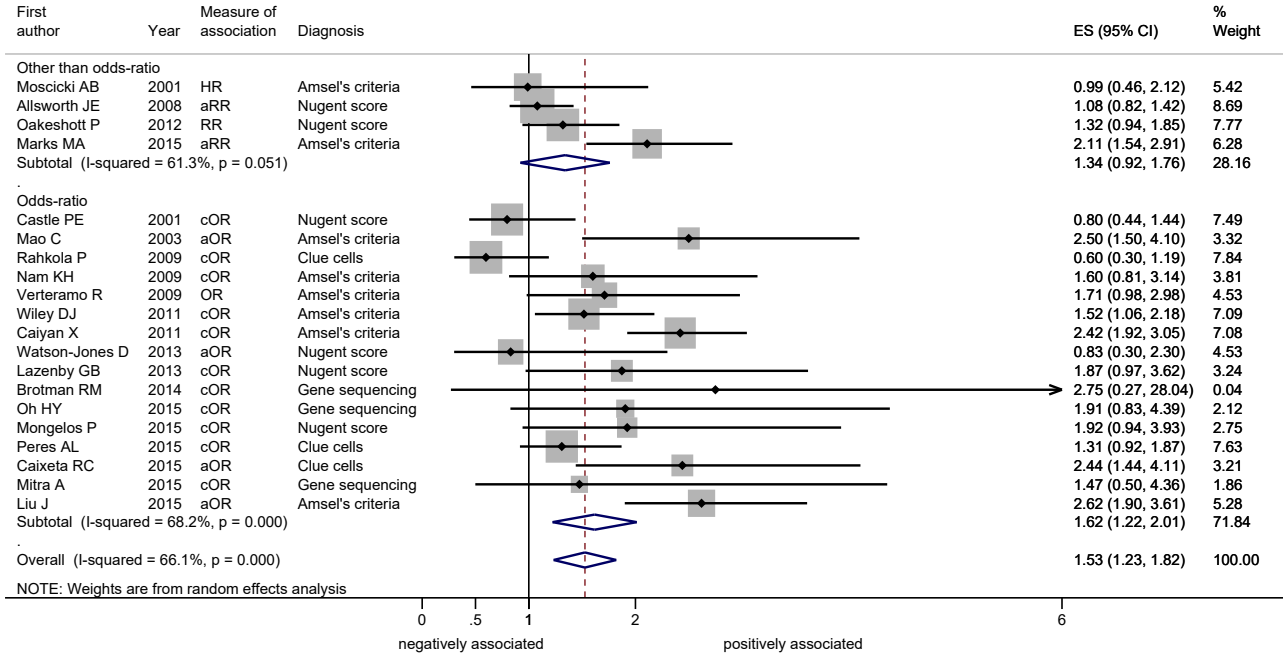


(a) Groupe d'âge

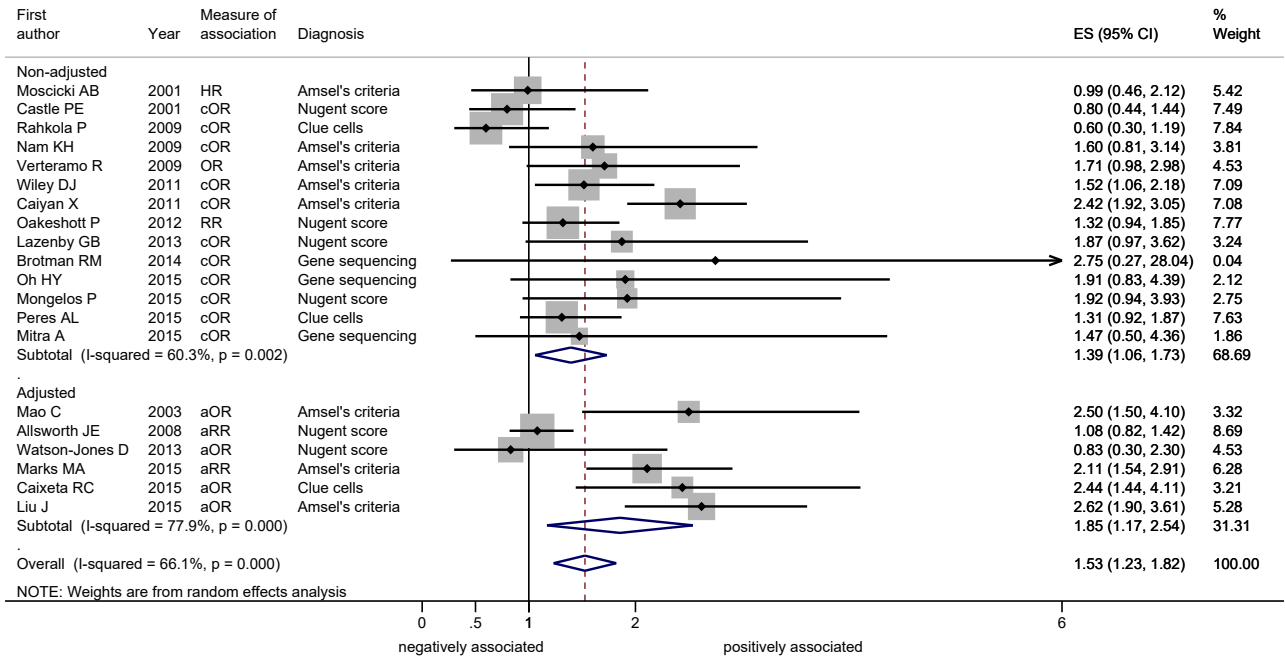


(b) Site d'étude

FIGURE 7.7 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papilloma-virus humain, par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant l'infection versus en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal.

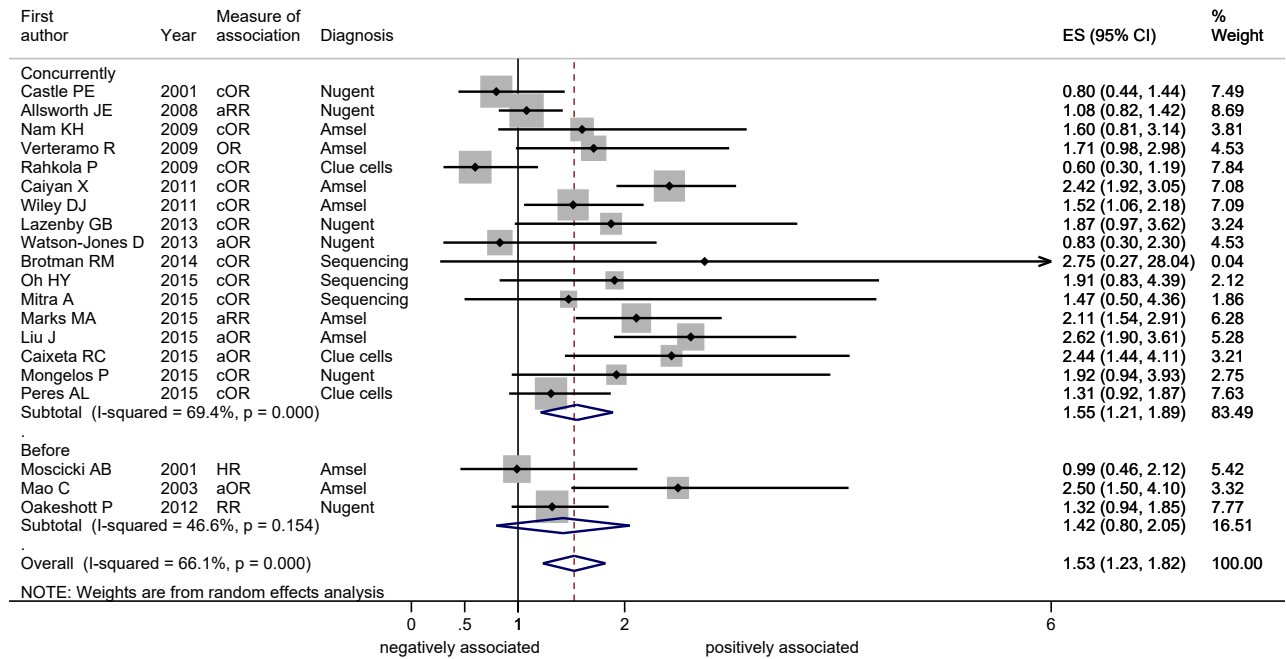


(c) Type de mesure d'association

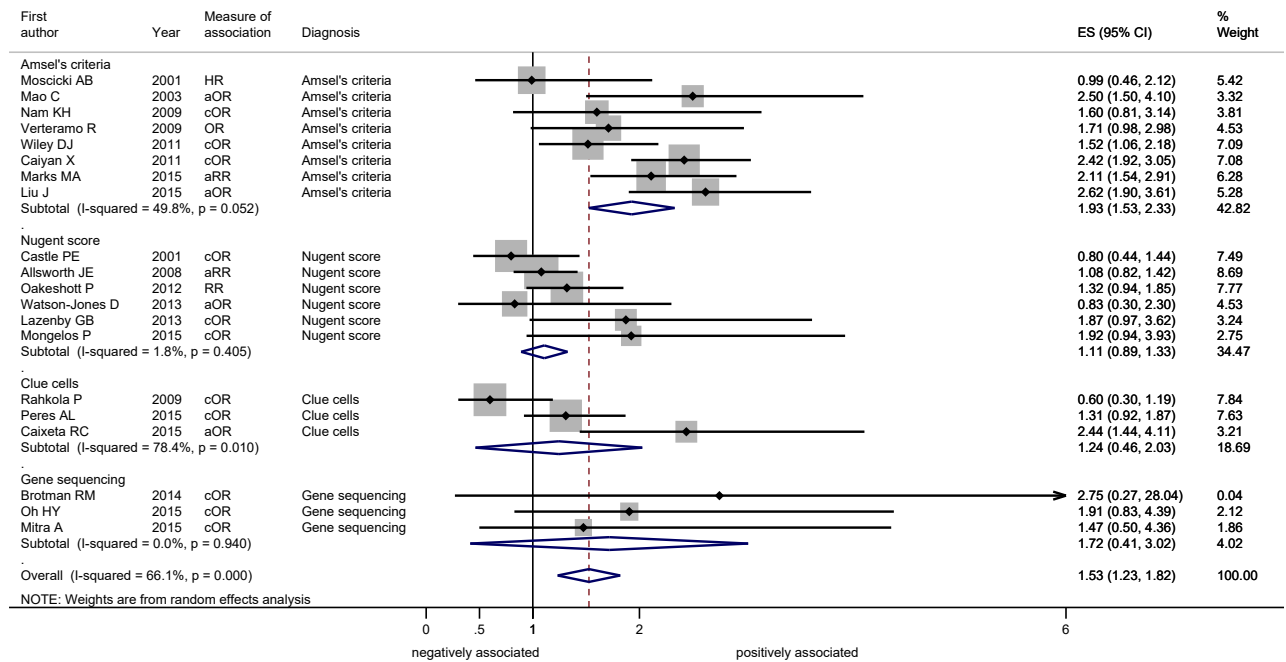


(d) Ajustement

FIGURE 7.7 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papilloma-virus humain, par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant l'infection versus en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal. (cont.)

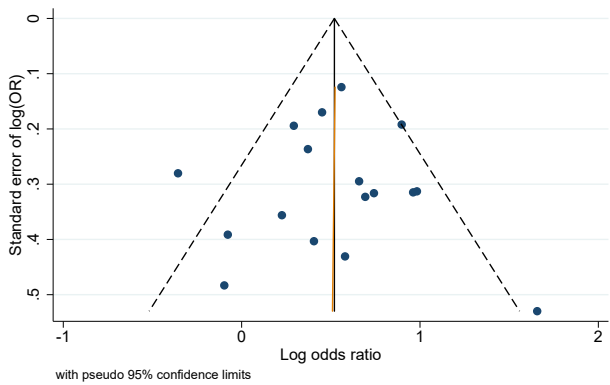


(e) Evaluation du microbiote avant versus en même temps

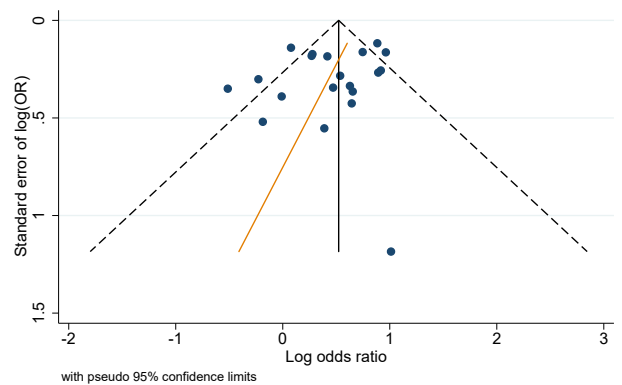


(f) Méthode de caractérisation du microbiote

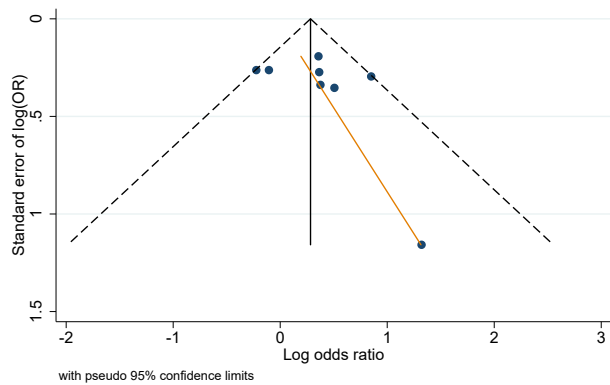
FIGURE 7.7 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et papillomavirus humain, par (a) groupe d'âge, (b) site d'étude, (c) OR versus autres mesures d'effect size, (d) effect sizes ajustés versus non-ajustés, (e) microbiote vaginal évalué avant l'infection versus en même temps que l'infection, (f) méthode diagnostique du microbiote vaginal. (cont.)



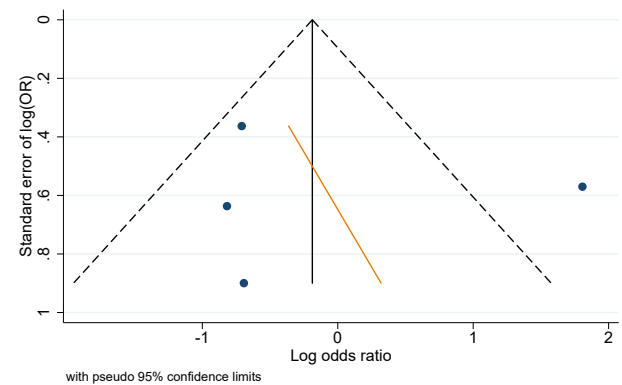
(a) *Chlamydia trachomatis*



(b) Papillomavirus humain



(c) *Neisseria gonorrhoeae*



(d) *Mycoplasma genitalium*

FIGURE 7.8 – Diagrammes en entonnoir évaluant l'existence d'un biais de publication pour les études concernant (a) le Papillomavirus Humain, (b) *Chlamydia trachomatis* (CT), (c) *Neisseria gonorrhoeae* (NG), (d) *Mycoplasma genitalium* (MG).

OR : Odds-ratio.





## Chapitre

# 8

## Discussion

### 8.1 Rappel des résultats

L'écosystème vaginal existe en tant qu'équilibre bien ajusté entre les micro-organismes et l'hôte. La caractérisation du microbiote vaginal basé sur le séquençage *next-generation* a permis une connaissance plus détaillée et en profondeur de la composition du microbiote vaginal. Elle distingue plusieurs sortes de microbiote : le microbiote vaginal à haut *Lactobacillus* (HL-VMB) qui correspond à de faibles scores de Nugent et un test d'Amsel négatif, et le microbiote vaginal à faible *Lactobacillus* (LL-VMB) qui comprend un large éventail de bactéries aérobies strictes et facultatives, correspondant à des scores de Nugent élevés et un test d'Amsel positif [42, 105]. Ainsi, ces méthodes sont alignées malgré des résolutions différentes. On estime qu'une perturbation de cet équilibre et un manque de *Lactobacillus* spp. pourraient jouer un rôle dans la physiologie des infections des voies reproductives, comme *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium*, ou HPV. À l'inverse, les pathogènes sexuellement transmissibles pourraient modifier la composition du microbiote vaginal. Partant de cette hypothèse et en tant que première étape vers la compréhension de l'interrelation entre microbiote vaginal et IST, cette revue systématique et méta-analyse est la première à notre connaissance à évaluer systématiquement l'association statistique entre le microbiote vaginal et ces quatre IST et à présenter l'état des connaissances sur ce sujet.

Nos résultats indiquent une tendance vers une association positive entre LL-VMB et l'infection par *C. trachomatis*, ainsi que HPV, ce qui est cohérent avec les études *in vitro* suggérant un potentiel rôle protecteur de HL-VMB à travers la production d'acide lactique, la production de bactériocines ou la compétition écologique [106–110]. À l'inverse, aucune tendance claire d'association entre microbiote vaginal et *N. gonorrhoeae* n'a pu être détectée. Les raisons de cette différence pourraient être liées à des caractéristiques différentes des pathogènes considérés en termes d'infectivité ou de pathogénicité. Concernant le rôle potentiel du microbiote, la capacité des *Lactobacillus* spp. à prévenir l'infection par *N. gonorrhoeae* ou à contribuer à la résolution de l'infection *in vitro* et *in vivo* a été débattue précédemment [111]. Quant à

l'infection par *M. genitalium*, notre revue systématique a principalement mis en évidence le fait que trop peu d'études ont à ce jour été conduites, en raison de l'intérêt récent et tout juste croissant pour cette infection.

Pour deux des quatre IST considérées, cette méta-analyse a identifiée de l'hétérogénéité au sein des mesures d'association entre les études sélectionnées. Deux facteurs sont apparus comme importants. Le site d'étude a permis d'expliquer en partie l'hétérogénéité observée entre les études. Ce résultat suggère que d'autres facteurs encore inconnus à ce jour, tels que le "bagage" génétique, les pratiques sexuelles ou les comportements d'hygiène personnelle variant entre les différentes aires géographiques, pourraient influencer grandement la composition du microbiote vaginal. La méthode de caractérisation du microbiote était un autre facteur important pour l'association observée. En effet, l'association entre LL-VMB et l'infection par HPV était plus élevée dans les études utilisant les critères d'Amsel. Comme ces critères utilisent à la fois la microscopie et les signes cliniques alors que le score de Nugent est fondé uniquement sur la microscopie, la présence de signes cliniques utilisés dans les critères d'Amsel pourrait en fait contribuer davantage à l'association que la simple présence ou absence de *Lactobacillus* spp. comme dans le score de Nugent. Sous cette hypothèse, un focus sur la combinaison de la détection des signes cliniques et l'évaluation du microbiote vaginal devrait être exploré.

## 8.2 Limites

La présente méta-analyse a plusieurs limites. Bien que nous ayons sélectionné des études où le diagnostic d'IST était basé sur la détection ADN ou ARN, les méthodes utilisées ont des sensibilités différentes, ce qui peut avoir biaisé les résultats. Pour caractériser le microbiote vaginal, quatre méthodes différentes ont été utilisées : les critères d'Amsel, le score de Nugent, la présence de *clue cells* et le séquençage génique de l'ARNr 16S. L'évaluation du microbiote vaginal d'après le système de notation de Nugent, les critères d'Amsel et la présence de *clue cells* ne coïncident pas parfaitement et ont des résolutions faibles [65, 112, 113]. Bien que cela puisse constituer une limite, une forte corrélation a été mise en évidence entre ces méthodes et un LL-VMB déterminé par séquençage d'amplicons du gène de l'ARNr 16S [42, 105].

Nous avons choisi de regrouper les données de tous les types de HL-VMB identifiés communément par séquençage génique de l'ARNr 16S (i.e. les types d'état communautaire dominés par l'une des espèces suivantes : *L. crispatus*-, *L. gasseri*-, *L. iners*- et *L. jensenii*-), tandis que l'état LL-VMB comprend des femmes présentant une combinaison de diverses bactéries anaérobies, pour correspondre au score de Nugent et aux critères d'Amsel. Ce regroupement peut ne pas être pertinent étant donné que différentes espèces de *Lactobacillus* peuvent avoir des effets différents sur les IST. Zozaya-Hinchliffe *et al.* ont montré que *L. crispatus* et *L. jensenii* étaient retrouvés essentiellement chez des femmes dont le score de Nugent était de 0 à 3, tandis que *L. iners* pouvait être trouvé dans des proportions élevées dans toutes les catégories du score de Nugent, y compris la catégorie 7-10 [114]. L'utilisation de techniques moléculaires telles que le séquençage *next-generation* appliqué à des gènes conservés chez les bactéries et archées (gène de l'ARNr 16S ou *cpn60* [115]) permet une caractérisation plus en profondeur du microbiote vaginal qui pourrait offrir une meilleure compréhension de l'association entre microbiote et IST.

Etant donné les différents types de mesures d'association rapportées dans les études sélectionnées, ainsi que l'utilisation d'un modèle à effets aléatoires, aucune mesure globale d'association

ne peut être inférée de cette méta-analyse (contrairement aux modèles à effets fixes). Consubstantielle à la méta-analyse, la question des biais de publication s'est posée, en particulier quand les auteurs rapportaient comme non significative (NS) l'association entre microbiote vaginal et une IST donnée, au lieu de fournir l'estimation ponctuelle et son intervalle de confiance à 95% ou des données brutes. Cela a été le cas pour un article revu pour lecture complète et exclu pour cette raison [116]. Ainsi, il est possible que la "vraie" valeur de l'association entre microbiote vaginal et une IST donnée soit inférieure à la valeur obtenue en regroupant seulement les estimations publiées.

### 8.3 Conclusion

Il y a de forts arguments biologiques appuyant l'hypothèse selon laquelle un LL-VMB et la présence de bactéries anaérobies est un facteur de risque pour l'acquisition d'une IST. Premièrement, les espèces de *Lactobacillus* sont considérées comme protectrices vis-à-vis des IST du fait de la compétition, de la production d'acide lactique baissant le pH vaginal, et de la production de bactériocines spécifiques de cibles biologiques. Ainsi, l'absence d'espèces de *Lactobacillus* pourrait mener à une plus grande susceptibilité vis-à-vis des infections. Deuxièmement, les bactéries anaérobies strictes et facultatives semblent produire des nitrosamines et des médiateurs inflammatoires suspectés d'être associés à l'inflammation du col de l'utérus [117], et des enzymes dégradant les mucines qui réduisent les obstacles à l'infection [118,119]. Elles stimulent aussi la production de cytokines par les cellules épithéliales [117]. Du fait que cet état LL-VMB peut persister sur une longue période de temps ou se produire fréquemment chez un grand nombre de femmes [120], il est possible que cet état représente néanmoins un état normal mais associé à un risque plus élevé, dans le cas où ces femmes seraient exposées à un pathogène sexuellement transmissible.

Dans l'ensemble, ces résultats promeuvent l'utilisation d'une méthode plus sensible, reproductible et standardisée de caractérisation du microbiote vaginal. La capacité à distinguer les communautés dominées par différentes espèces de *Lactobacillus* est importante, étant donné que les espèces de *Lactobacillus* présentent des propriétés uniques avec des effets différents sur les pathogènes sexuellement transmissibles. De plus, des études s'appuyant sur des schémas d'étude longitudinaux et prospectifs devront être entreprises pour aborder la question de la directionnalité de cette association complexe, en particulier si un changement de microbiote vaginal a lieu en amont, en même temps (modes de transmission similaires ou simultanés du microbiote et des IST [116,121]), ou après une infection. Enfin, davantage d'analyses fonctionnelles sont nécessaires dans le contexte des IST, afin que ces résultats soient mobilisés pour améliorer les stratégies de santé publique. Comprendre la relation entre IST et microbiote vaginal est fondamental pour proposer une approche intégrée de la santé sexuelle et reproductive. Caractériser le microbiote vaginal permettra d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies de prévention et de dépistage, à de nouveaux outils diagnostics et à des solutions thérapeutiques fondées sur les prédispositions individuelles vis-à-vis de l'infection, y compris le développement de probiotiques. Les méthodes de séquençage génique à haut débit ont ouvert la porte à une ère de médecine personnalisée et pourraient permettre l'introduction de la génomique dans la santé publique et l'épidémiologie.



# *II*

---

**Etude du microbiote vaginal comme  
marqueur de l'infection prévalente par  
*Chlamydia trachomatis***

---



## Chapitre

# 9

## Justification

### 9.1 Critères de dépistage

Après avoir étudié de manière comparée l'association entre microbiote vaginal et quatre des IST les plus prévalentes dans la littérature existante, mon travail de thèse s'est concentré sur l'étude de cas de l'infection par *C. trachomatis*. L'infection par *C. trachomatis* est l'infection la plus prévalente en France, aux Etats-Unis et dans le monde. Ses caractéristiques en font une infection propice au dépistage. En effet, elle réunit les critères suivants :

1. **Existence d'un test de dépistage efficace** : les infections par *C. trachomatis* peuvent être détectées de manière directe par des techniques de biologie moléculaire (hybridation moléculaire et techniques d'amplification génique *in vitro* comme la *Polymerase-Chain-Reaction* –PCR– ou la *Transcription-Mediated-Amplification* –TMA–) qui permettent le dépistage dans différents prélèvements, comme les prélèvements vaginaux, les urines, ou encore le sperme, contrairement à la culture cellulaire utilisée précédemment ou à la détection indirecte par détection d'anticorps qui ne permet pas de distinguer une infection aiguë ou actuelle d'une infection passée.
2. **Existence d'un traitement antibiotique efficace** : 1 g d'azithromycine en une prise unique, ou 100 mg de doxycycline deux fois par jour pendant une semaine [30], les deux traitements ayant une efficacité supérieure à 95% pour l'infection génitale basse [31].
3. **Infection asymptomatique** : chez les femmes, l'infection est asymptomatique dans 30 à 90% des cas, selon les populations d'étude, et dans plus de 90% des cas chez les hommes [18]. Lorsqu'une infection est symptomatique, les personnes infectées sont plus à même de consulter dès l'apparition des symptômes, et de se faire traiter. Le réservoir humain de l'infection est essentiellement constitué des personnes infectées asymptomatiques qui ne savent donc pas qu'elles sont infectées.
4. **Infection fréquente** : l'infection doit être fréquente au regard de la taille de la population cible du dépistage. Si la prévalence en population générale est faible, il est nécessaire de restreindre la population cible du dépistage sur les individus « à risque »



d'infection, ce qui augmente artificiellement cette prévalence dans la population cible, et rend le dépistage plus efficace et plus coût-efficace.

5. **Infection aux conséquences graves** : afin que la balance bénéfices-risques d'un dépistage soit positive, les bénéfices d'un dépistage doivent être suffisamment importants pour contre-balancer les risques du dépistage : faux positifs et faux négatifs, stress engendré par le diagnostic de maladie [122], traitements aux effets secondaires pour l'individu et enjeux de l'antibiorésistance en population, taux de réinfection plus important chez les personnes traitées [16] et par conséquent taux d'évolution vers les IGH plus élevé dû à l'exposition répétée à *C. trachomatis* [123]. Seules les maladies dont le dépistage permet d'éviter un cas de complication grave présentent un bénéfice substantiel au regard des risques non nuls d'un dépistage. L'infection par *C. trachomatis* est responsable d'IGH pouvant mener à des infertilités tubaires et des grossesses extra-utérines, complications graves en termes de santé reproductive. Cependant, même si la proportion attribuable d'IGH dues à *C. trachomatis* est évaluée à environ 10% [20, 21], le nombre de cas d'IGH évités par le dépistage de *C. trachomatis* est incertain.
6. **Dépistage non coûteux** : Pour des questions d'arbitrages en santé publique et d'équilibrages budgétaires, le dépistage doit être peu coûteux au regard du nombre et/ou du coût de cas de complications évités. Cette notion est également dépendante des priorités de santé publique fixées.

À noter que l'un des critères essentiels pour optimiser le dépistage d'une infection est la connaissance précise du **délai entre le stade précoce de l'infection et l'apparition des complications**, ce délai devant être au moins aussi grand que la fréquence de dépistage proposée. De ce fait, si les complications se développent trop rapidement après l'acquisition au niveau des voies basses, alors la fenêtre d'opportunité pour le dépistage est trop petite pour que le dépistage soit efficace. Or le délai d'évolution de l'infection génitale basse par *C. trachomatis* vers l'IGH est encore sujet à débat [124]. Une étude de modélisation mathématique a mis en évidence le fait que les complications pouvaient se développer tout au long de l'histoire naturelle de l'infection par *C. trachomatis*, soit de 1 à 12 mois environ (modélisation avec un taux constant de passage vers l'IGH compatible avec les données publiées) [21].

## 9.2 Ciblage du dépistage de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Malgré ces caractéristiques adaptées au dépistage, l'infection par *C. trachomatis* est en augmentation à la fois en France, mais aussi aux Etats-Unis et partout dans le monde, quelle que soit la stratégie de dépistage mise en œuvre pour contrôler l'infection. En France, les données de surveillance indiquent une augmentation du nombre de cas détectés (avec les écueils évoqués en Introduction). Aux Etats-Unis, il y avait plus de 1,7 millions de cas d'infections génitales à *C. trachomatis* rapportés en 2017, soit un taux de 528,8 cas pour 100 000 et une augmentation de 6,9% depuis 2016 [10]. De plus, le taux d'infection par *C. trachomatis* pourrait être largement sous-estimé, puisqu'une grande majorité des hommes et des femmes CT-positifs sont supposés asymptomatiques [18, 125] et n'accèdent donc peut-être pas aux programmes de dépistage. De ce fait, les hommes et femmes affectés par une infection asymptomatique pourraient constituer le réservoir de cette infection [126].

Par ailleurs, la mise en place d'un dépistage systématique peut se révéler extrêmement coûteuse au vu de la prévalence de l'infection. Une alternative au dépistage systématique consisterait à cibler le dépistage sur les populations à risque d'infections. Le ciblage sur une tranche d'âge permet d'augmenter l'efficacité du dépistage. L'infection par *C. trachomatis* est particulièrement prévalente chez les adolescents et jeunes femmes entre 15 et 24 ans, avec un taux rapporté d'infection quatre fois supérieur à celui de la population générale aux États-Unis [9, 10]. D'autres critères permettant de définir une population comme « à risque » se fondent actuellement sur un ensemble de pratiques sexuelles et d'expositions externes, e.g. le nombre de partenaires sexuels dans la dernière année. Mais ces critères pourraient également se fonder sur l'existence d'une susceptibilité de l'hôte, par exemple génétique, immunologique ou microbiologique, soit des facteurs intrinsèques de l'hôte. Dans ce travail de thèse, j'étudie le microbiote vaginal comme facteur associé à l'infection par *C. trachomatis*, que ce soit parce qu'un état du microbiote vaginal ou une perturbation de celui-ci modifie le risque d'acquisition, ou parce que l'infection elle-même modifie la composition et/ou la structure du microbiote vaginal. Quel que soit le sens de cette association, celle-ci se traduira nécessairement par une association entre microbiote vaginal et cas prévalents. L'étude des cas prévalents est donc une étape préliminaire à l'étude séparée de l'amont et de l'aval de l'infection, mais a aussi un autre objectif propre : déterminer s'il existe des marqueurs "microbiotaux" de l'infection par *C. trachomatis*. Dans le cas où des marqueurs "microbiotaux" de l'infection de *C. trachomatis* (et potentiellement d'autres IST) seraient mis en évidence, une stratégie de dépistage ciblée pourrait consister à inclure dans les définitions de populations « à risque » la notion d'état du microbiote vaginal.

### 9.3 Objectif

Pour répondre à cette question, une analyse transversale du microbiote vaginal a été menée afin d'identifier des marqueurs de l'infection, sur deux populations distinctes dans des structures de dépistage : une population de jeunes femmes dans un Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) à Bordeaux, en France, et une population de jeunes femmes dans une clinique IST à Baltimore, aux États-Unis.



## Chapitre

# 10

## Méthodes et données de l'étude française

Les données et résultats de ce chapitre et du suivant (chapitre 11) sont issus d'une étude en collaboration avec le Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) de Bordeaux et le Centre National des Références des IST bactériennes. Cette étude a donné lieu à la publication d'un article dans « Sexually Transmitted Infections » (Appendice B) [127].

### 10.1 Schéma d'étude et population d'étude

Une enquête transversale a été mise en place en Juin 2015 dont le but était de caractériser la composition du microbiote vaginal chez les jeunes femmes se présentant dans un CDAG à Bordeaux, en France. Les participantes fournissaient un échantillon vaginal auto-prélevé pour le dépistage en routine de *C. trachomatis* (CT) et des données sociodémographiques telles que l'âge, le lieu de naissance, l'orientation sexuelle et les motifs de consultation. Pour information, ce CDAG offre la possibilité aux patients de rester anonyme. Ainsi, les données sociodémographiques, y compris l'âge, n'étaient pas systématiquement collectées.

### 10.2 Dépistage de *Chlamydia trachomatis* et caractérisation du microbiote vaginal

Les échantillons vaginaux étaient conservés dans un milieu Aptima (Hologic©) permettant le transport à température ambiante. Le dépistage de CT était réalisé par le Centre National de Référence utilisant un test d'amplification par transcription (*Transcription-Mediated-Amplification*) Aptima-combo 2. Un aliquot de 200 µl de l'échantillon était centrifugé et suspendu dans 300 µl de tampon de lyse MoBio Microbiome Kit (MoBio/Qiagen) et processé selon les indications du fabricant. L'ADN était élué dans 100 µl de tampon d'éluion. La composition du microbiote vaginal était caractérisée par séquençage de l'amplicon du gène

de l'ARNr 16S [128] sur une plateforme Illumina MiSeq (San Diego, CA, USA) en utilisant un protocole en paire de 300 bases. Un total de 50 ng d'ADN était sujet à l'amplification par PCR de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S par une approche de double indexation décrite précédemment [129]. Les séquences étaient traitées tel que décrit dans Fadrosch et al. [128] et l'assignation taxonomique était effectuée sur chaque séquence assemblée grâce à PECAN, un classificateur taxonomique rapide et nouveau permettant la classification de toutes les séquences [130].

### 10.3 Regroupement hiérarchique et analyses statistiques

Les échantillons ont été classés en types d'état communautaire (CST) grâce à une méthode de regroupement hiérarchique (*hierarchical clustering*). Le regroupement était mis en œuvre grâce au package *stats* de R [131] en utilisant un regroupement hiérarchique de type liaison de Ward (*Ward linkage*) et utilisant la mesure de divergence de Jensen-Shannon. La divergence de Jensen-Shannon est une mesure de dissimilarité entre probabilités de distribution, et la mesure de divergence de Jensen-Shannon est la racine carrée de la divergence de Jensen-Shannon normalisée entre 0 et 1 [120, 132]. Les femmes CT-positives et les femmes CT-négatives étaient comparées en termes de CST grâce au test exact de Fisher. Pour les analyses au niveau des phylotypes, nous avons appliqué un modèle de régression binomiale négative dans le package *MASS* sur R, et en parallèle un modèle de régression binomiale négative intégrée dans le package *DESeq2* sur R, pour les phylotypes présents dans au moins 10% des échantillons (13 observations). Tous les tests statistiques étaient bilatéraux; les valeurs P inférieures à 0,05 étaient considérées comme statistiquement significatives. Pour les analyses par phylotype, une correction de Benjamini-Hochberg (BH) était appliquée pour corriger la multiplicité des tests. Les analyses statistiques ont été réalisées sur Stata 12.0 et R 3.3.0.

## Chapitre

# 11

## Résultats de l'étude française

### 11.1 Caractéristiques sociodémographiques des participantes

Au total, 151 femmes ont été recrutées dans le CDAG de Bordeaux et ont fourni un échantillon vaginal pour le diagnostic de CT et la caractérisation du microbiote vaginal, desquels 132 étaient analysables.

L'âge était disponible pour 119 femmes et s'étendait de 16 à 33 ans. Quatre-vingt-quatorze femmes (79,0%) étaient âgées de 18 à 24 ans. Les autres caractéristiques étaient disponibles pour 116 femmes. De ces 116 femmes, 87,9% étaient nées en France métropolitaine, tandis que les autres étaient nées à l'étranger ou dans les départements français d'Outre-mer. Une grande majorité d'entre elles se définissaient comme hétérosexuelles (94,8%) et 5,2% comme bisexuelles. Les motifs principaux de consultation étaient « rapport à risque » (20,5%), « problème d'utilisation de préservatif » (19,7%), « avant l'arrêt d'utilisation du préservatif » (19,7%) et « changement de partenaire » (13,7%). Une partie non négligeable de ces femmes indiquait d'autres motifs de consultation, à savoir « réorientée vers un Centre de Dépistage », « Dépistage IST », « sans raison particulière ». Fait intéressant, 6% des 117 femmes rapportant un motif de consultation ont consulté pour cause de symptômes d'infection (tableau 11.1).

TABLE 11.1 – Caractéristiques sociodémographiques et distribution des types d'état communautaire (CST) selon le statut *Chlamydia trachomatis*, chez 132 femmes se présentant au Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) en France, Juin 2015.

Variables	Catégories	Total		CT+		CT-		p*
		n	%	n	%	n	%	
Age (années) n = 119	<18	6	(5,0)	0	(0)	6	(6,1)	0,026
	[18 ; 24]	94	(79,0)	21	(100)	74	(74,5)	
	>24	19	(16,0)	0	(0)	19	(19,4)	
Origine n = 116	France métropolitaine	102	(87,9)	20	(95,2)	82	(86,3)	0,460
	Etranger ou départements d'outre-mer	14	(12,1)	1	(4,8)	13	(13,7)	
Orientation sexuelle n=116	Hétérosexuelle	110	(94,8)	19	(95,0)	91	(94,8)	1,000
	Bisexuelle	6	(5,2)	1	(5,0)	5	(5,2)	
Motifs de consultation n=117	Avant arrêt préservatif	23	(19,7)	5	(23,8)	18	(18,8)	0,033
	Changement de partenaire	16	(13,7)	1	(4,8)	15	(15,6)	
	Problème de préservatif	23	(19,7)	3	(14,3)	20	(20,8)	
	Rapport à risque	24	(20,5)	1	(4,8)	23	(24,0)	
	Symptômes	7	(6,0)	2	(9,5)	5	(5,2)	
	Autre	24	(20,5)	9	(42,9)	15	(15,6)	
CST n=132	Dominé par <i>L. crispatus</i> (I)	49	(37,1)	4	(19,1)	45	(40,5)	0,177
	Dominé par <i>L. gasseri</i> (II)	2	(1,5)	1	(4,8)	1	(0,9)	
	Dominé par <i>L. iners</i> (III)	51	(38,6)	11	(52,4)	40	(36,0)	
	Groupe divers (IV)	29	(22,0)	5	(23,8)	24	(21,6)	
	Dominé par <i>L. jensenii</i> (V)	1	(0,8)	0	(0)	1	(0,9)	

\*Test exact de Fisher.

## 11.2 Composition et structure du microbiote vaginal chez des jeunes femmes en France

Les CST dominés par *L. crispatus* (CST I), *L. iners* (CST III) ou ne présentant pas ou peu de *Lactobacillus* spp. mais un large éventail de bactéries anaérobies strictes et facultatives (CST IV) représentaient 37,1%, 38,6% et 22,0% des échantillons respectivement (tableau 11.1 et figure 11.1). Seuls quelques échantillons étaient assignés aux CST II et CST V (figure 11.1).

Les proportions des 6 espèces bactériennes formant le microbiote vaginal les plus abondantes sont représentées sur la figure 11.1. *L. crispatus* était présent en très faible ou très grande proportion, correspondant jusqu'à 97% des séquences chez certaines femmes. De la même manière, la proportion de *L. iners* chez certaines femmes atteignait 98%. Parmi les communautés des CST IV, aucune espèce bactérienne ne dominait le microbiote vaginal, mais à la fois *Gardnerella vaginalis* et *Atopobium vaginae* étaient communément retrouvées.

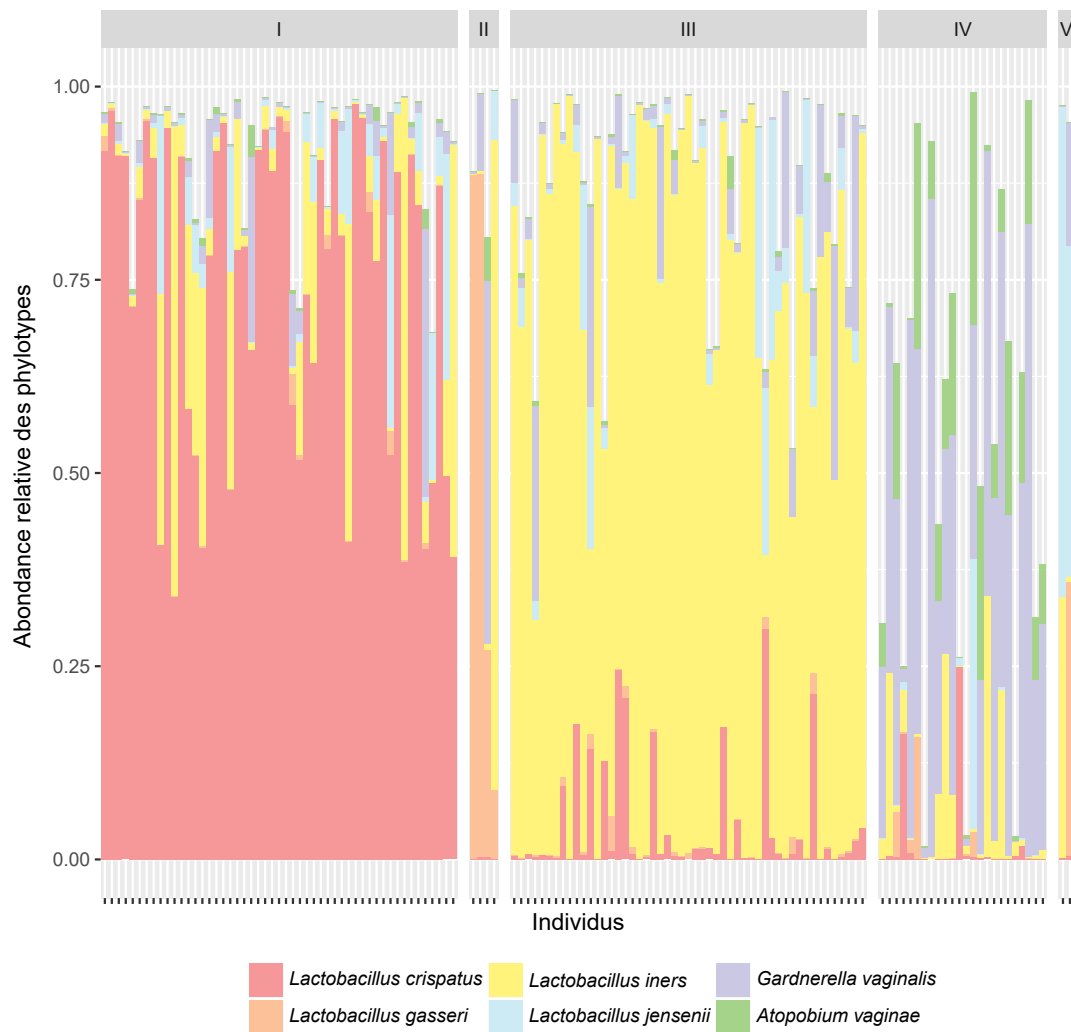


FIGURE 11.1 – Abondance relative des 6 phylotypes bactériens vaginaux principaux, groupés par type d'état communautaire (I, II, III, IV, V, en haut), chez 132 femmes se présentant en Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) en France, Juin 2015.

Au sein des CST I et CST III, deux sous-groupes ont pu être mis en évidence, l'un pour lequel *Lactobacillus* spp. était extrêmement dominant (CST I-A et CST III-A) et l'autre pour lequel l'espèce était également dominante mais en moindre quantité, et d'autres taxons étaient également présents en faible abondance (CST I-B et CST III-B) (figure 11.2).



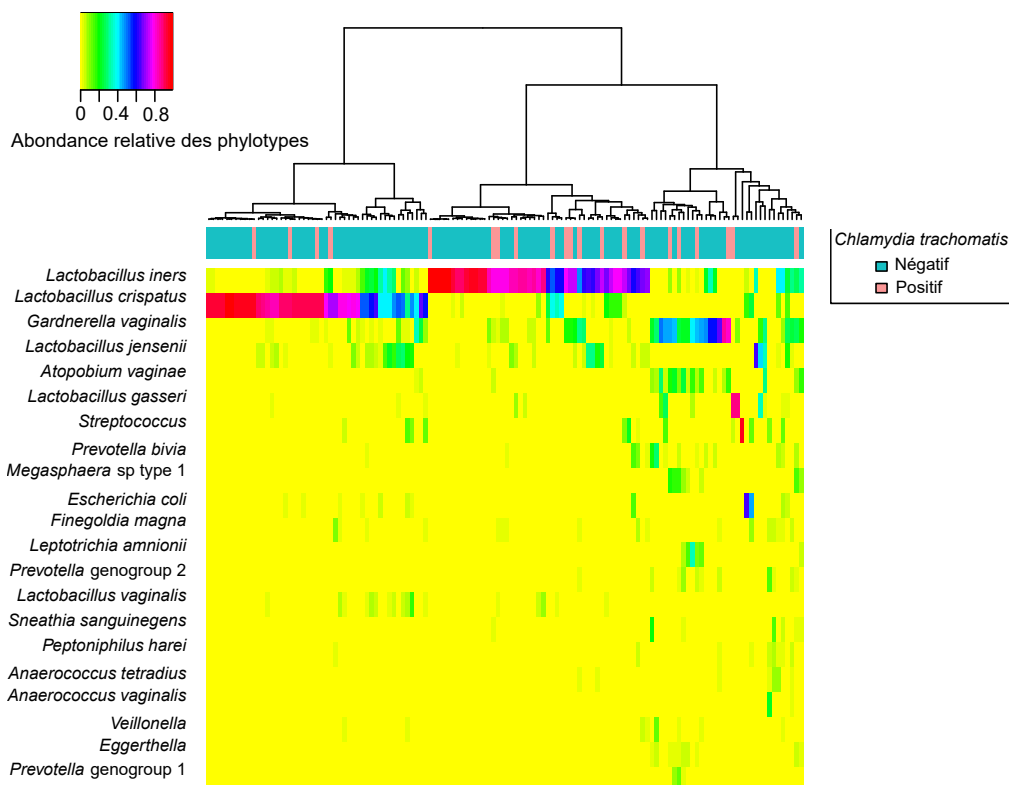


FIGURE 11.2 – Heatmap des abondances relatives des taxons bactériens retrouvés dans les communautés bactériennes vaginales de 132 femmes se présentant en Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit (CDAG) en France, Juin 2015.

Les femmes CT-positives sont indiquées par une barre rose en haut du graphe.

## 11.3 Association entre infection par *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal

### 11.3.1 Analyse par type d'état communautaire

Vingt-et-une femmes (15,9%) parmi les 132 étaient positives pour CT. Toutes les femmes CT-positives étaient âgées de 18 à 24 ans. Les femmes rapportant « avant l'arrêt de l'usage du préservatif » et « symptômes » comme motifs de consultation étaient significativement plus à même d'être positives pour CT que celles rapportant d'autres motifs de consultation. Les proportions de femmes CT-positives dans ces deux catégories étaient de 21,7% (5/23) et 28,6% (2/7) respectivement, alors que curieusement elle n'était que de 4,2% (1/24) dans la catégorie « rapport à risque » (tableau 11.1 page 66).

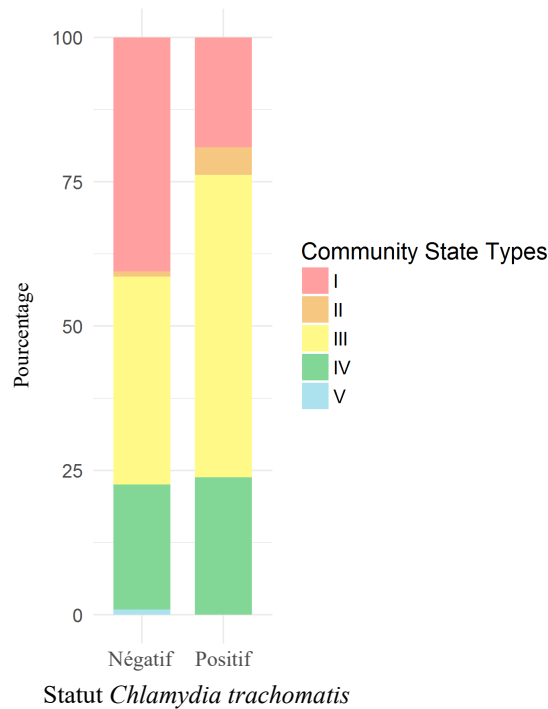


FIGURE 11.3 – Proportions de types d'état communautaire chez 21 femmes CT-positives et 111 femmes CT-négatives se présentant dans un Centre de Dépistage Anonyme et Gratuit en France, Juin 2015.

Les proportions de femmes CT-positives étaient plus élevées dans les CST III (21,6%) et CST IV (17,2%) que dans le CST I (8,2%) (figure 11.2 page 68). Le CST I représentait 19,1% des femmes CT-positives et 40,5% des femmes CT-négatives, tandis que ces proportions étaient de 52,4% et 36,0% pour le CST III, et de 23,8% et 21,6% pour le CST IV (figure 11.3). Les odds-ratios correspondant au fait d'être positive pour CT par rapport au fait d'être négative pour CT étaient de 3,09 (IC 95% 0,91 – 10,49) pour le CST III comparé au CST I, et de 2,34 (IC 95% 0,58 – 9,55) pour le CST IV comparé au CST I, bien que ces résultats n'étaient pas statistiquement significatifs.

### 11.3.2 Analyse par phylotype

Des analyses par phylotypes ont également été réalisées pour évaluer l'association entre chaque espèce bactérienne et l'infection prévalente par *C. trachomatis*. La profondeur de séquençage pour les échantillons de l'étude et par statut CT est présentée dans le tableau 11.2. Seuls les phylotypes présents dans au moins 10% des échantillons (soit plus de 13 échantillons) ont été analysés. Des 76 phylotypes restants, 7 étaient significativement différenciellement présents entre les échantillons CT-positifs et CT-négatifs d'après l'analyse *DESeq2* et 11 retrouvés par l'utilisation d'un modèle binomial négatif, dont 6 retrouvés par les deux modèles (tableau 11.3). La concordance des deux méthodes est évaluée grâce à un graphe de  $-\log_{10}$  des valeurs q de la méthode *DESeq2* en fonction de  $-\log_{10}$  des valeurs q de la méthode par régression binomiale négative (figure 11.4).

TABLE 11.2 – Description du total de séquences obtenues par échantillon, par séquençage du gène de l'ARNr 16S, au sein de 132 femmes positives et négatives pour *Chlamydia trachomatis*, en France, Juin 2015.

Echantillons	N	Min	Q1	Médiane	Moyenne	Q3	Max
Tous	132	261	17980	33220	32250	44290	74750
CT-négatifs	111	261	17420	33150	31140	43580	74680
CT-positifs	21	8117	22070	34720	38130	50970	74750

TABLE 11.3 – Espèces différentiellement exprimées au sein de 132 femmes positives et négatives pour *Chlamydia trachomatis*, dans un CDAG en France, Juin 2015.

Phylotypes	DESeq2		Régression binomiale négative	
	Log2 Fold Change*	q-value**	Beta	q-value**
BVAB1	-5,18	0,00458	-3,87	0,00232
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	-4,08	<0,0001	-1,75	0,00253
<i>Escherichia coli</i>	-2,44	0,00059	-2,10	<0,0001
<i>Varibaculum cambriense</i>	-1,71	0,06743	-2,24	0,00232
<i>Dialister</i> sp. type 3	-1,42	0,07141	-1,53	0,01251
<i>Dialister propionicifaciens</i>	-1,16	0,03108	-1,07	0,02267
<i>Eubacterium saphenum</i>	-0,76	0,27877	-1,41	0,01632
<i>Mycoplasma hominis</i>	-0,64	0,41271	-1,27	0,02267
<i>Megasphaera</i> sp. type 1	2,55	0,01780	1,83	0,00524
<i>Gemella</i>	3,22	0,00121	1,46	0,06608
<i>Bifidobacterium breve</i>	4,36	0,00059	2,56	0,00524

\*Les valeurs négatives de log2 Fold Change indiquent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons CT-négatifs et les valeurs positives ceux sur-représentés dans les échantillons CT-positifs.

\*\*La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

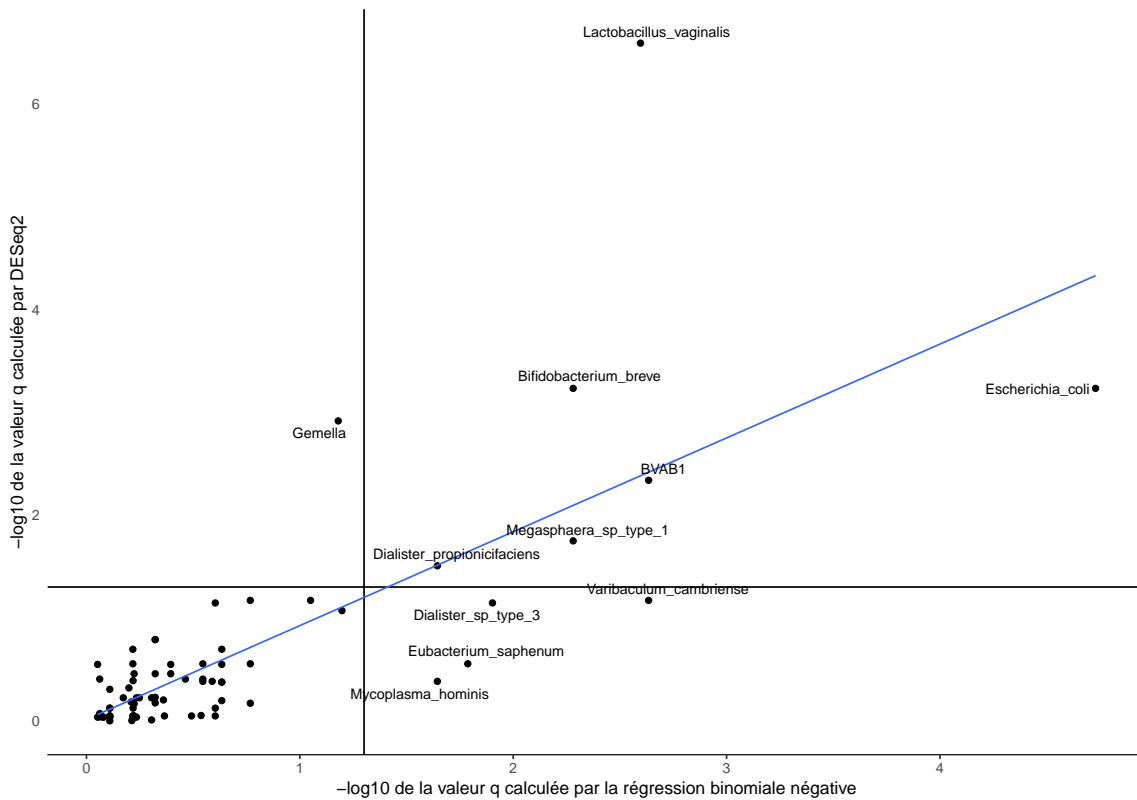


FIGURE 11.4 – Évaluation de la corrélation des q-values calculées par les méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative, pour la comparaison des phylotypes présents chez 132 femmes dans un CDAG en France, Juin 2015.

La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.



## Chapitre

# 12

## Méthodes et données de l'étude américaine

### 12.1 Schéma d'étude

Dans cette seconde étude aux États-Unis, les adolescentes et jeunes femmes ont été dépistées pour l'infection par *C. trachomatis* dans des centres de soins cliniques ainsi que leurs postes avancés en population par le personnel clinique de l'Université du Maryland – École de Médecine, Département de Pédiatrie, au Centre de l'Adolescent et du Jeune Adulte (Adolescent and Young Adult Center staff - AYAC). Les patientes étaient invitées à participer au projet de recherche Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) pendant leur visite gynécologique, après information sur leur positivité pour l'infection à *C. trachomatis*, déterminée par tests d'amplification de l'acide nucléique (NAAT) sur prélèvements urinaires. L'étude a été approuvée par le « Adolescent Clinic Community Advisory Board » et par le comité d'éthique institutionnel de l'Université du Maryland, sous le numéro HP-00042350. Les patientes incluses dans la présente analyse étaient des femmes de 12 à 40 ans, sexuellement actives et CT-positives. La cohorte CHARM est décrite en détail ici [133]. De plus, 99 femmes africaines-américaines CT-négative, âgées de 19 à 44 ans, incluses dans l'étude transversale Vaginal Microbiota 400 Woman Study (VM400) de l'Université du Maryland, ont servi de population contrôle.

### 12.2 Procédure de l'étude

À la visite d'inclusion dans CHARM, un questionnaire audio assisté par ordinateur (ACASI) était auto-administré. Des cliniciens réalisaient un examen physique, une collecte d'échantillons, et fournissaient un traitement pour l'infection par *C. trachomatis* par azithromycine 1 g *per os* en dose unique. À chacune des trois visites trimestrielles supplémentaires, les examens cliniques et les questionnaires étaient répétés et un dépistage CT était réalisé avec traitement par azithromycine quand nécessaire.

Les échantillons par écouvillonnage vaginal étaient collectés avant traitement antibiotique sur les parois vaginales à mi-hauteur et préservés dans 1 ml de liquide Copan du système de collecte et de transport Amies Elution Swab (ESwab, Copan Diagnostics Inc.), et conservés à -80 °C. La positivité à CT était déterminée par BD Prove Tech, le test clinique choisi par le laboratoire du Centre médical de l'Université du Maryland. L'IGH était diagnostiquée selon les critères du CDC [30].

## 12.3 Préparation des échantillons, amplification génique de l'ARNr 16S et séquençage

L'ADN génomique total était extrait à partir d'aliqots de 1 ml de la solution de suspension Amies ESwab, comme décrit précédemment [42]. L'amplification et le séquençage à haut débit des régions hypervariables V3-V4 du gène de l'ARNr 16S ont été réalisés par une approche de double indexation validée et améliorée sur la plateforme Illumina MiSeq [128]. Le processus bioinformatique a suivi le workflow DADA2 pour les Big Data et dada2 (v.1.5.2) (<https://benjjneb.github.io/dada2/bigdata.html>, [134]) tel que décrit précédemment [135].

La taxonomie a été assignée à chaque variant de séquence d'amplicon (amplicon sequence variant - ASV) généré par dada2 grâce à SpeciateIT (version 1.0), un classifieur rapide de séquences (<http://ravel-lab.org/speciateit>). Les séquences ASV assignées à la même taxonomie ont été additionnées pour chaque échantillon. Les analyses de données incluent le regroupement hiérarchique des profils communautaires basés sur une distance euclidienne et une liaison de Ward, et l'assignation à l'un des types d'état communautaire (CST) décrits précédemment [42, 120].

## 12.4 Analyse statistique

Les analyses ont été effectuées sur les échantillons présentant un minimum de 1000 séquences et sur les phylotypes présents dans au moins 2 échantillons. Les caractéristiques à l'inclusion entre les participantes CHARM ayant été perdues de vue après la première visite et les autres ont été comparées par tests de Fisher. Afin de comparer la composition et la structure du microbiote vaginal au sein de différents groupes, nous avons conduit des analyses au niveau du phylotype et au niveau des CST. Au niveau du phylotype, nous avons appliqué un modèle de régression binomiale négative pour chaque phylotype présent dans au moins 20% des échantillons, dans le package *DESeq2* sur R [45]. Au niveau des CST, nous avons appliqué un modèle de régression logistique pour comparer les échantillons CHARM de la visite 1 (CT-positifs) aux contrôles VM400.

## Chapitre

# 13

## Résultats de l'étude américaine

### 13.1 Description de la cohorte

Cent-quarante-neuf femmes VIH-négatives avec une infection à *C. trachomatis* confirmée, majoritairement Afro-américaines (86%), âgées de 13 à 33 ans, de la région de Baltimore, Maryland, aux États-Unis ont été incluses dans cette étude longitudinale prospective (CHARM). Elles ont fourni 141 échantillons valides CT-positifs à l'inclusion, avant de recevoir un traitement antibiotique de 1 g d'azithromycine en dose unique. Des échantillons de suivi à 3, 6 et 9 mois après traitement (92, 85 et 77 échantillons respectivement, voir figure 13.1) ont été collectés et testés pour CT. Le taux de positivité était de 18% (N=17), 14% (N=12) et 18% (N=14) respectivement à chacune de ces visites.

Les caractéristiques démographiques, comportementales et d'histoire médicale de toutes les participantes de CHARM sont résumées dans le tableau 13.1. Les femmes ayant arrêté l'étude après la première visite (n=49) étaient moins susceptibles d'avoir une IGH à l'inclusion, mais aucune autre caractéristique à l'inclusion n'était significativement différente entre ces femmes et celles n'ayant pas arrêté l'étude (n=100) (âge, race, statut marital, éducation, orientation sexuelle, nombre de partenaires vie entière, nombre de partenaires dans les 3 derniers mois, consommation de tabac, score de Nugent et contraception hormonale).

Pour la cohorte CHARM, nous avons obtenu 7 396 180 séquences de haute qualité avec une moyenne de 18 725 (écart-type (sd) 18 325) séquences par échantillon. Pour le groupe contrôle VM400, nous avons généré 3 349 907 séquences avec 33 837 (sd 17 024) séquences par échantillon en moyenne. Un total de 319 phylotypes ont été identifiés dans l'ensemble des échantillons CHARM et VM400, et l'abondance relative de chaque phylotype est illustrée dans la figure 13.2 (données disponibles sur [https://github.com/ravel-lab/CHARM\\_LONGITUDINAL](https://github.com/ravel-lab/CHARM_LONGITUDINAL)).





TABLE 13.1 – Caractéristiques à l'inclusion des 149 femmes incluses dans la cohorte prospective CHARM, à Baltimore, MD.

	n*	(%)
Nombre de visites	149	
1**	49	32,9
2	14	9,4
3	26	17,4
4 (suivi complet)	60	40,3
Ethnicité/race	143	
Noir/Africain-Américain	125	87,4
Blanc/Caucasien	6	4,2
Autre	12	8,4
Groupe d'âge	145	
<18	45	31,0
[18 ; 24]	91	62,8
>24	9	6,2
Groupe d'indice de masse corporelle	142	
<18.5 (insuffisance pondérale)	4	2,8
[18.5 ; 24.9 ] (corpulence normale)	70	49,3
[25 ; 29.9] (surpoids)	28	19,7
>30 (obèse)	40	28,2
Statut marital	143	
Célibataire	130	90,9
Marié/en couple	7	4,9
Divorcé/séparé	6	4,2
Niveau d'éducation	117	
Grade 8 ou moins	12	10,3
>grade 8, <grade 12	44	37,6
Diplôme du baccalauréat	56	47,9
Diplôme du supérieur	5	4,3
Orientation sexuelle	142	
Hétérosexuel	123	86,6
Homosexuel	1	0,7
Bisexuel	18	12,7
Âge aux premières règles	140	
<12	50	35,7
[12 ; 13]	60	42,9
>13	30	21,4
Protection menstruelle	145	
Serviette hygiénique	74	51,0
Tampon	18	12,4
Serviette hygiénique et tampon	48	33,1
Rapports sexuels dans les 3 derniers mois		
Voie vaginale (N=142)	137	96,5
Voie orale (N=126)	104	82,5
Voie anale (N=40)	17	42,5

(Suite)	n*	(%)
Nombre de partenaires sexuels dans les 3 derniers mois		143
Aucun	6	4,2
1	69	48,3
2 ou plus	68	47,6
Nombre de partenaires sexuels vie entière		143
<5	47	32,9
[5 ; 10[	55	38,5
10 ou plus	41	28,7
Utilisation du préservatif dans les 3 derniers mois		145
Toujours	11	7,6
Souvent	40	27,6
Parfois	47	32,4
Rarement	22	15,2
Jamais	25	17,2
Consommation d'alcool vie entière		145
Oui	102	70,3
Consommation actuel de tabac		145
Oui	28	19,3
Consommation de drogue dans le mois précédent		143
Oui	34	23,8
Grossesse(s) vie entière		141
Oui	73	51,8
Douche vaginale		136
Oui	40	29,4
Contraception hormonale actuelle		145
Aucune	90	62,1
A base d'oestradiol	18	12,4
A base de progestine	37	25,5
IST dans les 3 derniers mois (déclaratif)		120
Infection par <i>Chlamydia trachomatis</i>	89	74,2
Infection par Gonocoque	8	6,7
Syphilis	1	0,8
Infection par <i>Trichomonas vaginalis</i>	6	5,0
Herpès	1	0,8
HPV	1	0,8
IST vie entière (déclaratif)		145
Infection par <i>Chlamydia trachomatis</i>	108	74,5
Infection par Gonocoque	22	15,2
Syphilis	3	2,1
Infection par <i>Trichomonas vaginalis</i>	26	17,9
Herpès	6	4,1
HPV	6	4,1

\*Toutes les variables n'ont pas été renseignées par toutes les femmes. \*\*Les femmes n'ayant qu'une première visite n'étaient pas des perdues de vue. La participation à l'étude longitudinale requérait un consentement additionnel.

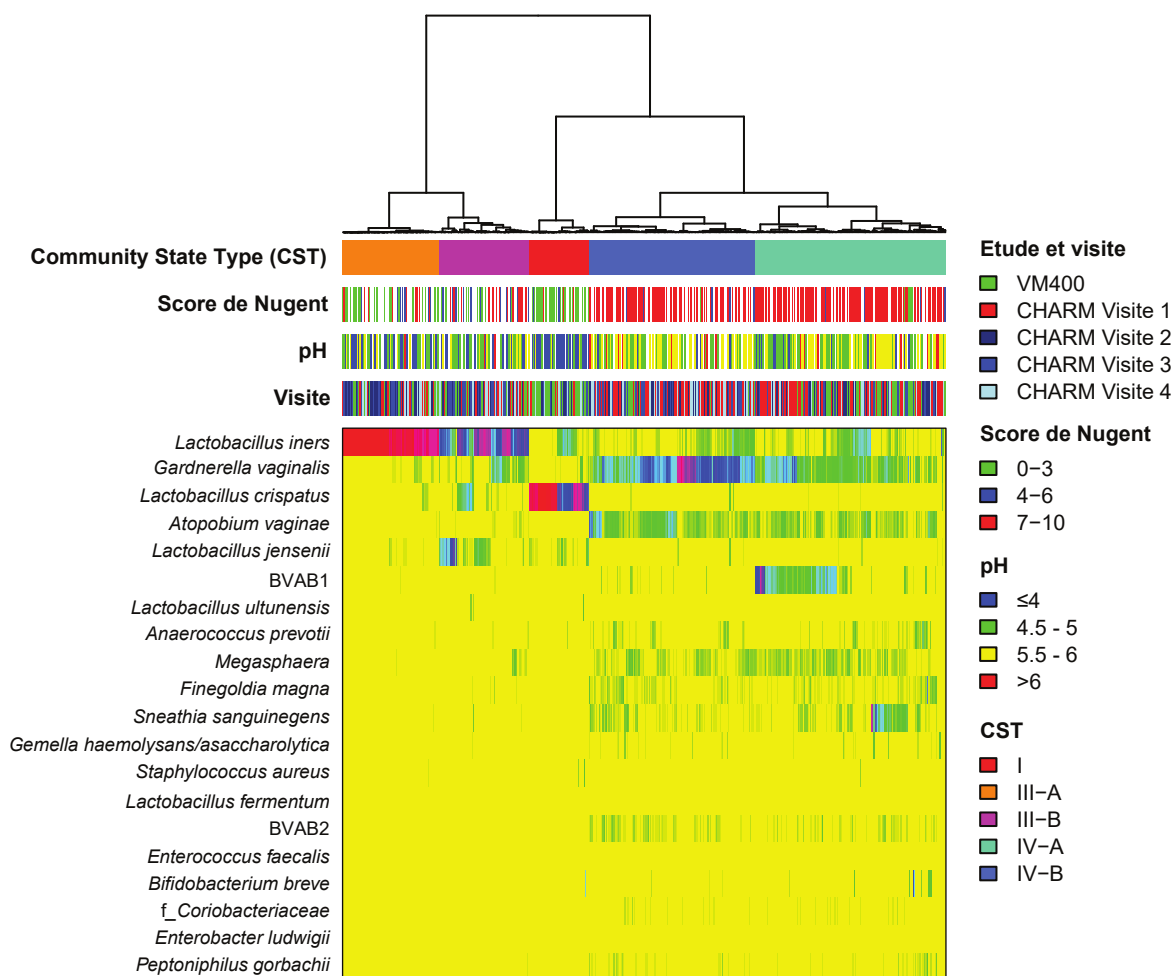


FIGURE 13.2 – Heatmap des abondances relatives des phylotypes dans 395 échantillons de la cohorte prospective CHARM et 99 échantillons de l'étude transversale VM400.

Un regroupement par liaison de Ward a été utilisé pour grouper les échantillons sur la base de leur distance euclidienne calculée dans le package *vegan* sur R. Les quatre barres horizontales indiquent les types d'état communautaire (CST) selon la convention de nomenclature [42], le score de Nugent [39], le pH vaginal et le numéro de la visite.

## 13.2 Association entre la composition du microbiote vaginal et l'infection prévalente par *Chlamydia trachomatis*

### 13.2.1 Analyse par type d'état communautaire

Afin de diminuer la dimensionnalité de la base de données, nous avons procédé à un regroupement hiérarchique des échantillons en fonction de leur distance euclidienne et par liaison de Ward pour identifier les CST, tel que décrit précédemment dans la littérature [42, 120], i.e. les types de microbiotes à composition et abondance bactérienne similaires. Les échantillons ont été assignés à trois CST, desquels deux (CST I et III) étaient dominés par une espèce du genre *Lactobacillus*, *L. crispatus* et *L. iners* respectivement. Le CST IV est de nature distincte des autres CST car ce groupe ne possède pas d'espèce de *Lactobacillus* dominante mais est composé d'un éventail divers de bactéries anaérobies strictes et facultatives. Un examen plus fin permet de révéler l'existence de deux sous-types à l'intérieur des CST III et IV, nommément A et B, en fonction de l'abondance relative de l'espèce dominante. Brièvement, le CST III-A correspond à un sous-type où *L. iners* domine la communauté vaginale à une abondance relative de plus de 80%, alors que pour le CST III-B *L. iners* reste l'espèce dominante mais à un niveau plus faible tandis que des bactéries anaérobies strictes et facultatives sont aussi présentes. À l'intérieur du CST IV, le CST IV-B se distingue par une abondance plus élevée de *Gardnerella vaginalis*.

En utilisant un modèle de régression logistique, nous avons trouvé que les fréquences de chaque CST entre les échantillons CHARM visite 1 et les échantillons contrôles VM400 étaient significativement différentes (détails dans la tableau 13.2). Nous avons observé que les CST III-A et CST III-B (dominés par *L. iners*), CST IV-A et CST IV-B étaient significativement sur-représentés dans les échantillons CHARM comparés aux contrôles (OR 4,51 IC 95% [1,41-16,42], 5,20 [1,66-18,72], 8,98 [3,38-28,59] et 26,52 [8,84-94,91]; p-values 0,015, 0,007, <0,001 et <0,001, respectivement), comme illustré dans la figure 13.3. À noter que la majorité des échantillons du CST IV (91%) présentaient un score de Nugent supérieur à 7, ce qui est indicatif d'une VB [39].

TABLE 13.2 – Résultats d'un modèle de régression logistique comparant 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) à 99 échantillons VM400 contrôles en termes de CST.

CST	OR	2,5%	97,5%	P-value
I	1	-	-	-
III-A	4,51	1,41	16,42	0,01486
III-B	5,20	1,66	18,72	0,00686
IV-A	8,98	3,38	28,59	0,00004
IV-B	26,52	8,84	94,91	<0,00001

La catégorie de référence est le CST I (dominé par *Lactobacillus crispatus*).

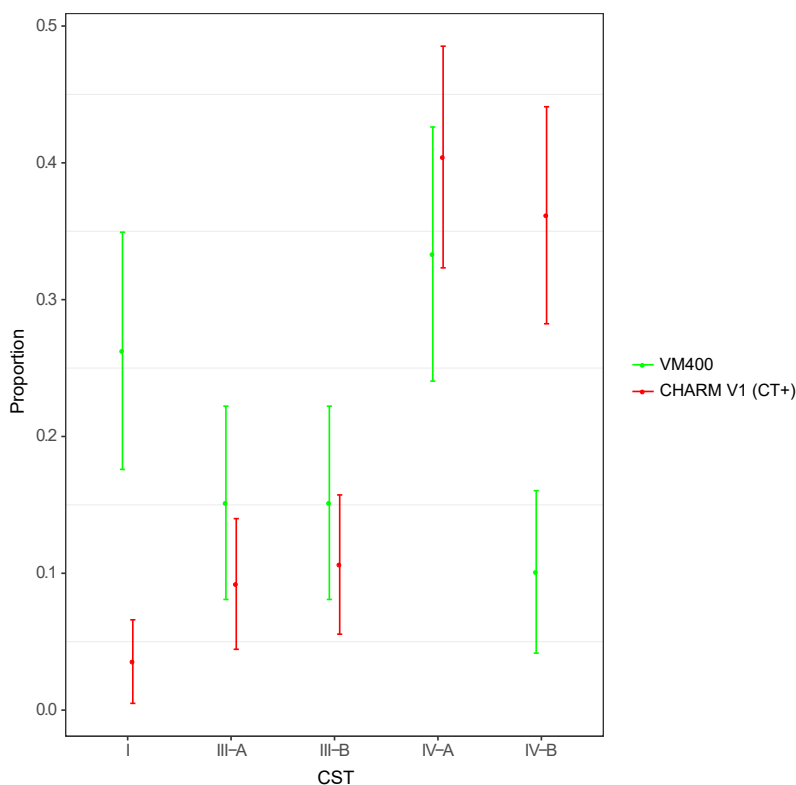


FIGURE 13.3 – Proportions des types d'états communautaires (CST) dans 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons contrôles VM400.

### 13.2.2 Analyse par phylotype

Pour l'analyse au niveau des phylotypes, les profondeurs de séquençage variaient entre les échantillons. Les profondeurs de séquençage par étude sont données dans le tableau 13.3. Nous avons appliqué un modèle de régression binomiale négative pour évaluer si des phylotypes spécifiques étaient associés à l'infection par *C. trachomatis* avant traitement antibiotique chez les participantes CHARM à la visite 1 comparées au groupe contrôle VM400. Nous avons comparé l'abondance absolue de 40 phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons CHARM visite 1 et VM400 (240 observations). La liste des phylotypes significativement associés à la visite 1 de CHARM ou aux contrôles VM400 est présentée dans le tableau 13.4. Globalement, 25 phylotypes étaient statistiquement significatifs, comme montré dans la figure 13.4, dont 11 phylotypes tels *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, BVAB2 ou *Mobiluncus curtisii* étaient sur-représentés dans les échantillons CT-positifs de CHARM, tandis que les espèces du genre *Lactobacillus* étaient toutes sur-représentées dans les échantillons CT-négatifs VM400.

La concordance des résultats selon les deux méthodes *DESeq2* et modèle de régression binomiale négative à excès de zéros est présentée dans la figure 13.5. La droite de régression linéaire indique une bonne corrélation entre les méthodes, et la sensibilité et la spécificité de la méthode de régression binomiale négative à excès de zéros par rapport à *DESeq2* sont respectivement de 72 et 73%.

TABLE 13.3 – Description du total de séquences obtenues par échantillon, par séquençage du gène de l'ARNr 16S, dans l'étude CHARM et l'étude VM400.

Etude	N	Min	Q1	Médiane	Moyenne	Q3	Max
Toutes visites	494	1174	8398	15830	21750	30640	142900
VM400	99	3918	20910	32570	33840	42120	90600
CHARM	395	1174	7420	12730	18720	24770	142900
CHARM Visite 1	141	1420	6270	9857	13160	15510	60630
CHARM Visite 2	92*	1354	7534	11440	15200	18570	50480
CT-négatifs	74	1354	7243	10950	15130	18710	50480
CT-positifs	17	2823	9505	12730	14670	16280	35500
CHARM Visite 3	85	1174	6520	17200	22300	29640	142900
CT-négatifs	73	1174	8012	18400	23030	29640	142900
CT-positifs	12	1294	5644	9574	17870	25970	65810
CHARM Visite 4	77	2471	12690	24260	29170	35800	135400
CT-négatifs	63	2471	13480	25200	31800	40440	135400
CT-positifs	14	3737	9023	16980	17360	24670	31070

\*Un test Chlamydia était indéterminé et n'est pas décrit séparément ici. Cet échantillon a été exclu des analyses des échantillons CT-négatifs de la visite 2.

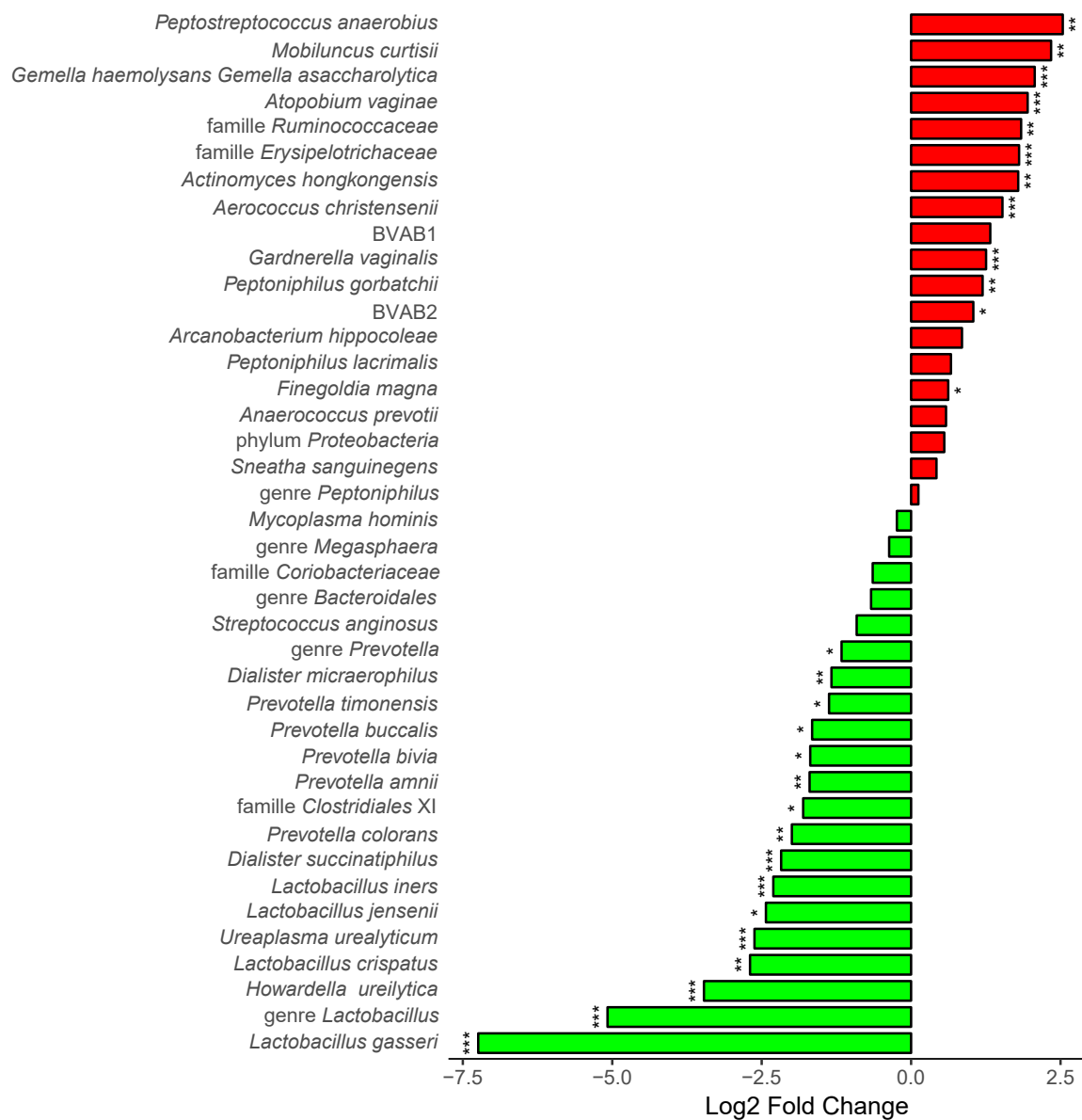


FIGURE 13.4 – Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative implémenté dans le package *DESeq2* sur R, au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons contrôles VM400, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Les barres vertes représentent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons contrôles VM400 et les barres rouges ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs). L'axe des abscisses représente le log2 de la différence. La significativité de la q-value (p-value corrigée par la correction de Benjamini-Hochberg) est indiquée par une (<0,05), deux (<0,01) ou trois étoiles (<0,001).



TABLE 13.4 – Espèces différentiellement exprimées selon un modèle de régression binomiale négative implémenté dans package *DESeq2* sur R, et selon un modèle de régression binomiale négative à excès de zéros, au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 99 échantillons VM400 contrôles, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Phylotypes	DESeq2		Régression binomiale négative à excès de zéro	
	Log2 FC*	q-value**	Beta	q-value**
<i>Lactobacillus gasseri</i>	-7,24	<0,00001	-2,46	0,00223
Genre <i>Lactobacillus</i>	-5,08	<0,00001	-2,69	<0,00001
<i>Howardella ureilytica</i>	-3,46	<0,00001	-1,58	0,00774
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-2,69	0,00463	-1,73	0,00314
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-2,62	0,00104	0,47	0,32811
<i>Lactobacillus jensenii</i>	-2,43	0,03156	-1,07	0,16017
<i>Lactobacillus iners</i>	-2,31	<0,00001	-0,29	0,28238
<i>Dialister succinatiphilus</i>	-2,17	<0,00001	-1,54	<0,00001
<i>Prevotella colorans</i>	-2,00	0,00592	-1,33	0,00909
Famille <i>Clostridiales</i> XI	-1,81	0,03062	-0,49	0,42544
<i>Prevotella amnii</i>	-1,70	0,01203	-1,41	0,00013
<i>Prevotella bivia</i>	-1,69	0,04952	-0,75	0,24378
<i>Prevotella buccalis</i>	-1,66	0,06366	-1,01	0,14754
<i>Prevotella timonensis</i>	-1,37	0,02855	-0,59	0,22533
<i>Dialister micraerophilus</i>	-1,33	0,00463	-0,77	0,00079
Genre <i>Prevotella</i>	-1,16	0,05562	-0,68	0,07092
<i>Streptococcus anginosus</i>	-0,91	0,39519	-0,28	0,70527
Genre <i>Bacteroidales</i>	-0,67	0,41642	-0,28	0,53042
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	-0,64	0,16546	-0,86	<0,00001
Genre <i>Megasphaera</i>	-0,37	0,47090	-0,70	0,00121
<i>Mycoplasma hominis</i>	-0,24	0,74975	-0,42	0,42544
Genre <i>Peptoniphilus</i>	0,12	0,85728	0,44	0,43758
<i>Sneathia sanguinegens</i>	0,42	0,45669	-0,33	0,33626
Phylum <i>Proteobacteria</i>	0,56	0,50600	0,12	0,80731
<i>Anaerococcus prevotii</i>	0,58	0,25405	0,96	0,00909
<i>Fingoldia magna</i>	0,62	0,05782	0,79	0,00079
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	0,67	0,28788	0,48	0,23603
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	0,85	0,23831	0,78	0,16066
BVAB2	1,04	0,04997	0,42	0,15034
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	1,20	0,00861	1,11	0,00019
<i>Gardnerella vaginalis</i>	1,25	0,00113	0,88	<0,00001
BVAB1	1,32	0,16077	0,14	0,73094
<i>Aerococcus christensenii</i>	1,53	0,00176	0,76	0,00851
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	1,79	0,00335	1,10	<0,00001
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	1,81	0,00335	1,15	0,00038
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	1,84	0,00335	1,33	0,00079
<i>Atopobium vaginae</i>	1,95	<0,00001	1,08	<0,00001
<i>Gemella haemolysans/ascacharolytica</i>	2,07	<0,00001	1,14	<0,00001
<i>Mobiluncus curtisii</i>	2,34	0,00531	1,83	0,00332
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2,54	0,00402	2,00	0,00187

\*Les valeurs négatives de log2 Fold Change indiquent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons VM400 et les valeurs positives ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs).

\*\*La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

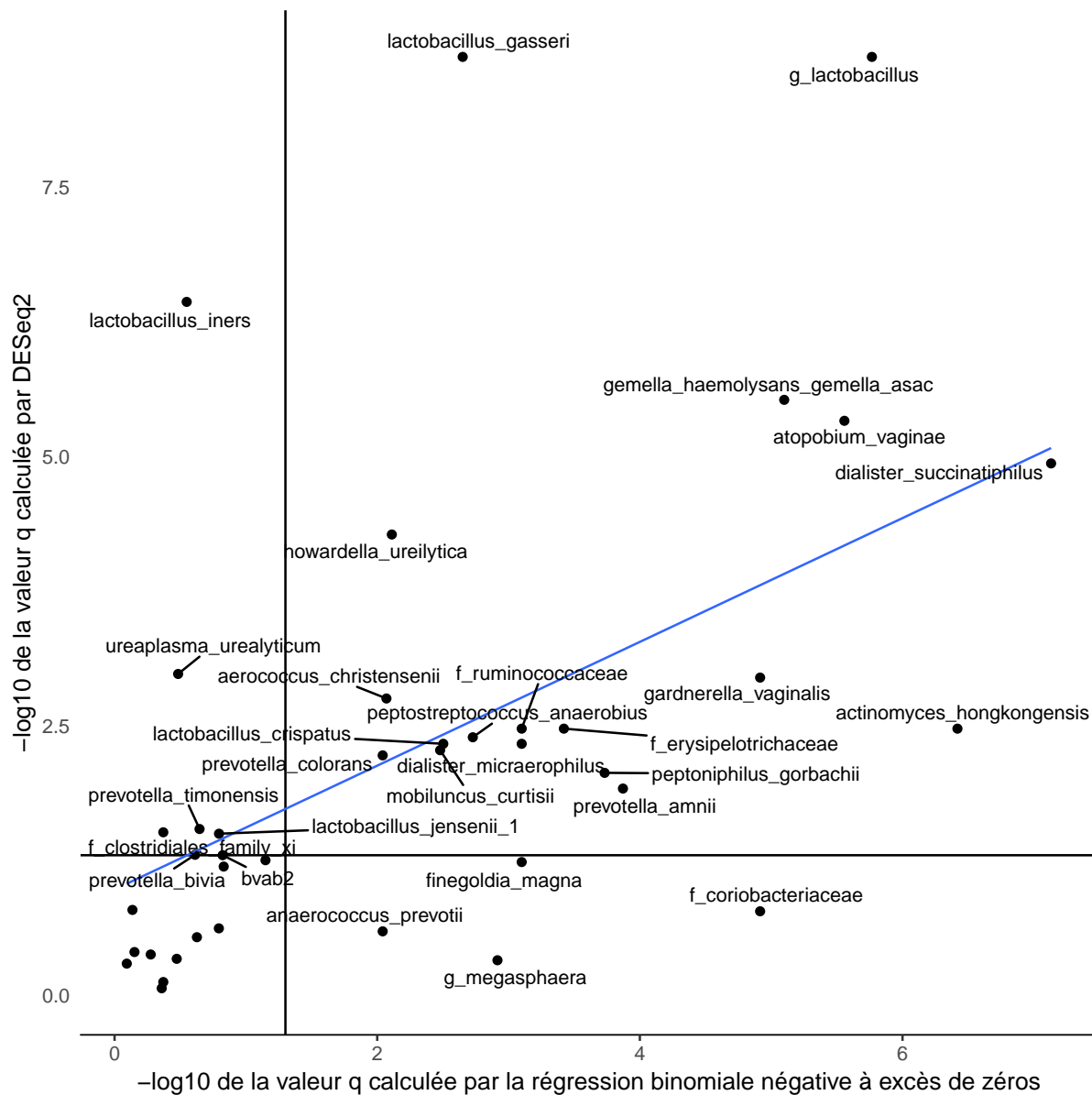


FIGURE 13.5 – Evaluation de la corrélation des q-values des méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 141 échantillons CHARM Visite 1 et 99 échantillons contrôles VM400.

La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.



## Chapitre

# 14

## Discussion

### 14.1 Rappel des résultats

Dans l'étude française, du fait de l'inclusion de toutes les femmes se présentant sur une période donnée sans tenir compte du résultat au diagnostic de CT, nous avons pu évaluer la positivité à l'infection et décrire les facteurs associés à cette positivité à CT. Celle-ci était élevée dans notre population d'étude avec 15,9% des femmes se présentant en CDAG positives. Cette proportion élevée de femmes CT-positives dans notre étude est probablement due au fait que les participantes représentent un groupe de femmes relativement à risque, comparées à la population générale. Cette proportion est bien plus élevée que la dernière estimation en France, dans une étude en ligne en 2012 où 8,3% des femmes âgées de 18 à 24 ans de la population générale avaient un test positif pour CT [136, 137].

Dans l'étude française toujours, toutes les femmes infectées par CT étaient âgées de 18 à 24 ans, ce qui correspond au groupe d'âge le plus affecté par l'infection [7, 8]. Étonnamment, la positivité à CT était plus élevée chez les femmes qui consultaient avant un arrêt de l'utilisation du préservatif que chez les femmes consultant pour des relations sexuelles à risque. Il se peut que ce résultat soit lié au faible nombre d'observations, mais nous ne pouvons exclure l'hypothèse que, cette donnée étant déclarée par la participante, il existe un décalage entre les pratiques réellement à risque et la perception de ce risque, comme mis en évidence dans une étude aux Pays-Bas [138]. La positivité à CT était élevée chez les femmes se présentant pour des symptômes (2 sur 7, soit 28,6%), mais comme attendu, la plupart des infections par CT étaient asymptomatiques [125]. Comme les symptômes génitaux ne sont pas nécessairement spécifiques, des symptômes chez des femmes sans infection par CT pourraient être dus à une VB, une vaginite ou d'autres IST.

Dans cette étude, le microbiote vaginal de jeunes femmes a été caractérisé par des méthodes indépendantes de la culture cellulaire pour la première fois en France. Cinq CST ont pu être décrits chez ces 132 femmes se présentant en CDAG en France, avec les trois CST principaux

se divisant en deux sous-groupes chacun selon la diversité des communautés bactériennes. Les proportions des cinq CST chez les femmes CT-négatives étaient de 40,5%, 0,9%, 36,0%, 21,6% et 0,9% respectivement. Dans une précédente étude de Ravel et al. dont nous avons tiré notre population contrôle CT-négative pour les analyses de l'étude CHARM, les proportions des cinq CST pour l'ensemble des femmes, toutes origines confondues, étaient de 26,2%, 6,3%, 34,1%, 27,4% et 5,3% [42]. De la même manière que pour les femmes CT-négatives de notre étude, les CST I, III et IV étaient les types de microbiote vaginal les plus prévalents dans notre population bien que notre étude montre une proportion plus importante de CST I chez les femmes non-infectées. Cette importance du CST I chez les femmes non-infectées pourrait s'expliquer par une protection augmentée vis-à-vis des IST par une communauté bactérienne dominée par *L. crispatus*, tel que soutenu par van der Veer et al. [104]. Dans leur étude qui concerne une population à risque d'IST aux Pays-Bas, les proportions de CST I, III et IV chez les femmes CT-négatives étaient de 39,0%, 26,8% et 34,2% respectivement. Le CST IV était plus représenté chez les femmes CT-négatives que dans notre étude. Parmi les femmes CT-positives, la distribution des CST dans notre étude était légèrement similaire à celle trouvée par van der Veer et al., excepté pour le CST IV. Ce CST représentait 48,1% des femmes CT-positives tandis que dans notre étude il ne représentait que 23,8% des femmes. Alors que l'étude par van der Veer et al. émet l'hypothèse d'un rôle délétère du CST IV, nos résultats chez des femmes en France indiqueraient plutôt que le CST III pourrait accroître le risque d'infection par CT. Dans notre étude en France, aucune conclusion ou hypothèse claire ne peut être tirée d'une quelconque association entre CST II ou CST V et le statut CT du fait que ces CST sont sous-représentés dans la population. En définitive, les CST n'étaient pas significativement associés au statut CT mais des proportions plus importantes de femmes CT-positives étaient retrouvées dans les CST III et CST IV comparés au CST I.

En évaluant la composition et la structure du microbiote vaginal au moment de l'infection par *C. trachomatis*, l'étude CHARM aux Etats-Unis a permis d'identifier des microbiotes vaginaux associés à l'infection par *C. trachomatis* en utilisant une population contrôle non-infectée issue du même centre [42], comme précédemment expliqué. Nous avons également montré que les CST III et CST IV étaient significativement associés à l'infection prévalente par *C. trachomatis*.

Au niveau des phylotypes, les résultats de l'étude française et de l'étude américaine n'étaient pas parfaitement concordants. Le microbiote vaginal des femmes infectées par CT dans CHARM comprend des taxons bactériens communément associés à la VB ou au CST IV, notamment *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* ou *Mobiluncus curtisii* [40]. Certains taxons comme *Gemella* étaient retrouvés comme associés à l'infection par CT dans les deux études, et le genre *Lactobacillus* dans son ensemble était protecteur de l'infection dans les deux études également. En revanche, dans l'étude française nous avons noté une sur-représentation d'autres bactéries anaérobies comme *Megasphaera* ou *Eggerthella* chez les femmes CT-positives, également associées à la VB [40].

Il est intéressant de noter que malgré l'association entre CST III et infection par *C. trachomatis* dans l'étude CHARM, *L. iners* n'était pas sur-représenté dans les échantillons CT-positifs CHARM de la visite 1 comparés aux contrôles VM400. Nous faisons l'hypothèse que malgré le fait qu'une plus grande proportion des échantillons CT-positifs de la visite 1 contienne des *L. iners*, cela ne veut pas dire que la moyenne des abondances relatives de *L. iners* ou leur distribution entre échantillons CT-positifs et CT-négatifs soient différentes. Cette incohérence apparente appuie l'importance de mener des analyses à la fois au niveau des phylotypes et au

niveau des CST lors de l'étude de l'association entre microbiote vaginal et IST.

## 14.2 Mise en perspective avec la littérature

Dans l'ensemble, les données des deux études indiqueraient un rôle protecteur du CST I, dominé par *L. crispatus*, et un risque augmenté pour l'infection par *C. trachomatis* chez les femmes présentant un CST III ou IV pouvant varier selon la population. Il serait possible de spéculer que ces types de microbiote sont associés à une augmentation de la susceptibilité, cependant, nous ne pouvons exclure que l'infection elle-même résulte en une modification du microbiote vaginal vers les CST III et CST IV. Dans la VB, la composition du microbiote vaginal est similaire à ce qui est trouvé dans un CST IV et inclut des taxons tels que *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Prevotella* spp., *Mobiluncus* spp. et *Mycoplasma hominis*, entre autres [40, 139, 140]. Les études épidémiologiques utilisant le score de Nugent ont montré qu'un score de Nugent élevé constituait un facteur de risque pour l'infection par *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, et le VIH [69, 70, 72, 81, 141]. Cependant, le motif observé dans cette étude n'éclaire pas la question de savoir si un changement de phylotypes ou de CST a lieu avant l'infection et donc prédisposerait à l'acquisition de cette infection, ou s'il a lieu en conséquence de l'infection. Des études longitudinales se focalisant sur les cas incidents d'infection par *C. trachomatis* devraient apporter une meilleure compréhension afin d'éclaircir le chemin causal. Une telle étude aux Pays-Bas a montré que les femmes présentant un CST dominé par *L. iners* (CST III) avaient un risque accru d'infection par CT comparées aux femmes présentant un CST dominé par *L. crispatus* (CST I) [142]. Bien que *L. iners* domine le CST III, cette espèce partage souvent la niche écologique vaginale avec d'autres espèces bactériennes telles que *G. vaginalis*, *A. vaginae* et d'autres anaérobies strictes et facultatives dont la présence pourrait limiter le bénéfice potentiel d'un microbiote vaginal dominé par des lactobacilles. Quand c'est le cas, il est suggéré que le CST III pourrait constituer une amorce de transition vers le CST IV. Cette transition du CST III au CST IV a souvent été observée dans des études longitudinales du microbiote vaginal [120, 143], en particulier après un traitement antibiotique pour la vaginose bactérienne [144], alors qu'il est justement bien établi que le CST IV est associé à un plus haut risque d'infection par *C. trachomatis* [82, 92].

## 14.3 Limites et orientations futures

Le schéma d'étude transversal de l'étude française constitue une limite de la présente étude. De plus, un schéma d'étude longitudinal permettrait de prendre en compte la structure dynamique du microbiote vaginal au cours du temps rapportée précédemment [120, 143, 145]. Dans l'étude américaine, la population de femmes contrôles CT-négatives étant issue d'une autre étude, nous ne pouvons exclure que les deux populations diffèrent par certaines caractéristiques sociodémographiques autres que l'origine ethnique, bien que les deux études étaient menées dans le même centre médical. Enfin, l'analyse du microbiote vaginal bénéficierait grandement d'informations additionnelles sur les pratiques sexuelles, l'hygiène personnelle, l'histoire gynécologique ou les traitements concomitants, en particulier l'usage de contraceptifs oraux, informations auxquelles nous n'avons pas accès dans ces études. Néanmoins, il s'agit d'une première étape nécessaire pour façonner de futures études longitudinales prospectives de plus grande ampleur. L'essai i-Predict [146], visant à évaluer si le dépistage systématique

de l'infection par *C. trachomatis* permet de prévenir les IGH, abordera le rôle du microbiote vaginal de femmes en France sur l'infection par *C. trachomatis*, et contribuera à une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de l'infection par *C. trachomatis*. En outre, il permettra de générer des hypothèses sur le rôle du microbiote vaginal vis-à-vis de la susceptibilité aux IST.







# *III*

---

**Impact sur le microbiote vaginal de la  
clairance et du traitement antibiotique  
de *Chlamydia trachomatis***

---



## Chapitre

# 15

## Introduction

### 15.1 Clairance de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Dans les deux parties précédentes, nous avons vu comment microbiote vaginal et infection par *C. trachomatis* étaient associés, sans pouvoir déterminer si le microbiote vaginal était un facteur de risque de l'infection ou si l'infection elle-même modifiait le microbiote vaginal. L'étude de la dynamique du microbiote vaginal post-infection en l'absence de traitement antibiotique (clairance naturelle de l'infection) permet de répondre en partie à cette question mais est difficilement observable pour des raisons éthiques. Le bras « Témoin » de l'étude i-Predict a pour objectif secondaire de rendre possible l'identification des cas de clairance naturelle de l'infection [146]. En présence d'un traitement antibiotique, l'étude de la dynamique du microbiote vaginal permet d'évaluer l'effet de ce facteur externe sur le microbiote vaginal.

### 15.2 Facteurs associés à la dynamique du microbiote vaginal

La communauté microbienne vaginale représente la première ligne de défense contre les IST telles que l'infection par *C. trachomatis*, et les espèces de *Lactobacillus* sont considérées comme la clé de voûte de la santé vaginale, principalement pour leur capacité à produire de l'acide lactique et d'autres composés antimicrobiaux qui maintiennent un environnement acide protecteur [147]. Plusieurs travaux ont suggéré que les différents types de microbiote vaginal répondaient différemment aux événements perturbateurs tels que les menstruations ou la prise de médicament [42, 120, 143, 144, 148], et présentent des résiliences communautaires différentes, la résilience étant la capacité à faire face à des perturbations et à se réorganiser elles-mêmes sans basculer dans la dysbiose [149]. La VB considérée comme une dysbiose est couramment traitée en clinique par du métronidazole. Une étude sur le traitement de la VB par métronidazole a montré que *L. iners* augmentait après traitement, en remplacement ou

aux côtés de *G. vaginalis* [144].

### 15.3 Traitement antibiotique de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Par ailleurs des controverses ont émergé sur l'utilisation des antibiotiques dans le traitement de l'infection par *C. trachomatis*. Si le traitement par azithromycine en une fois est effectivement très efficace (environ 95%) [31, 150], certains auteurs ont avancé l'hypothèse que le traitement par doxycycline pendant une semaine permettait d'éviter plus d'échecs de traitement du fait de la durée de celui-ci [151]. Par ailleurs, la clairance naturelle de *C. trachomatis* peut atteindre la moitié des cas d'infection au bout de 12 mois [13] et pose la question du sur-traitement de ces infections. En effet, certains auteurs évoquent l'hypothèse de l'immunité arrêtée (*arrested immunity*), un mécanisme selon lequel l'organisme infecté par *C. trachomatis* ne peut développer une immunité réellement protectrice vis-à-vis de l'infection si un traitement est administré trop tôt, ce qui aurait des implications importantes pour les individus exposés de nouveau par la suite [152]. La réinfection par *C. trachomatis* est courante, atteignant 20 à 30% en un an, avec un délai avant réinfection de 4 à 5 mois [13]. Les personnes ayant eu une clairance naturelle de l'infection seraient moins susceptibles vis-à-vis des réinfections que les personnes présentant une infection persistante et ayant été traitées par antibiotiques [16], sans que ne soit élucidée la ou les causes de cette différence (génétique, immunité, microbiote vaginal). Nous faisons l'hypothèse que l'infection par *C. trachomatis* suivie d'un traitement antibiotique ont un impact majeur sur la résilience communautaire, et pourraient expliquer en partie les taux élevés de réinfection.

### 15.4 Objectif

Ici, nous étudions la composition et la structure du microbiote vaginal d'une cohorte de 149 femmes atteintes par l'infection à *C. trachomatis* suivies trimestriellement pendant 9 mois. Notre objectif était d'évaluer l'évolution des communautés vaginales après l'infection par *C. trachomatis* et un traitement antibiotique, et ainsi esquisser une réponse sur l'impact d'un traitement antibiotique et/ou de l'infection sur le microbiote vaginal (figure 15.1).

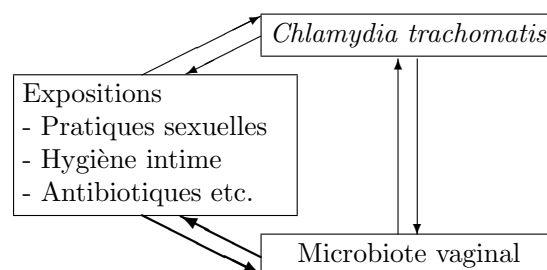


FIGURE 15.1 – Représentation schématisée des associations entre expositions, infection par *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal.

## Chapitre

# 16

## Méthodes et données

La cohorte CHARM a été décrite précédemment dans la partie II, chapitre 12 page 73.

### 16.1 Rappel sur le schéma d'étude

Des adolescents et jeunes adultes positifs pour l'infection par *C. trachomatis* étaient recrutés dans des centres de soins cliniques. Les patientes incluses dans la présente analyse étaient des femmes de 12 à 40 ans, sexuellement actives et CT-positives. La cohorte CHARM est décrite en détail ici [133]. De plus, 99 femmes africaines-américaines CT-négative, âgées de 19 à 44 ans, incluses dans l'étude transversale Vaginal Microbiota 400 Woman Study (VM400) de l'Université du Maryland, et recrutées dans les mêmes centres de soins cliniques, ont servi de population contrôle.

À la visite d'inclusion dans CHARM, un questionnaire était auto-administré et des cliniciens réalisaient un examen physique, une collecte d'échantillons, et fournissaient un traitement pour l'infection à *C. trachomatis* par azithromycine 1 g *per os* en dose unique. À chacune des trois visites trimestrielles supplémentaires, les examens cliniques et les questionnaires étaient répétés et un dépistage CT était réalisé suivi d'un traitement par azithromycine lorsque nécessaire. Les échantillons par écouvillonnage vaginal étaient collectés avant traitement par antibiotique sur les parois vaginales à mi-hauteur et préservés dans 1 ml de liquide Copan du système de collecte et de transport Amies Elution Swab (ESwab, Copan Diagnostics Inc.), et conservés à -80 °C. La positivité à CT était déterminée par test d'amplification de l'acide nucléique (NAAT) sur prélèvements urinaires (BD Prove Tech).

## 16.2 Rappel sur la préparation des échantillons, l'amplification génique de l'ARNr 16S et le séquençage

L'extraction de l'ADN génomique total était réalisée tel que décrit dans Ravel et al. [42]. L'amplification et le séquençage à haut débit des régions hypervariables V3-V4 du gène de l'ARNr 16S et le processus bioinformatique ont été mises en oeuvre tel que décrit dans Fadrosch et al. [128] et dans Holm et al. [135], respectivement.

La taxonomie a été assignée à chaque variant de séquence d'amplicon grâce à SpeciateIT (version 1.0), un classifieur rapide de séquences (<http://ravel-lab.org/speciateit>). Les séquences assignées à la même taxonomie ont été additionnées pour chaque échantillon. Les analyses de données incluent le regroupement hiérarchique des profils communautaires basés sur une distance euclidienne et une liaison de Ward, et l'assignation à l'un des types d'état communautaire (CST) décrits précédemment [42, 120], mais aussi pour cette partie l'estimation de la diversité communautaire par l'utilisation de l'indice de diversité de Shannon [153].

## 16.3 Évaluation de la résistance aux antibiotiques

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de 32 souches bactériennes vaginales a été déterminée par microdilution en milieu liquide, en utilisant des dilutions d'azithromycine et de doxycycline allant de 0,016 à 256 µg/mL, selon un protocole précédemment publié [154].

## 16.4 Analyse statistique

Les analyses ont été effectuées sur les échantillons présentant un minimum de 1000 séquences et sur les phylotypes présents dans au moins deux échantillons. Afin de comparer la composition et la structure du microbiote vaginal au sein de différents groupes, nous avons conduit des analyses au niveau du phylotype et au niveau des CST. Au niveau du phylotype, nous avons appliqué des modèles de régression binomiale négative pour chaque phylotype présent dans au moins 20% des échantillons, dans le package *DESeq2* sur R [45]. Au niveau des CST, nous avons appliqué un modèle de régression logistique pour comparer les échantillons CHARM de la visite 2 (CT-négatifs) aux contrôles VM400. Nous avons effectué un modèle de régression logistique à effets mixtes pour comparer les échantillons CHARM de la visite 1 et de la visite 2 pour prendre en compte la corrélation intra-femme entre les échantillons, dans le package *lme4* sur R. Pour comparer les communautés microbiennes vaginales sur l'ensemble des visites et chez les contrôles VM400, nous avons utilisé l'indice de diversité de Shannon, prenant en compte à la fois le nombre de taxons différents et leurs quantités respectives. Les valeurs de l'indice de diversité de Shannon pour chaque visite CHARM ont été comparées deux-à-deux grâce au test des rangs signés de Wilcoxon pour les échantillons appariés, et avec les contrôles VM400 via des tests de Wilcoxon-Mann-Whitney. Pour toutes ces analyses, les échantillons CT-positifs des visites 2, 3 and 4 ont été exclus du fait de la difficulté de distinguer les réinfections des échecs au traitement.

## Chapitre

# 17

## Résultats

La description des premiers résultats sur les marqueurs "microbiotaux" de l'infection prévalente par *C. trachomatis* sont présentés dans la partie II, chapitre 13 page 75.

### 17.1 Empreinte de l'infection par *Chlamydia trachomatis* et du traitement azithromycine sur le microbiote vaginal

Toutes les femmes de l'étude CHARM ont reçu un traitement antibiotique par azithromycine après avoir été diagnostiquée pour l'infection à *C. trachomatis* à l'inclusion. Bien que 18% des femmes pour lesquelles un échantillon à la visite 2 était disponible se trouvaient positives pour l'infection (soit du fait d'un échec au traitement, d'une réinfection avec le même partenaire non traité, ou d'une réinfection avec un autre partenaire), la majorité des échantillons de la visite 2 étaient CT-négatifs.

#### 17.1.1 Comparaison du microbiote vaginal à la visite 2 et chez les contrôles

**Niveau CST** La fréquence de chaque CST à la visite 2 chez des femmes CT-négatives (N=74) a été comparée à celle de la cohorte VM400 (clairance de l'infection versus non-infection) par un modèle de régression logistique avec l'hypothèse sous-jacente que les communautés vaginales soient similaires dans les deux groupes. Il apparaît que les CST III-A, III-B, IV-A et IV-B étaient tous à nouveau sur-représentés dans les échantillons CHARM CT-négatifs comparés aux contrôles VM400 (OR 5,89 [1,91-21,01], 3,81 [1,16-14,13], 3,47 [1,23-11,47] et 9,88 [3,09-36,88]; p-values 0,003, 0,033, 0,027 et <0,001) (tableau 17.1 et figure 17.1).



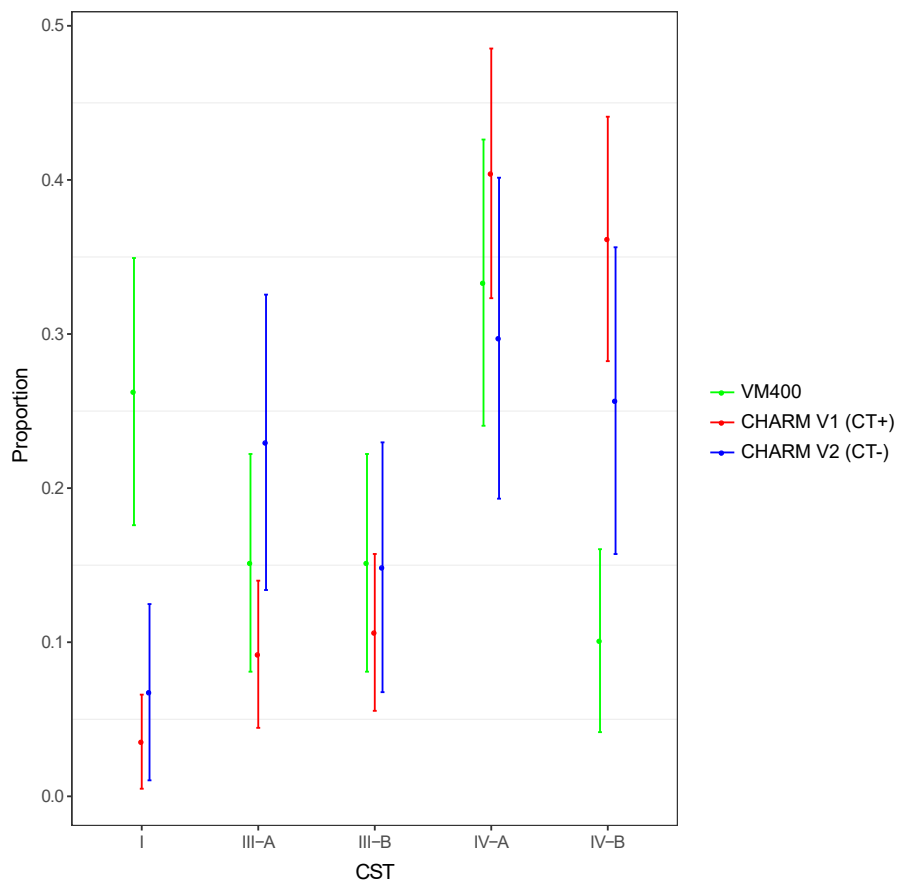


FIGURE 17.1 – Proportions des types d'états communautaires (CST) dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), Visite 2 (CT-négatifs, 3 mois après le traitement), et dans les échantillons contrôles VM400.

TABLE 17.1 – Résultats d'un modèle de régression logistique comparant 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) à 99 échantillons VM400 contrôles en termes de CST.

CST	OR	2,5%	97,5%	P-value
I	1	-	-	-
III-A	5,89	1,91	21,01	0,00328
III-B	3,81	1,16	14,13	0,03343
IV-A	3,47	1,23	11,47	0,02657
IV-B	9,88	3,09	26,88	0,00025

La catégorie de référence est le CST I (dominé par *Lactobacillus crispatus*).

**Niveau phylotype** En termes de phylotypes, parmi les 49 phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons CHARM visite 2 et VM400 (173 observations), 24 étaient significativement exprimés de manière différentielle, avec 6 phylotypes qui étaient sur-représentés dans les échantillons CHARM CT-négatifs comparés aux VM400, dont *A. vaginae*, *Gemella haemolysans* ou *Peptoniphilus gorbachii*. Cependant, *G. vaginalis*, BVAB1, BVAB2 et *L. iners* notamment n'étaient pas statistiquement significatifs malgré le fait que ces espèces étaient

légèrement sur-représentées dans les échantillons CHARM CT-négatifs (tableau 17.2 et figure 17.2).

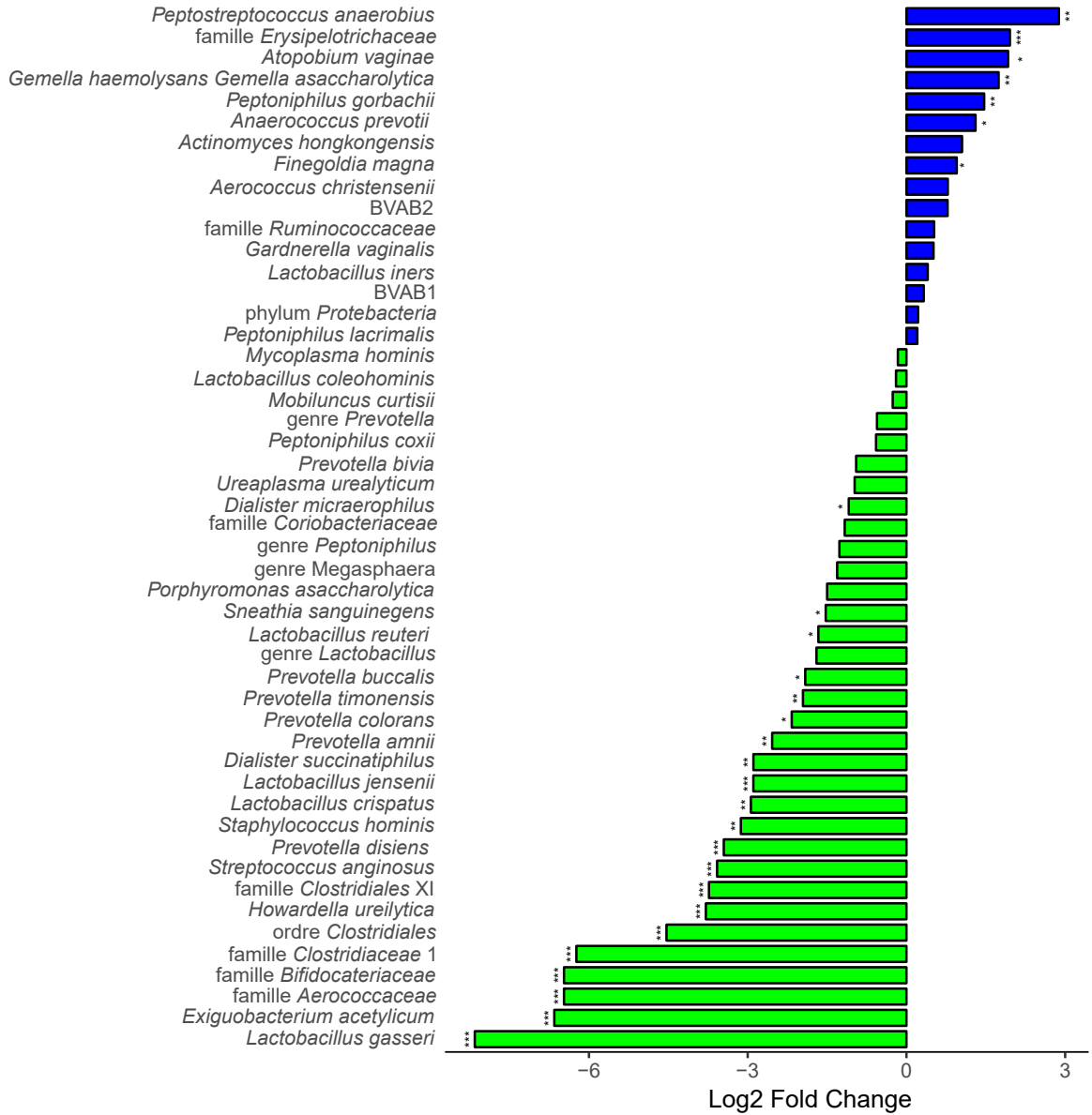


FIGURE 17.2 – Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative implémenté dans le package *DESeq2* sur R, au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 99 échantillons contrôles VM400, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Les barres vertes représentent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons contrôles VM400 et les barres bleues ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs). L'axe des abscisses représente le log2 de la différence. La significativité de la q-valeur (p-valeur corrigée par la correction de Benjamini-Hochberg) est indiquée par une (<0,05), deux (<0,01) ou trois étoiles (<0,001).

TABLE 17.2 – Espèces différentiellement exprimées selon un modèle de régression binomiale négative (package *DESeq2* sur R) au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 99 échantillons VM400 contrôles, pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Phylotypes	DESeq2		Régression binomiale négative à excès de 0	
	Log2 Fold Change*	q-value**	Beta	q-value**
<i>Lactobacillus gasseri</i>	-8,16	<0,00001	-1,80	0,00005
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	-6,66	<0,00001	-19,22	1,00000
Famille <i>Aerococcaceae</i>	-6,47	<0,00001	1,70	<0,00001
Famille <i>Bifidobacteriaceae</i>	-6,47	<0,00001	-20,01	1,00000
Famille <i>Clostridiaceae</i> 1	-6,23	<0,00001	-20,00	1,00000
Ordre <i>Clostridiales</i>	-4,54	<0,00001	-19,31	1,00000
Famille <i>Clostridiales</i> XI	-3,79	<0,00001	-0,89	0,00709
<i>Howardella ureilytica</i>	-3,73	0,00058	-0,80	0,02599
<i>Streptococcus anginosus</i>	-3,58	0,00328	-0,57	0,27087
<i>Staphylococcus hominis</i>	-3,45	0,00116	-0,80	0,02489
<i>Prevotella disiens</i>	-3,13	0,01082	-0,77	0,13117
<i>Dialister succinatiphilus</i>	-2,89	0,00002	-0,95	<0,00001
<i>Lactobacillus jensenii</i>	-2,89	0,01520	-0,13	0,84008
<i>Prevotella amnii</i>	-2,54	0,02141	-0,81	0,00143
<i>Prevotella colorans</i>	-2,17	0,02458	-0,28	0,56478
<i>Prevotella timonensis</i>	-1,96	0,01166	-0,33	0,33248
<i>Prevotella buccalis</i>	-1,91	0,05915	-0,54	0,19178
<i>Lactobacillus reuteri</i>	-1,70	0,20257	0,16	0,58670
Genre <i>Lactobacillus</i>	-1,66	0,08162	0,12	0,84008
<i>Sneathia sanguinegens</i>	-1,53	0,06794	-0,52	0,02599
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	-1,50	0,17705	-0,15	0,84008
Genre <i>Peptoniphilus</i>	-1,31	0,15402	-0,18	0,78027
Genre <i>Megasphaera</i>	-1,27	0,09538	-0,39	0,00709
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	-1,17	0,09463	-0,38	0,00328
<i>Dialister micraerophilus</i>	-1,09	0,04872	-0,30	0,02060
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-0,98	0,21319	-0,09	0,84008
<i>Prevotella bivia</i>	-0,95	0,33092	-0,14	0,84008
Genre <i>Prevotella</i>	-0,57	0,57607	-0,22	0,62758
<i>Peptoniphilus coxii</i>	-0,56	0,67039	0,41	0,43971
<i>Mobiluncus curtisii</i>	-0,26	0,80193	0,06	0,98498
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	-0,20	0,85600	0,24	0,27087
<i>Mycoplasma hominis</i>	-0,16	0,85600	-0,06	0,96237
<i>Lactobacillus iners</i>	0,21	0,76593	0,15	0,43299
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	0,22	0,80193	0,24	0,43957
Phylum <i>Proteobacteria</i>	0,33	0,80193	0,03	1,00000
BVAB1	0,40	0,80193	0,01	1,00000
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	0,51	0,65819	0,49	0,25680

(Suite)	DESeq2		Régression bino- miale négative à excès de 0	
Phylotypes	Log2 Fold Change*	q-value**	Beta	q-value**
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,52	0,33549	0,29	0,07984
BVAB2	0,78	0,36042	0,21	0,31944
<i>Aerococcus christensenii</i>	0,78	0,20339	0,28	0,15621
<i>Finegoldia magna</i>	0,95	0,05766	0,45	0,01310
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	1,05	0,21843	0,48	0,00040
<i>Anaerococcus prevotii</i>	1,31	0,04872	0,77	0,00143
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	1,47	0,01799	0,63	0,00210
<i>Gemella haemolysans/ asaccharolytica</i>	1,74	0,01344	0,64	0,00008
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	1,92	0,02959	0,62	0,00187
<i>Atopobium vaginae</i>	1,96	0,00328	0,58	0,00083
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	2,88	0,01284	1,07	0,01178

\*Les valeurs négatives de log2 Fold Change indiquent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons VM400 et les valeurs positives ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs).

\*\*La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

La concordance des méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative à excès de zéros est présentée dans la figure 17.3.

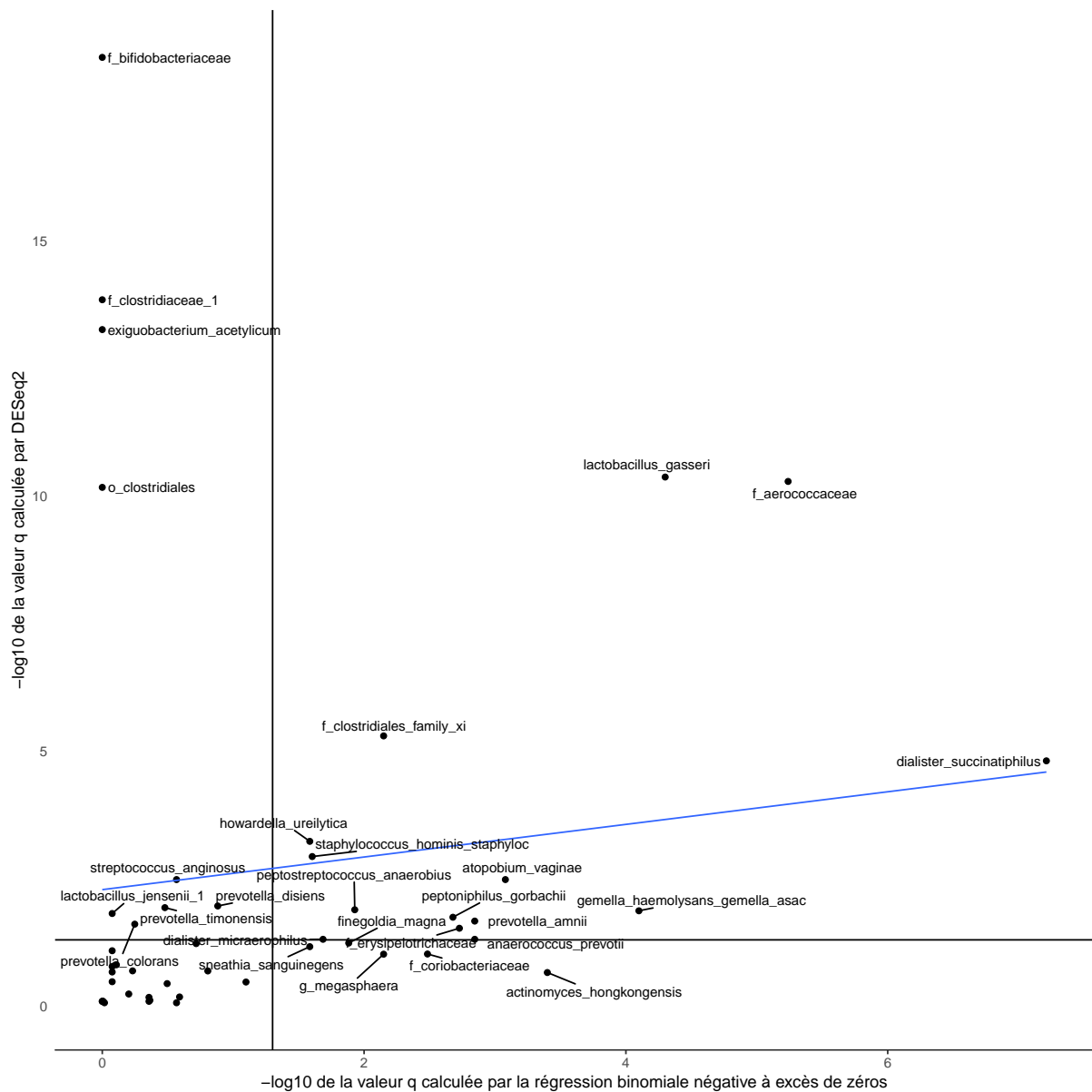


FIGURE 17.3 – Évaluation de la corrélation des q-values des méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 74 échantillons CHARM Visite 2 et 99 échantillons contrôles VM400.

La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

### 17.1.2 Comparaison du microbiote vaginal entre les visites 1 et 2

**Niveau CST** Par ailleurs, la fréquence des CST dans les échantillons CHARM CT-négatifs de la visite 2 a également été comparée à celle des échantillons de la visite 1 (CT-positifs) pour mettre en évidence les changements observés comme conséquence de la prise d'antibiotiques. Il en ressort que le CST III-A (dominé par *L. iners*) était sur-représenté dans les échantillons CT-négatifs de la visite 2 comparés aux échantillons CT-positifs de la visite 1 (log<sub>2</sub> Fold Change négatif), comme exposé dans la tableau 17.3 et la figure 17.1 (OR 3,51 [1,45-8,75] comparé au CST IV-B ; p-value 0,006).

TABLE 17.3 – Résultats d'un modèle de régression logistique à effets mixtes comparant 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) à 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) en termes de CST.

CST	OR	2,5%	97,5%	P-value
I	2,68	0,68	10,69	0,15077
III-A	3,51	1,45	8,75	0,00590
III-B	1,97	0,76	5,05	0,15775
IV-A	1,04	0,50	2,14	0,92336
IV-B	1	-	-	-

La catégorie de référence est le CST IV-B (groupe divers comportant une proportion élevée de *Gardnerella vaginalis*).

**Niveau phylotypes** De plus, parmi les 33 phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons CHARM des visites 1 et 2 (215 observations), seul *L. iners* apparaissait comme significativement sur-représenté dans les échantillons CT-négatifs de la visite 2 comparés aux échantillons CT-positifs de la visite 1, après correction pour tests multiples (figure 17.7a, tableau 17.4 et figure 17.4).

TABLE 17.4 – Espèces différentiellement exprimées selon un modèle de régression binomiale négative (package *DESeq2* sur R) au sein de 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Phylotypes	DESeq2		Régression binomiale négative à excès de 0	
	Log2 Fold Change*	q-value**	Beta	q-value**
<i>Lactobacillus crispatus</i>	-1,64	0,53208	-0,44	0,86467
<i>Lactobacillus iners</i>	-1,49	0,00986	-0,60	0,19036
<i>Anaerococcus prevotii</i>	-0,73	0,53208	-0,65	0,55590
<i>Prevotella bivia</i>	-0,36	0,93214	-0,46	0,86467
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-0,31	0,93214	-0,29	0,86467
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	-0,30	0,93214	-0,15	0,86467
<i>Fingoldia magna</i>	-0,30	0,87033	-0,24	0,86467
<i>Mycoplasma hominis</i>	-0,11	0,93214	-0,32	0,86467
Genre <i>Prevotella</i>	-0,10	0,93214	-0,40	0,79406
<i>Dialister microaerophilus</i>	-0,10	0,93214	-0,10	0,86467
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	-0,10	0,93214	0,16	0,86467
<i>Prevotella colorans</i>	0,03	0,97156	-0,62	0,84325
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	0,04	0,97156	-0,25	0,86467
<i>Atopobium vaginae</i>	0,09	0,93214	-0,09	0,86467
BVAB2	0,13	0,93214	-0,02	0,92721
<i>Gemella haemolysans/ asaccharolytica</i>	0,15	0,93214	-0,11	0,86467
Phylum <i>Proteobacteria</i>	0,26	0,93214	-0,15	0,86467
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	0,28	0,93214	-0,04	0,92721
<i>Howardella ureilytica</i>	0,34	0,93214	-0,10	0,86467
<i>Prevotella timonensis</i>	0,40	0,93214	0,07	0,92721
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	0,51	0,53208	-0,10	0,86467
<i>Dialister succinatiphilus</i>	0,60	0,53208	0,37	0,79406
<i>Aerococcus christensenii</i>	0,63	0,53208	0,21	0,86467
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	0,75	0,53208	0,14	0,86467
<i>Gardnerella vaginalis</i>	0,84	0,16301	0,29	0,57261
Genre <i>Megasphaera</i>	0,86	0,43844	0,08	0,86467
<i>Prevotella amnii</i>	0,95	0,53208	0,37	0,86467
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	1,08	0,50964	0,62	0,79406
<i>Lactobacillus jensenii</i>	1,09	0,73773	-0,80	0,84325
BVAB1	1,18	0,53	0,12	0,86467
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	1,34	0,43844	0,91	0,55590
<i>Sneathia sanguinegens</i>	1,97	0,00475	0,72	0,19036
<i>Mobiluncus curtisii</i>	2,38	0,08259	1,74	0,19036

\*Les valeurs négatives de log2 Fold Change indiquent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs) et les valeurs positives ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs).

\*\*La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

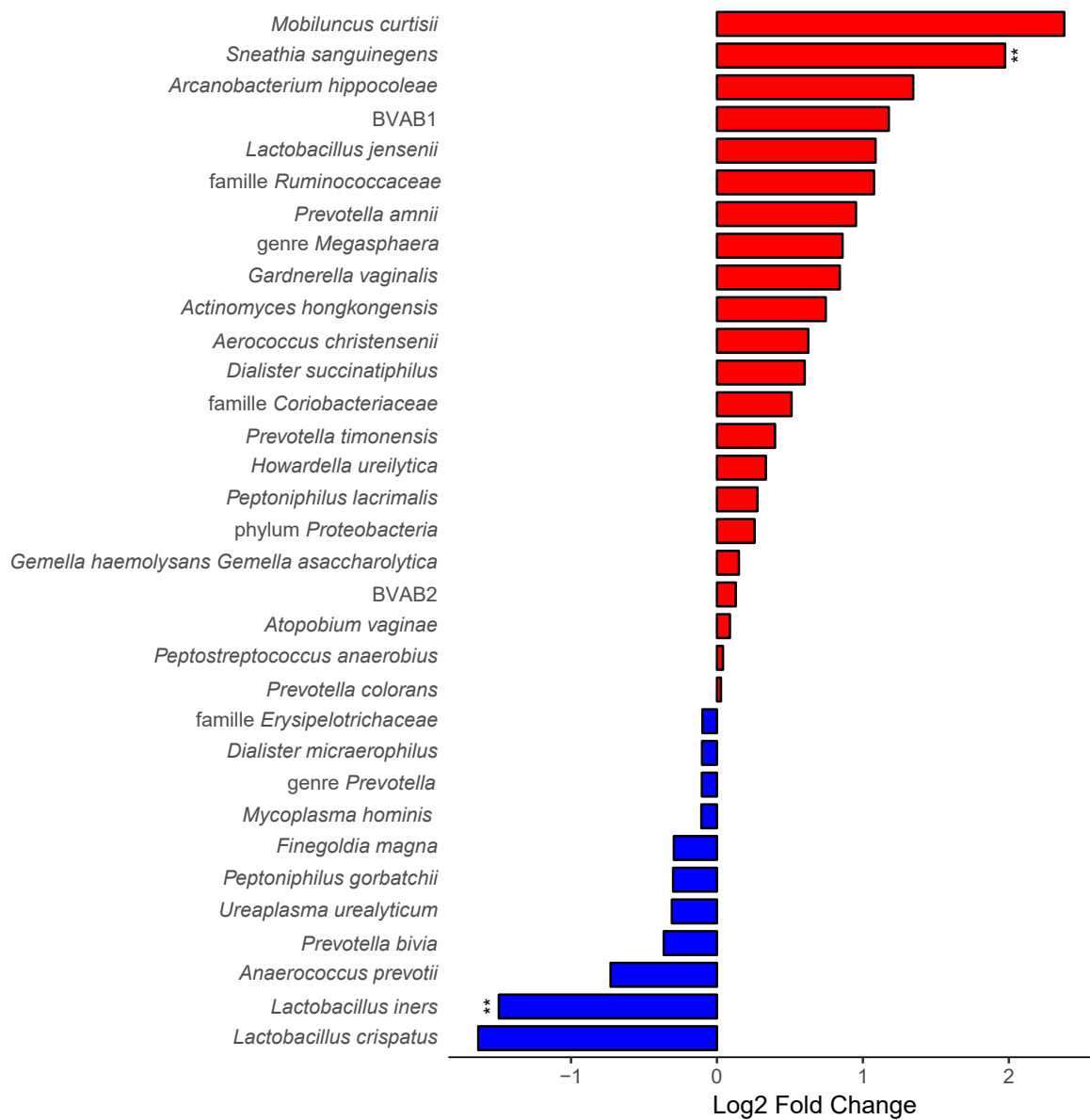


FIGURE 17.4 – Différence d'abondance relative des phylotypes vaginaux d'après un modèle de régression binomiale négative implémenté dans le package *DESeq2* sur R, au sein de 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs), pour les phylotypes présents dans au moins 20% des échantillons.

Les barres rouges représentent les phylotypes sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et les barres bleues ceux sur-représentés dans les échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs). L'axe des abscisses représente le log2 de la différence. La significativité de la q-value (p-value corrigée par la correction de Benjamini-Hochberg) est indiquée par une (<0,05), deux (<0,01) ou trois étoiles (<0,001).



La concordance des méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative à excès de zéros est présentée dans la figure 17.5.

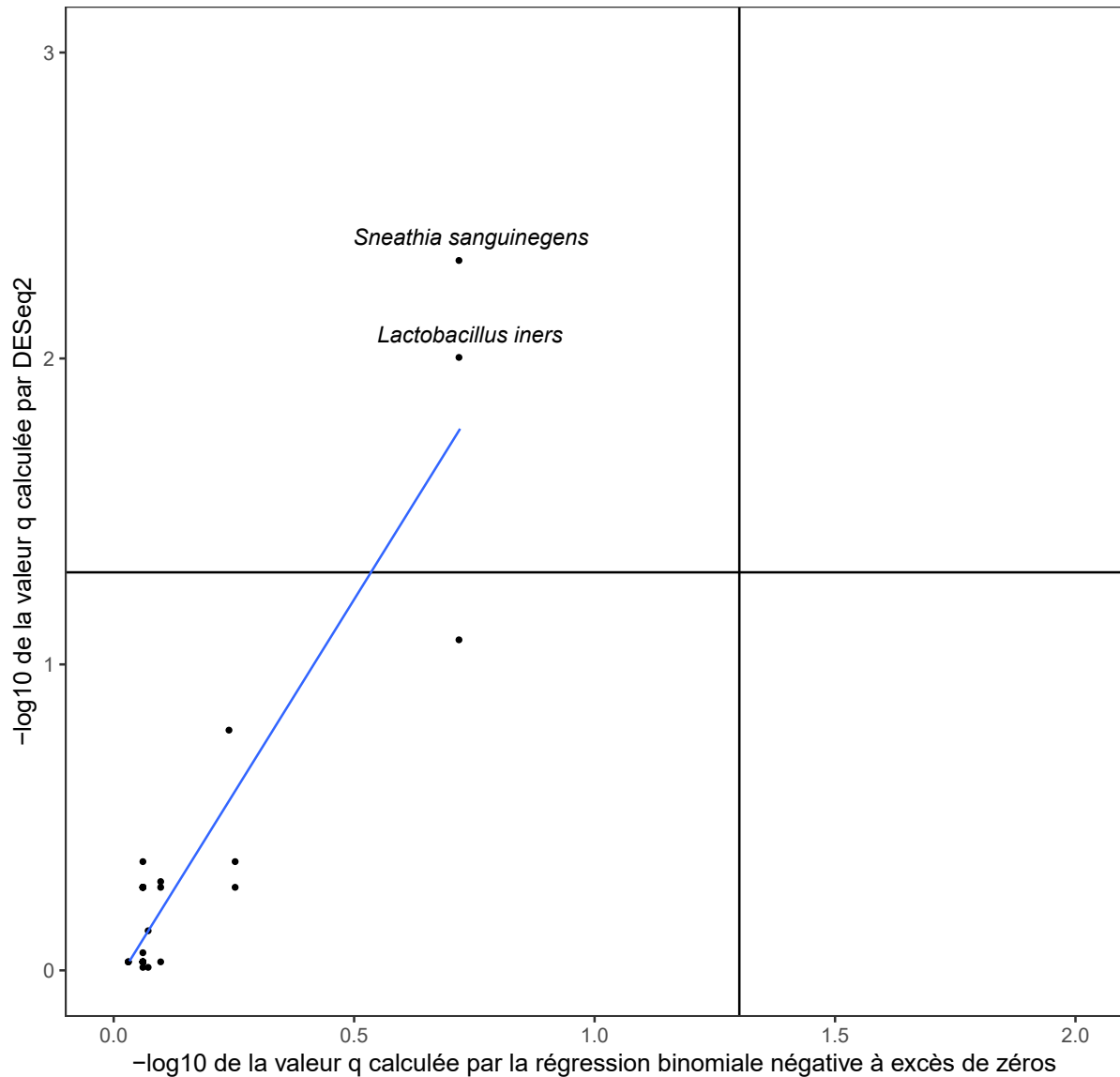


FIGURE 17.5 – Evaluation de la corrélation des q-values des méthodes *DESeq2* et régression binomiale négative à excès de zéros, pour la comparaison des phylotypes présents dans 141 échantillons CHARM Visite 1 et 74 échantillons CHARM Visite 2.

La q-value est la p-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

## 17.2 Durée de l'effet de l'infection par *Chlamydia trachomatis* et du traitement azithromycine sur le microbiote vaginal

Afin d'évaluer si l'infection par *C. trachomatis* et le traitement antibiotique affectent durablement la composition du microbiote vaginal, cette composition a été examinée dans les échantillons collectés lors de la visite 3 et de la visite 4, soit 6 mois et 9 mois après le traitement, parmi les échantillons CT-négatifs (N=73 et N=63 respectivement, après exclusion des cas de réinfection). Bien qu'un changement majeur en termes de CST soit observé entre la visite 1 et la visite 2 (probablement dû à l'infection par CT et au traitement azithromycine comme suggéré précédemment), les proportions des CST III et IV étaient stables entre la visite 2 et la visite 4, soit tandis que les femmes restaient CT-négatives (figure 17.6).

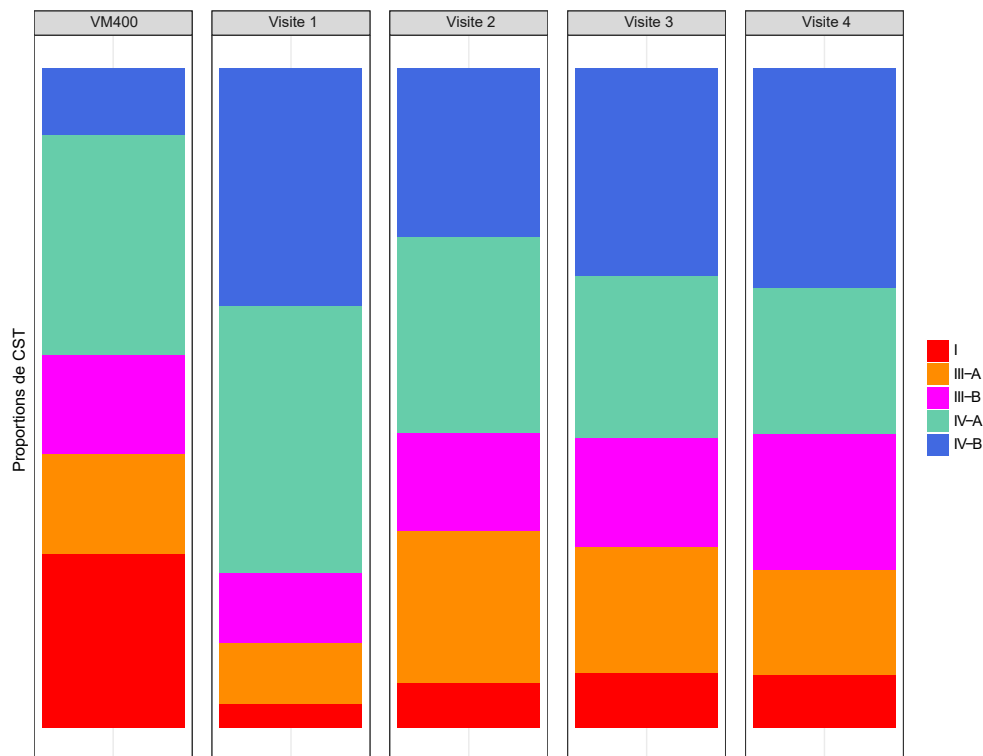


FIGURE 17.6 – Proportions des types d'état communautaire dans les échantillons contrôles VM400 et les échantillons de l'étude CHARM Visite 1 (CT-positifs, pré-traitement), Visite 2 (CT-négatifs, 3 mois post-traitement), Visite 3 (6 mois post-traitement), et Visite 4 (9 mois post-traitement).

À noter que l'abondance relative de *L.iners* augmente fortement après la prise de traitement antibiotique (de la visite 1 à la visite 2, figure 17.7a) tandis que celle de *Sneathia sanguinegens* diminue, mais l'abondance relative d'aucun phylotype n'était significativement différente de la visite 2 à la visite 4 (figure 17.7b et figure 17.7c).

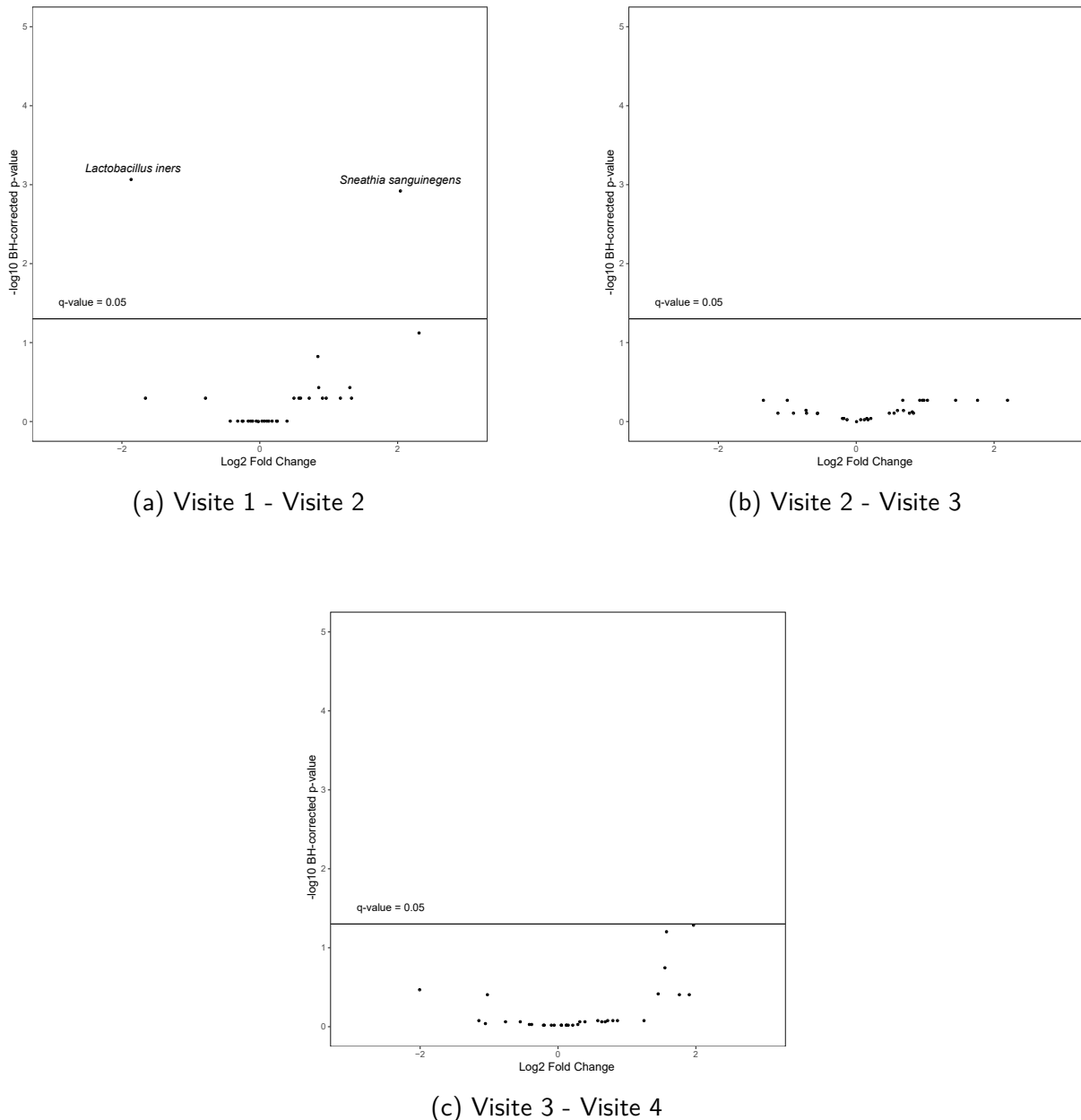


FIGURE 17.7 – Volcano plots des phylotypes différentiellement exprimés entre les échantillons CHARM (a) Visite 1 versus Visite 2, (b) Visite 2 versus Visite 3, (c) Visite 3 versus Visite 4.

L'indice de diversité de Shannon a été calculé pour chaque échantillon et la diversité de Shannon a été comparée entre les visites et les groupe contrôle VM400. L'indice de diversité de Shannon était significativement plus élevé dans les échantillons CHARM de la visite 1 comparé aux autres échantillons CHARM et aux contrôles VM400, et peu de différences étaient retrouvées entre les visites 2, 3 et 4 (figure 17.8, tableau 17.5 page 111 et figure 17.9 page 112).

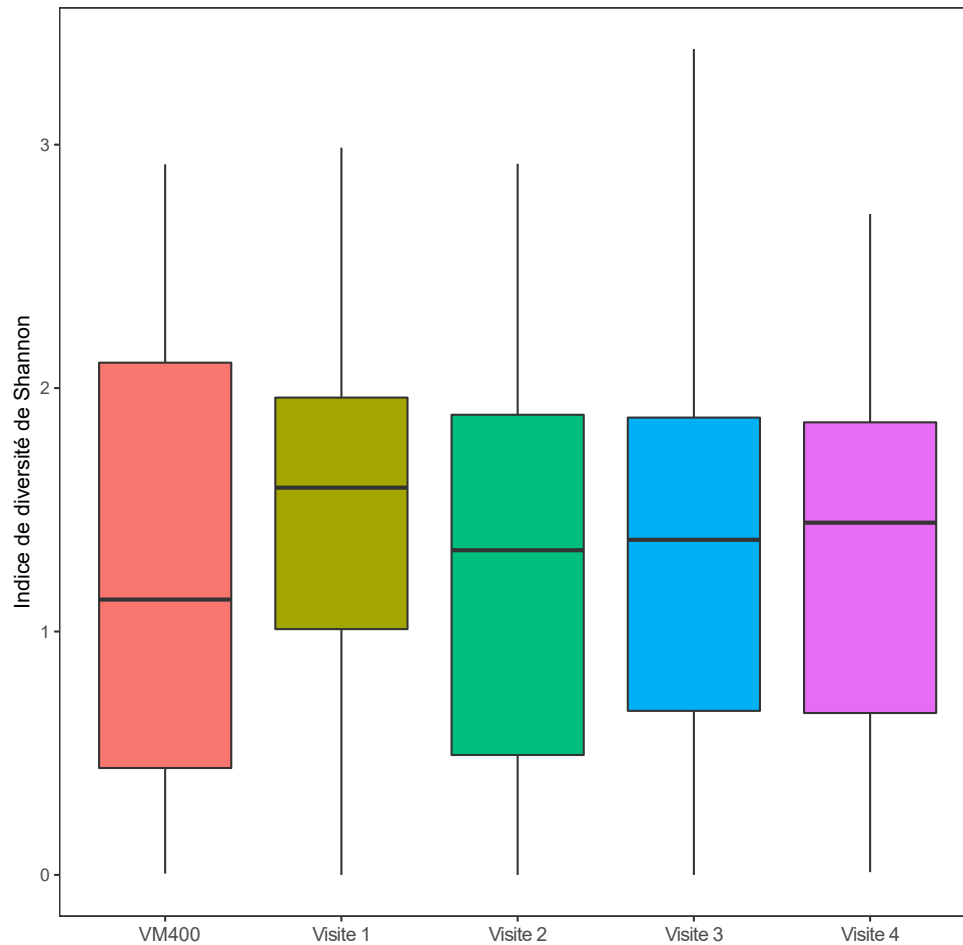


FIGURE 17.8 – Distribution de l'indice de diversité de Shannon dans les échantillons contrôles VM400 et les échantillons de l'étude CHARM Visite 1 (CT-positifs, pré-traitement), Visite 2 (CT-négatifs, 3 mois post-traitement), Visite 3 (6 mois post-traitement), et Visite 4 (9 mois post-traitement).

TABLE 17.5 – Tests de rangs signés de Wilcoxon pour des comparaison deux-à-deux des moyennes de l'indice de diversité de Shannon pour chaque visite de la cohorte CHARM et pour les contrôles VM400.

	VM400	Visite 1	Visite 2	Visite 3	Visite 4
VM400	1	0,033	0,843	0,896	0,658
Visite 1	0,033	1	0,017	0,055	0,141
Visite 2	0,843	0,017	1	0,089	0,068
Visite 3	0,896	0,055	0,089	1	0,911
Visite 4	0,658	0,141	0,068	0,911	1

L'indice de diversité de Shannon a été calculé via le package *vegan* sur R ([155]).

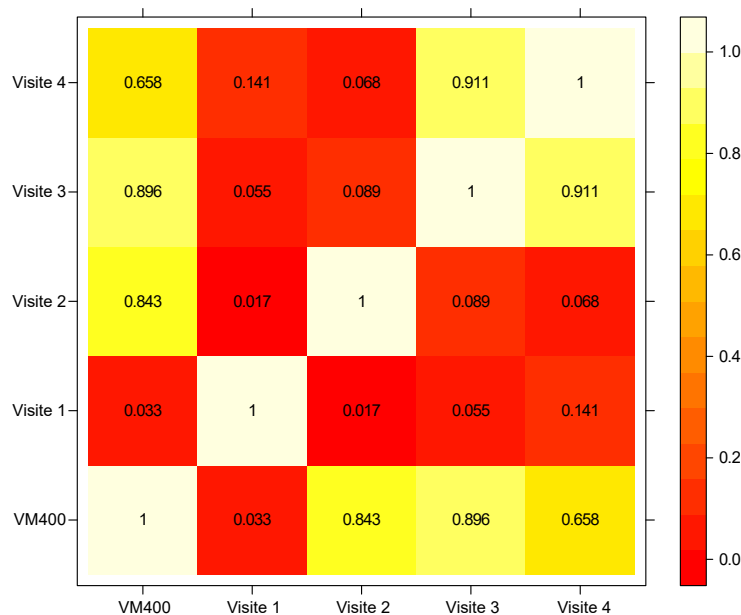


FIGURE 17.9 – Heatmap des p-values de comparaison deux-à-deux de la valeur moyenne de l'indice de diversité de Shannon dans les échantillons CHARM et les échantillons VM400, d'après les tests de Wilcoxon-Mann-Whitney et les tests de rangs signés de Wilcoxon. L'indice de diversité de Shannon a été calculé grâce au package *vegan* sur R.

### 17.3 Résistance à l'azithromycine de souches de *Lactobacillus iners* et *Gardnerella vaginalis*

Afin d'évaluer si les tendances observées précédemment étaient associées à la résistance aux antibiotiques des phylotypes associés aux CST IV (*G. vaginalis*) et CST III (*L. iners*), nous avons réalisé des tests de sensibilité microbienne de plusieurs souches à deux antibiotiques de première ligne pour le traitement de l'infection génitale à *C. trachomatis*, l'azithromycine et la doxycycline. Globalement, nos résultats indiquent des différences de sensibilité importantes parmi les souches bactériennes vaginales les plus courantes (figure 17.10, tableau C.5). Nous observons que de faibles concentrations d'azithromycine (0,096-1,5 µg/mL) éliminent *L. crispatus*, *L. jensenii*, et *L. gasseri*, tandis que certaines souches de *L. iners* (5/10) et de *G. vaginalis* (1/8) étaient résistantes à la plus haute concentration d'azithromycine testée (256 µg/mL). Par contraste, l'étendue de la sensibilité à la doxycycline apparaît similaire pour toutes les espèces vaginales inspectées (0,016-12 µg/mL) et aucune souche résistante à la doxycycline n'a été observée dans cette analyse.

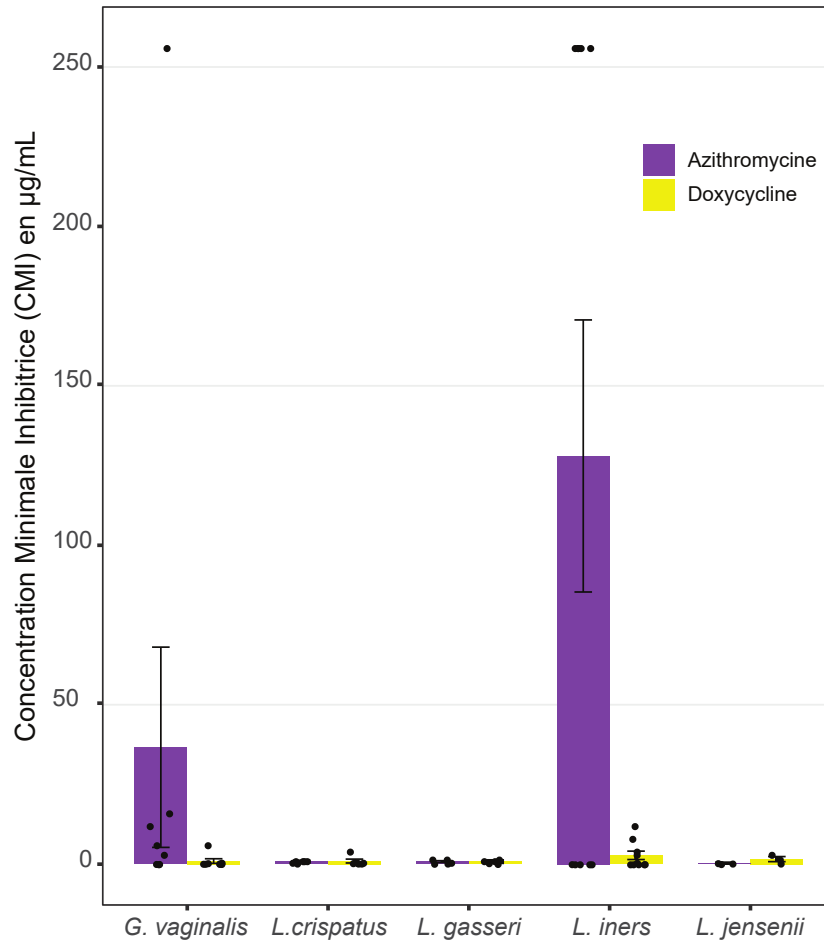


FIGURE 17.10 – Test de sensibilité antibactérienne sur des souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l’azithromycine et la doxycycline.

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée par un protocole de microdilution en milieu liquide [154] avec des concentrations allant de 0,016 à 256 µg/mL.

## 17.4 Transitions de CST entre visites selon le statut de l'infection par *Chlamydia trachomatis*

Pour chaque participante CHARM avec au moins un échantillon de suivi (N=100), nous avons généré des trajectoires de CST au cours de l'étude (figure 17.11). L'analyse des trajectoires individuelles des participantes au cours de l'étude confirme les résultats mentionnés précédemment sur le fait que les femmes passent fréquemment à un CST III-A dominé par *L. iners* après la prise d'azithromycine. Cependant, sur la durée, les femmes qui étaient CST IV-A ou IV-B avant traitement et étaient devenues CST III à la visite 2 reviennent à un CST IV ou un CST III-B, lesquels contiennent des niveaux importants de bactéries anaérobies strictes et facultatives.

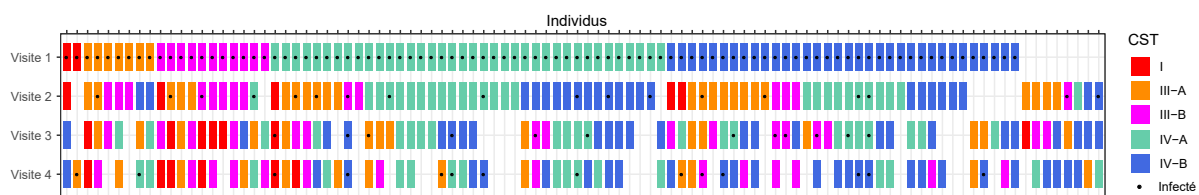


FIGURE 17.11 – Trajectoires individuelles des femmes incluses dans la cohorte CHARM, en termes de types d'état communautaire (CST).

Par la suite, nous avons stratifié ces transitions de CST en restreignant l'analyse à :

1. les participantes étant passées de CT-positives à CT-négative à la visite suivante (figure 17.12a),
2. les participantes étant restées CT-négatives à deux visites consécutives (figure 17.12b),
3. les participantes étant passées de CT-négatives à la visite 2 ou 3 à CT-positives à la visite suivante (réinfections, figure 17.12c).

Les transitions de CT-positives à CT-négatives (figure 17.12a) à tout moment au cours de l'étude (après un traitement azithromycine) étaient essentiellement associées à une transition vers le CST III-A (+75%), renforçant les résultats obtenus en comparant les échantillons CHARM de la visite 1 (CT-positifs) à ceux de la visite 2 (CT-négatifs). Ces transitions étaient observées chez des femmes qui étaient CST III-B, CST IV-A ou CST IV-B quand elles étaient CT-positives. De manière surprenante, le CST I était plus fréquent après traitement bien que *in vitro* *L. crispatus* a montré une sensibilité à l'azithromycine sur toutes les souches.

Comme attendu, en l'absence de traitement par l'azithromycine (femmes CT-négatives à 2 visites consécutives, figure 17.12b), nous observons un nombre limité de transitions, ne modifiant pas les proportions globales des différents CST (figure 17.6 page 109). Les transitions entre CST III-B et CST IV-A étaient rares, tandis que les transitions au sein du CST IV et au sein du CST III étaient communes. Nous observons également très peu de transitions du CST I au CST IV-B (N=1 sur 61 transitions) ou CST IV-A (N=1 sur 61 transitions) (tableau 17.6).

Dans le cas des transitions de femmes CT-négatives vers CT-positives, nous observons une augmentation du CST III-B (+150%) et du CST IV-B (+33%), suggérant une plus haute diversité du microbiote vaginal après l'infection par CT, et comme attendu, aucune transition

vers le CST I n'a été mise en évidence (figure 17.12c).

TABLE 17.6 – Matrices de transitions entre types d'état communautaire (CST) d'une visite à une autre chez 100 participantes de l'étude CHARM ayant fourni au moins 2 échantillons dans trois configurations, *i.e.* (a) de CT-positifs avant traitement vers CT-négatifs, (b) CT-négatifs à deux visites consécutives, (c) de CT-négatifs vers CT-positifs (ré-infections).

			vers CT-négatifs									
			I		III-A		III-B		IV-A		IV-B	
			N=7 (+600%)		N=21 (+75%)		N=14 (+8%)		N=26 (-28%)		N=27 (-42%)	
CT-positifs	I	N=1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	III-A	N=12	1	8%	4	33%	4	33%	1	8%	2	17%
	III-B	N=13	2	15%	3	23%	6	46%	1	8%	1	8%
	IV-A	N=36	1	3%	6	17%	1	3%	14	39%	14	39%
	IV-B	N=33	2	6%	8	24%	3	9%	10	30%	10	30%

(a) de CT-positifs à CT-négatifs

			vers CT-négatifs									
			I		III-A		III-B		IV-A		IV-B	
			N=9 (+13%)		N=16 (-36%)		N=22 (+38%)		N=27 (+8%)		N=35 (+0%)	
CT-négatifs	I	N=8	3	38%	0	0%	3	38%	1	13%	1	13%
	III-A	N=25	2	8%	9	36%	7	28%	2	8%	5	20%
	III-B	N=16	4	25%	0	0%	5	31%	2	13%	5	31%
	IV-A	N=25	0	0%	3	12%	2	8%	10	40%	10	40%
	IV-B	N=35	0	0%	4	11%	5	14%	12	34%	14	40%

(b) CT-négatifs à deux visites consécutives

			vers CT-positifs									
			I		III-A		III-B		IV-A		IV-B	
			N=1 (+0%)		N=3 (-25%)		N=5 (+150%)		N=5 (-38%)		N=4 (+33%)	
CT-négatifs	I	N=1	1	100%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
	III-A	N=4	0	0%	0	0%	1	25%	2	50%	1	25%
	III-B	N=2	0	0%	0	0%	2	100%	0	0%	0	0%
	IV-A	N=8	0	0%	2	25%	1	13%	2	25%	3	38%
	IV-B	N=3	0	0%	1	33%	1	33%	1	33%	0	0%

(c) de CT-négatifs à CT-positifs

Les transitions les plus communes en termes de pourcentage pour chaque CST initial sont indiquées en rouge.



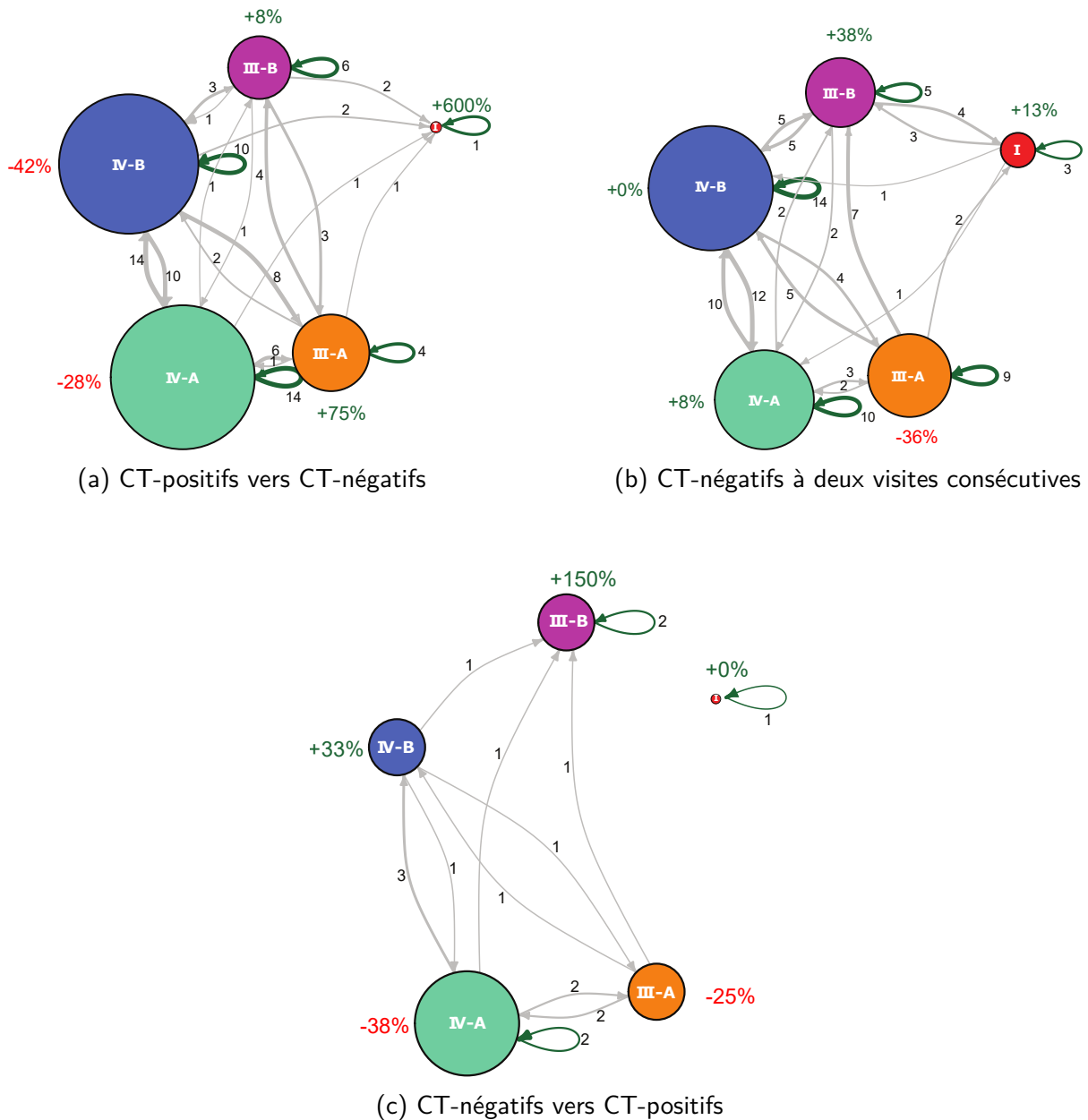


FIGURE 17.12 – Fréquences et transitions entre types d'état communautaire (CST) d'une visite à une autre entre échantillons (a) CT-positifs avant traitement devenant CT-négatifs, (b) CT-négatifs à deux visites consécutives, (c) CT-négatifs devenant CT-positifs (ré-infections).

## Chapitre

# 18

## Discussion

### 18.1 Rappel des résultats

Dans la partie II, chapitre 13, nous avons montré que certains phylotypes tels que *G. vaginalis*, *A. vaginae* ou *Mobiluncus curtisii* étaient associés à l'infection prévalente par *C. trachomatis*, des phylotypes identifiés comme étant associés à la VB [40]. Au niveau des CST, nous avons montré que les CST III et CST IV étaient significativement associés à l'infection prévalente par *C. trachomatis* comparés au CST I, comme suggéré dans notre étude en France [127] et une autre étude aux Pays-Bas [104]. Nous avons conclu que pour savoir si un microbiote vaginal de type CST III ou CST IV favorisait l'infection par *C. trachomatis* ou était le résultat de l'infection, des études longitudinales se focalisant sur les cas incidents d'infection étaient nécessaires. Une telle étude menée aux Pays-Bas a justement montré que les femmes présentant un CST dominé par *L. iners* avaient un risque accru d'infection par *C. trachomatis* comparées aux femmes présentant un CST dominé par *L. crispatus* [142]. Certaines études longitudinales du microbiote vaginal avaient également mis en évidence des transitions régulières entre CST III et CST IV [120,143], et particulièrement après un traitement antibiotique pour la VB [144], alors même que le CST IV est également associé à un plus haut risque d'infection par *C. trachomatis* [82,92].

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à ce qui se passe en aval de l'infection. Le schéma d'étude longitudinal de CHARM nous a donné l'occasion unique d'étudier de manière observationnelle le microbiote vaginal après traitement par l'azithromycine. Il est intéressant de noter que trois mois après traitement azithromycine pour l'infection par *C. trachomatis*, les femmes avaient plus fréquemment un microbiote vaginal du CST III-A ou du CST IV. La fréquence de chaque CST chez les femmes CT-négatives à la visite 2 était significativement différente de celle observée chez les femmes contrôles CT-négatives recrutées dans la même clinique. Être infectée par *C. trachomatis* et traitée n'est donc pas équivalent au fait de ne pas avoir été infectée par *C. trachomatis* en termes de communauté microbienne vaginale. La modélisation des transitions de la visite 1 à la visite 2 a démontré qu'après un traitement

azithromycine, l'abondance relative de *L. iners* (et la fréquence du CST III) augmentait substantiellement. Du fait du schéma d'étude observationnel et censuré par intervalles, notre étude ne permet pas de distinguer clairement l'effet direct de l'antibiotique (observé trois mois plus tard) de l'effet de la clairance de *C. trachomatis* sur le microbiote vaginal. Cependant, nous faisons l'hypothèse que le microbiote observé pourrait être partiellement expliqué par l'effet de l'exposition à un antibiotique et/ou par un retour à un microbiote vaginal pré-infection, soit un microbiote susceptible à l'infection.

Nous avons vu que certaines souches de *L. iners* et de *G. vaginalis* présentaient un plus haut niveau de résistance à l'azithromycine, et pourraient ainsi être sélectionnées post-traitement, tandis que les espèces de *Lactobacillus* sensibles sont diminuées. Comme *L. iners* est un facteur de risque potentiel de l'infection par *C. trachomatis*, ce résultat est important en ce qu'il suggère qu'après un traitement antibiotique, le risque d'acquisition d'une IST n'est pas réduit. Ce résultat pourrait expliquer le taux élevé de réinfections observé dans CHARM et d'autres études (20 à 30 cas pour 100 personnes-années [14, 15]). Dans cette cohorte, 74,2% des femmes incluses rapportaient à l'inclusion avoir déjà été CT-positif dans les 3 derniers mois. Bien que cela puisse être dû à une (ré-)exposition à des partenaires infectés, il est probable qu'elles aient aussi reçu un traitement antibiotique, modifiant ainsi leur susceptibilité à la ré-infection. De plus, nous mettons en évidence le fait que le microbiote vaginal post-traitement reste stable jusqu'à 9 mois plus tard et maintient de hautes abondances relatives de *L. iners* et de *G. vaginalis*, favorisant potentiellement un risque accru d'infection par *C. trachomatis*. Il est intéressant de noter que la doxycycline, un autre antibiotique recommandé pour le traitement de cette infection, a éliminé l'ensemble des souches testées dans notre étude de concentration minimale inhibitrice. Bien que ces deux antibiotiques soient considérés comme efficaces à plus de 95% dans le traitement de l'infection, une méta-analyse a montré que la doxycycline était plus efficace que l'azithromycine [31]. Bien que l'azithromycine présente l'avantage de la prise unique, cet avantage a été débattu par Horner PJ qui soutient que l'azithromycine a un taux d'échec au traitement et de réinfections plus élevé que la doxycycline, possiblement attribuable à sa courte durée de traitement, et que des traitements plus longs, comme dans le cas de la doxycycline, seraient préférables [151]. Si l'azithromycine élimine *L. crispatus*, *L. jensenii*, et *L. gasseri in vivo*, le traitement favoriserait *L. iners* ou *G. vaginalis* et augmenterait ainsi la susceptibilité à l'infection par *C. trachomatis*. Ce résultat est novateur puisqu'une précédente étude avait rapporté une absence d'effet de l'azithromycine sur quatre souches de *G. vaginalis* et deux de *L. iners*. Ce résultat appuie l'utilisation de produits biothérapeutiques vivants pour restaurer un microbiote vaginal protecteur après un traitement antibiotique pour l'infection par *C. trachomatis* ou d'autres infections. Étonnamment, peu de choses sont connues sur les effets sur le microbiote vaginal d'antibiotiques fréquemment utilisés.

## 18.2 Limites

Notre étude présente plusieurs limites. Tout d'abord, nous avons utilisé une cohorte de 99 femmes Africaines-Américaines de la même aire géographique et de la même clinique comme population contrôle dans nos analyses. Cependant, la cohorte CHARM n'est pas entièrement Africaine-Américaine (87,4%) et nous ne pouvons pas exclure que les femmes différaient par d'autres caractéristiques. Ensuite, du fait de nos critères d'inclusion en termes de positivité à l'infection par *C. trachomatis*, nous sommes dans l'incapacité de déterminer si les phylotypes bactériens et CST sur-représentés dans les échantillons CT-positifs de la visite 1 étaient pré-

sents avant l'infection. Pareillement, nous ne pouvons pas distinguer l'effet de la clairance de CT de celui du traitement antibiotique sur la composition du microbiote. Cependant, nous avons montré que certaines souches de *L. iners* et de *G. vaginalis* sont résistantes à l'azithromycine, ce qui pourrait expliquer les motifs observés. Malheureusement, notre étude ne possédait pas la puissance statistique nécessaire pour détecter des résultats significatifs concernant les cas de réinfections à la visite 3 et 4. Ceci aurait apporté une contribution intéressante à la question de la restauration du microbiote vaginal et du risque de réinfection. Enfin, nous avons concentré nos analyses de sensibilité aux antibiotiques sur cinq espèces (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii* et *G. vaginalis*) du fait de leur abondance dans les voies génitales, mais d'autres espèces potentiellement résistantes à l'azithromycine et présentes en faible abondance pourraient aussi proliférer après un traitement antibiotique et pousser la communauté vaginale vers un état diversifié et peu favorable. En particulier, nous voudrions mettre en évidence le décalage entre prévalence et abondance d'une espèce. Beaucoup d'espèces sont présentes en très faible abondance dans un échantillon mais sont quasiment ubiquitaires dans la cohorte. Dans le cas de *L. iners* et *G. vaginalis*, elles ont été retrouvées dans 94,2% et 87,8% de tous les échantillons CHARM, et sont présentes de manière concomitante dans 83,0% des échantillons CHARM. Ces chiffres de prévalence suggèrent que des facteurs externes tels que le traitement antibiotique peut modifier l'abondance d'une espèce bactérienne sans pour autant l'éliminer, et que cette espèce pourrait recoloniser le milieu et proliférer pourvu que les bonnes conditions soient réunies. Ces phylotypes sont importants pour comprendre la réactivité et la restauration d'une communauté face à une perturbation telle que l'invasion par un pathogène et les traitements antibiotiques.

### 18.3 Conclusions

Cette étude a des conséquences potentiellement importantes en termes de contrôle et de gestion de l'infection à *C. trachomatis*. Elle renforce l'hypothèse du rôle du microbiote vaginal dans la susceptibilité à l'infection par *C. trachomatis*, pas seulement pour les microbiotes dépourvues de lactobacilles, mais aussi pour les microbiotes dominés par *L. iners*. De plus, notre étude montre qu'un microbiote associé à un risque plus élevé peut être favorisé en partie par la prise d'antibiotiques. Nos résultats soulignent l'importance de prendre en compte les effets potentiellement perturbateurs d'un traitement antibiotique sur le microbiote vaginal, que ce soit pour le traitement des infections par *C. trachomatis* ou pour d'autres indications. De nouvelles études sur l'effet des thérapies antibiotiques sur la composition du microbiote vaginal sont absolument nécessaires. De telles études indiqueraient la direction nécessaire pour le développement de stratégies pour protéger et restaurer un microbiote vaginal optimal avant et après un traitement antibiotique.



*IV*

---

**Etude des facteurs associés à la  
dynamique du microbiote vaginal**

---



## Chapitre

# 19

## Introduction

### 19.1 Rappels sur le microbiote vaginal

Comme nous l'avons vu précédemment, le score de Nugent et les critères d'Amsel permettent de diagnostiquer cliniquement et microbiologiquement la vaginose bactérienne, où les espèces *Lactobacillus* sont peu présentes [37,39]. Il a été montré que la VB est associée à l'infection par le VIH [51,156–158], l'herpès HSV-2 [75,159], et nous avons montré dans la partie I qu'elle était également associée à l'infection par le papillomavirus humain [71, 90, 98, 99] et *C. trachomatis* [72, 82, 92]. Les nouvelles techniques moléculaires ont permis la description de communautés bactériennes vaginales, nommés les types d'états communautaires (CST) que l'on retrouve dans toutes les régions du monde, bien qu'en proportions différentes [127, 160–162] (cf. étude française décrite en partie II). Le CST IV est composé d'un ensemble de bactéries anaérobies strictes et facultatives, telles que *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* ou BVAB1, et est corrélé à la VB [40, 42, 105]. Le CST IV est également associé aux IST [52, 104, 163], et nous avons montré en partie II qu'il était sur-représenté dans les infections à *C. trachomatis*. L'accès à la technologie du séquençage du gène de l'ARNr 16S bactérien a permis de séparer le CST III des autres CST dominés par une espèce de *Lactobacillus*. Le CST III est aussi associé à l'infection par *C. trachomatis* [104] et nous avons montré en partie II qu'il était également sur-représenté dans les infections à *C. trachomatis* dans une étude française et une étude américaine.

### 19.2 Récurrence de la vaginose bactérienne

Les questions autour de la VB sont encore débattues aujourd'hui, en particulier la question de la transmission sexuelle de la VB [164]. D'après un certain nombre d'essais cliniques randomisés contrôlés sur le traitement de VB, nous savons que les taux de guérison atteignent seulement 50 à 80%, et diminuent avec le temps [165–170], et qu'une majorité des femmes présente des



VB récurrentes [171] avec un délai avant récurrence moyen de 14 semaines [165]. En l'absence de traitement, la récurrence de la VB peut être encore plus rapide, après seulement quelques jours [120, 143].

### 19.3 Schémas de dynamiques du microbiote vaginal

De précédentes études basées sur un échantillonnage quotidien ou fréquent ont décrit plusieurs schémas de dynamiques du microbiote vaginal. Par exemple, dans une étude longitudinale dans laquelle les participantes réalisaient un auto-prélèvement vaginal quotidiennement pendant 6 semaines, Schwebke et al. ont observé que seules 22% des participantes maintenaient un microbiote vaginal normal au cours du suivi [172]. La moitié des participantes présentait des fluctuations entre microbiote normal et intermédiaire et 25% fluctuaient entre microbiote normal et VB (d'après la définition du score du Nugent). Ainsi, les femmes peuvent avoir des schémas stables de microbiote normal, de microbiote intermédiaire ou de VB, ou présenter des transitions courtes entre ces différents états [144, 172–176].

### 19.4 Facteurs associés aux modifications de microbiote vaginal

Dans ces études, le fait de présenter un microbiote vaginal fluctuant était associé aux menstruations, à l'usage de spermicide et de préservatifs, et les rapports sexuels vaginaux et oraux étaient suspectés bien que les résultats ne soient pas uniformes à ce sujet. La clairance spontanée de la VB pouvait survenir mais les facteurs associés à celle-ci étaient rarement étudiés.

### 19.5 Objectif

Dans cette partie, nous avons cherché à modéliser les dynamiques temporelles du microbiote vaginal caractérisé par le séquençage du gène de l'ARNr 16S dans deux cohortes de femmes suivies prospectivement, avec un échantillonnage fréquent, pour évaluer les facteurs associés aux transitions entre communautés bactériennes vaginales dominées ou non par des *Lactobacillus* (figure 19.1), en traitant séparément les microbiotes vaginaux dominés par *L. iners* (CST III) et ceux dominés par d'autres espèces de *Lactobacillus* (CST I, II et V).

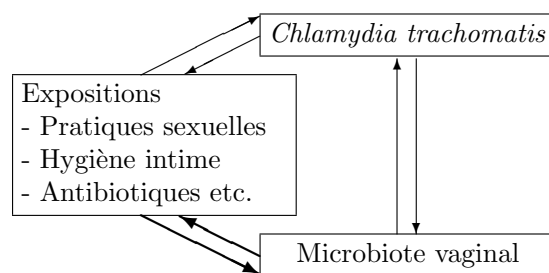


FIGURE 19.1 – Représentation schématique des associations entre expositions, infection par *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal.



## Chapitre

# 20

## Méthodes et données

### 20.1 Schémas d'étude

#### 20.1.1 Données de l'étude "Douching Cessation"

L'étude "Douching Cessation" (DC) est une étude longitudinale interventionnelle conduite entre 2005 et 2007 dans laquelle 32 femmes en âge de procréer et rapportant un usage régulier de la douche vaginale collectaient des échantillons vaginaux tous les 3 ou 4 jours pendant 16 semaines (937 échantillons). Pendant les 4 premières semaines, il leur était demandé de continuer leurs pratiques d'hygiène intime habituelles, et pendant les 12 semaines suivantes elles étaient invitées à arrêter les douches vaginales. Les participantes notaient leurs données comportementales et menstruelles sur des journaux quotidiennement et ramenaient leurs échantillons et journaux au centre clinique chaque semaine. Pour information, une seule femme a consommé des antibiotiques pendant l'étude et ses données ont été censurées au moment de la prise du traitement antibiotique. Plus d'informations sur le schéma d'étude ont été publiées précédemment [177]. Des autorisations éthiques des *Institutional Review Boards* des facultés de Médecine de l'Université John Hopkins et de l'Université du Maryland, à Baltimore, ont été obtenues pour cette étude. Toutes les participantes ont signé un formulaire de consentement éclairé.

#### 20.1.2 Données de l'étude "Human Microbiome Project"

L'étude "Human Microbiome Project" (HMP) est une étude longitudinale conduite entre Septembre 2009 et Juillet 2010 ayant inclus 135 femmes non-enceintes et en âge de procréer à l'Université d'Alabama, à Birmingham. Le protocole de l'étude a été approuvé par les *Institutional Review Boards* de l'Université d'Alabama, à Birmingham, et de l'Université du Maryland, à Baltimore. Toutes les participantes ont signé un formulaire de consentement éclairé. Les participantes devaient collecter 3 échantillons vaginaux quotidiennement pendant 10 semaines,

dont un seul était utilisé pour les analyses génomiques. Les participantes remplissaient un questionnaire à l'inclusion et devaient tenir un journal intime chaque jour rapportant leurs pratiques sexuelles et d'hygiène intime de manière standardisée. Un examen gynécologique était réalisé à la cinquième et à la dixième semaine ou à des visites intermédiaires en cas de symptômes vaginaux. Si un diagnostic de VB symptomatique selon les critères d'Amsel était posé lors de ces visites, la participante recevait un traitement antibiotique selon les pratiques standards [178]. Des informations plus complètes sur le schéma d'étude ont été publiées précédemment [143].

## 20.2 Amplification et séquençage du gène de l'ARNr 16S sur Illumina HiSeq

Les régions V3-V4 du gène de l'ARNr 16S ont été amplifiées par une PCR en 2 étapes telle que décrite dans Holm et al. [135] et Fadrosch et al. [128]. La première PCR a été réalisée avec les amorces bactériennes 338F et 806R contenant un espaceur d'hétérogénéité de 0-7 paires de base and les amorces de séquence Illumina. Les réactifs de PCR étaient 1x KAPA HotStart ReadyMix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA), 0,4  $\mu\text{M}$  pour chaque amorce sens et antisens, et 5  $\mu\text{L}$  d'ADN génomique. Les amplicons résultants ont été dilués dans de l'eau à 1:20 et 2  $\mu\text{L}$  ont été utilisés comme intrant pour la seconde PCR. Un *dual index barcode* de 8 paires de base et des *flow cell linkers adapters* nécessaires pour le séquençage Illumina ont été rajoutés. Les réactifs étaient 1x KAPA HotStart ReadyMix et 0,2  $\mu\text{M}$  de chaque amorce.

## 20.3 Traitement des données post-séquençage

Des variants de séquences d'amplicons (*amplicon sequence variantes - ASV*) générés par DADA2 ont été classifiés en utilisant le *RDP Naïve Bayesian Classifier* [179], entraîné sur la base de données gène de l'ARNr 16S SILVA v128 tel qu'implémenté dans le package *R dada2* [134]. Les ASV des taxons vaginaux ont été annotés au niveau de l'espèce en utilisant *SpeciateIT* (<http://ravel-lab.org/speciateit/>). Les échantillons avec moins de 1 000 séquences ont été retirés de l'analyse. Les CST ont été assignés sur la base de la similarité avec le centroïde de chaque CST déterminé sur un ensemble de plus de 13 000 échantillons vaginaux. Les taxons présents à une abondance de moins de  $10^{-5}$  du total des séquences obtenues dans les échantillons de l'étude ont été retirés.

## 20.4 Analyse statistique

Les comparaisons des caractéristiques à l'inclusion ont été réalisées par l'utilisation du test exact de Fisher. Les analyses du microbiote vaginal ont été réalisées au niveau des CST avec sept CST identifiés : CST I (*L. crispatus*), CST II (*L. gasseri*), CST III (*L. iners*), CST IV-A, CST IV-B, CST IV-C et CST V (*L. jensenii*). Les femmes étaient ensuite réparties en classes par le biais du regroupement hiérarchique en fonction de leur CST dominant au cours du suivi [120]. Ces classes étaient donc LC – classe dominée par un CST I au cours de l'étude –,

LG – classe dominée par un CST II –, LI – classe dominée par un CST III –, LID – classe dominée par un CST III à forte proportion de bactéries anaérobies –, DA – classe dominée par un CST IV-A –, DB – classe dominée par un CST IV-B – et DC – classe dominée par un CST IV-C.

Une analyse stratifiée sur la classe a été réalisée, en traitant séparément les femmes des classes LC/LG/DA/DB/DC et les femmes des classes LI/LID.

Les effets des variables indépendantes du temps et dépendantes du temps - telles que les variables démographiques, les expositions sexuelles, les pratiques d'hygiène et le statut HPV - sur le taux de transition des communautés dominées par une espèce de *Lactobacillus* (*High Lactobacillus-dominated vaginal microbiota* - HL-VMB) vers des communautés non dominées par une espèce de *Lactobacillus* (*Low-Lactobacillus vaginal microbiota* - LL-VMB) (LL-VMB incident versus HL-VMB stable) et des communautés LL-VMB vers HL-VMB (HL-VMB incident versus LL-VMB stable, ou encore clairance de LL-VMB versus persistance de LL-VMB) ont été évalués par des modèles de Cox à événements récurrents d'Andersen-Gill, implémenté dans le package *survival* de R. Les intensités de transition d'un CST à un autre et la durée du séjour dans un CST particulier ont été calculées grâce au package *msm* de R.



## Chapitre

# 21

## Résultats

### 21.1 Description des deux études

Les participantes ont fourni en moyenne 29 échantillons exploitables tout au long de l'étude dans l'étude DC (N=32), et 48 dans l'étude HMP-UMB (N=100), lesquels ont pu être classifiés en CST I, II, III, IV-A, IV-B, IV-C et V. Les dynamiques temporelles du microbiote vaginal des participantes au cours du temps dans les deux études sont présentées en figure 21.1 et figure 21.2. Sept femmes (22%) sont restées dans le même CST tout au long de l'étude dans l'étude DC, et 8 (8%) dans l'étude HMP-UMB.

Dans l'étude DC, les participantes ne différaient pas significativement à l'inclusion en termes d'âge, d'origine raciale ou ethnique, de niveau d'éducation, de type de contraception et de nombre de partenaires sexuels vie entière lorsque l'on comparait les femmes des classes LC/LG, LI/LID et DA/DB/DC (tableau 21.1). Dans l'étude HMP-UMB, les femmes des classes DA/DB/DC étaient plus souvent Africaines-Américaines ( $p=0,011$ ), avaient déjà eu recours aux douches vaginales ( $p=0,060$ , vie entière) et utilisaient moins souvent une contraception hormonale ( $p=0,060$ ) (tableau 21.1).



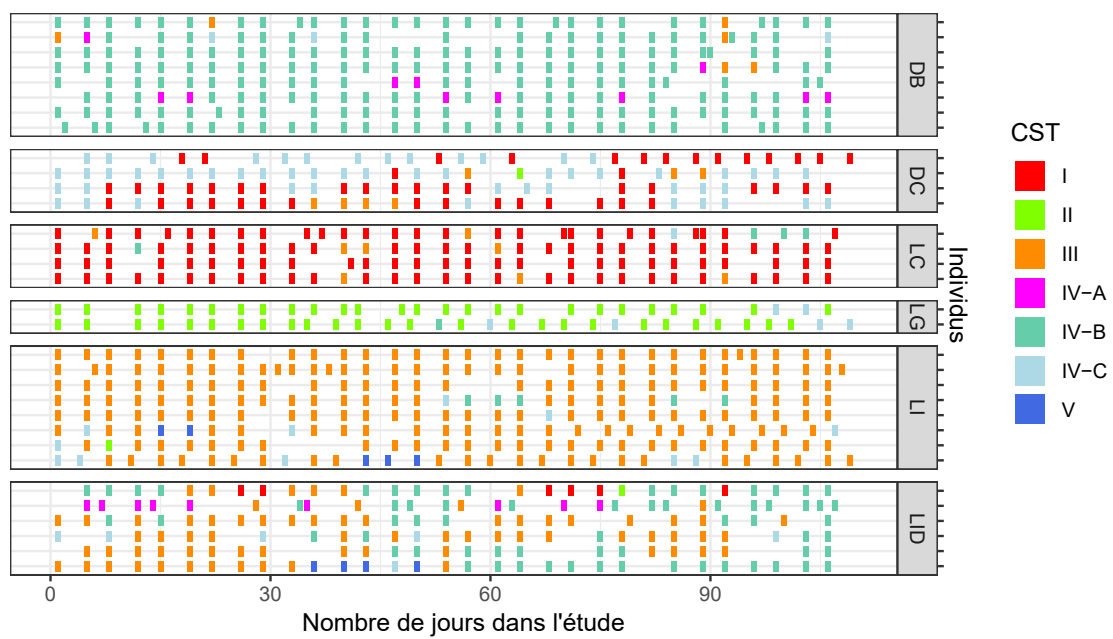


FIGURE 21.1 – Dynamique des types d'état communautaire (CST) au cours du temps par femme, dans l'étude "Douching Cessation" (DC - N=32).

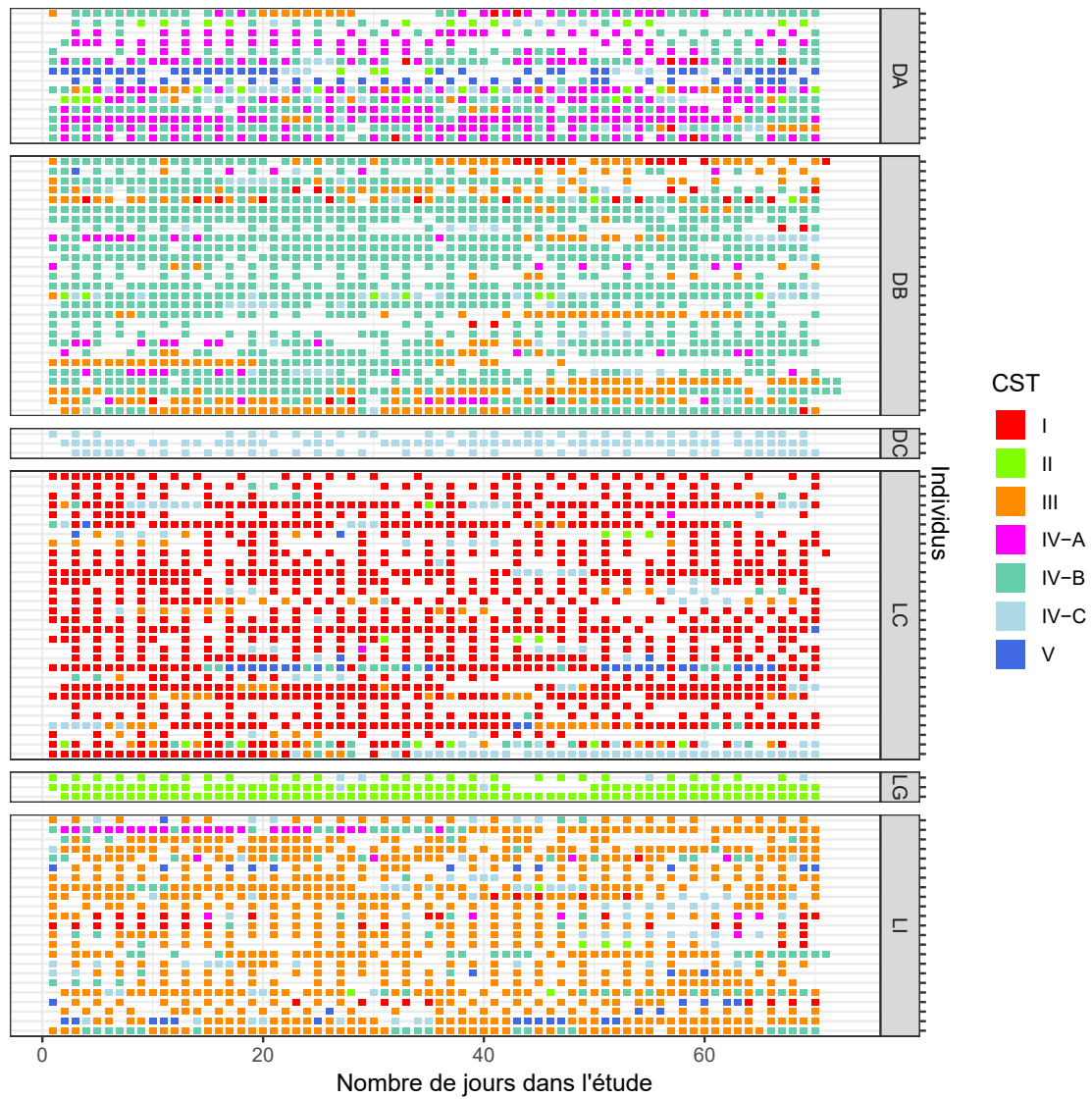


FIGURE 21.2 – Dynamique des types d'état communautaire (CST) au cours du temps par femme, dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

TABLE 21.1 – Caractéristiques à l'inclusion des femmes des classes LC/LG, LI/LID et DA/DB/DC, dans l'étude "Douching cessation" (DC - N=32) et dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

	étude DC				étude HMP-UMB				p-value**
	Nombre d'observations	classes LC/LG*	classes LI/LID*	classes DA/DB/DC*	Nombre d'observations	classes LC/LG*	classes LI/LID*	classes DA/DB/DC*	
Age	32				100				0,163
40 ans et plus	13	3	6	4	9	4	2	3	
30-39 ans	13	2	4	7	37	17	7	13	
18-29 ans	6	1	4	1	54	12	14	28	
Race	32				100				0,011
Africaine-Américaine	16	2	7	7	61	13	14	34	
Hispanique ou autre	3	0	2	1	6	3	1	2	
Blanche	13	2	7	4	33	17	8	8	
Contraception	32				86				0,060
Hormonale	6	1	3	2	17	7	7	3	
DIU	2	1	0	1	5	1	0	4	
Non-hormonale	24	4	11	9	64	19	14	31	
Nombre de partenaires	31				100				0,531
Vie entière									
Plus de 7	14	4	7	3	41	15	7	19	
1-6	17	2	6	9	59	18	16	25	
Niveau d'étude	32				100				0,179
Etudes supérieures	15	3	8	4	43	18	6	19	
Lycée partiel	13	3	4	6	54	15	16	23	
Collège partiel	4	0	2	2	3	0	1	2	
Statut marital	32				100				0,488
Célibataire/Non-mariée	5	0	3	2	54	15	12	27	
Séparée/Divorcée	27	6	11	10	20	6	6	8	
Mariée/Couple					26	12	5	9	

(Suite)	étude DC				étude HMP-UMB				p-value**
	Nombre d'observations	classes LC/LG*	classes LI/LID*	classes DA/DB/DC*	classes LC/LG*	classes LI/LID*	classes DA/DB/DC*	Nombre d'observations	
Consommation de tabac	32			1				100	0,730
Vie entière - oui	17	3	8	6					
Vie entière - non	15	3	6	6					
2 derniers mois - oui								16	6
2 derniers mois - non								84	18
Consommation d'alcool	32			0,782				100	0,402
12 derniers mois - oui	22	5	9	8					
12 derniers mois - non	10	1	5	4					
2 derniers mois - oui								77	17
2 derniers mois - non								23	6
Grossesse	100							100	0,256
Vie entière - oui								67	15
Vie entière - non								33	8
Utilisation de lubrifiant								91	
2 derniers mois - oui								22	8
2 derniers mois - non								69	14
Utilisation de préservatif								86	
2 derniers mois - souvent/toujours								38	10
2 derniers mois - rarement/jamais								48	11
Douche vaginale									
Vie entière - oui	100							100	0,060
Vie entière - non	51							51	
2 derniers mois - oui	49							49	
2 derniers mois - non	12							12	
	88							88	

\*Les femmes étaient regroupées en classes en fonction du type d'état communautaire (CST) majoritaire au cours de l'étude : LC pour un CST I majoritaire, LG pour un CST II majoritaire, LI pour un CST III majoritaire, LID pour un CST III majoritaire mais en moindre proportion, DA pour un CST IV-A majoritaire, DB pour un CST IV-B majoritaire et DC pour un CST IV-C majoritaire.

\*\*La p-value a été calculée par le test de Fisher.

## 21.2 Description des transitions entre CST

Dans l'étude DC, les probabilités quotidiennes d'incidence et de rémission de LL-VMB étaient 0,032 (IC 95% 0,025-0,041) et 0,043 (IC 95% 0,033-0,056), respectivement. Dans l'étude HMP-UMB, ces probabilités étaient de 0,083 (IC 95% 0,074-0,093) et 0,112 (IC 95% 0,101-0,125), respectivement. Globalement, les femmes restaient en moyenne 30 jours (IC 95% 23-38) dans un état HL-VMB, et 22 jours (IC 95% 17-30) dans un état LL-VMB dans l'étude DC, et 11 jours (IC 95% 10-12) et 8 jours (IC 95% 7-9) respectivement dans l'étude HMP-UMB.

Les transitions entre HL-VMB et LL-VMB pourraient être différentes pour une femme qui est HL-VMB la plupart du temps et une femme qui est LL-VMB la majorité de temps, d'où la nécessité de stratifier sur la classe (i.e. le CST dominant au cours de l'étude). Après stratification sur la classe, ces chiffres variaient grandement. Les femmes des classes DA/DB/DC restaient en moyenne 10 jours (IC 95% 7-16) dans un état HL-VMB et 41 jours (IC 95% 26-65) dans un état LL-VMB, tandis que les femmes des classes LC/LG/LI/LID restaient en moyenne 34 jours (IC 95% 25-48) dans un état HL-VMB et 8 jours (IC 95% 6-12) dans un état LL-VMB. Les chiffres correspondants pour l'étude HMP-UMB étaient 3,2 jours (IC 95% 2,7-3,8), 12 jours (IC 95% 10-14), 14 jours (IC 95% 12-16) et 2,2 jours (IC 95% 1,9-2,6), respectivement.

## 21.3 Facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état LL-VMB

La comparaison des classes (LC, LG, LI, LID, DA, DB et DC) a mis en évidence des schémas de fluctuation plus importants chez les femmes de la classe LI/LID que des autres classes. Les femmes de la classe LI/LID restaient 72% du temps dans un CST III tandis que ce chiffre était de 89% pour les femmes des classes LC/LG (dans les CST I et CST II respectivement) et 80% pour celles des classes DA/DB/DC (dans les CST IV-A, IV-B et IV-C respectivement) (tableau 21.2). Les analyses suivantes ont donc été menées en stratifiant sur la classe LI/LID.

Les résultats suivants sont rapportés dans la figure 21.3 pour l'étude DC et l'étude HMP-UMB, pour les résultats significatifs seulement, et dans le tableau 21.3 et le tableau 21.4 pour l'ensemble des résultats. Les résultats de l'analyse non stratifiée sont rapportés dans l'appendice D.

TABLE 21.2 – Nombre d'occurrences des CST et des variables dépendantes du temps par classe dans l'étude "Douching cessation" (DC - N=32) et dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

Classe	Etude DC				Etude HMP-UMB				
	LC/LG* n/N %	LI/LID* n/N %	DA/DB/DC* n/N %	LC/LG* n/N %	LI/LID* n/N %	DA/DB/DC* n/N %	LC/LG* n/N %	LI/LID* n/N %	DA/DB/DC* n/N %
CST									
I, II, V	164/185 88,65	17/413 4,12	53/352 15,06	1214/1458 83,27	91/1064 8,55	160/2347 6,82			
III	9/185 4,87	297/413 71,91	13/352 3,69	82/1458 5,62	757/1064 71,15	318/2347 13,55			
IV-A, IV-B, IV-C	12/185 6,49	99/413 23,97	286/352 81,25	162/1458 11,11	216/1064 20,30	1869/2347 79,63			
Covariables									
Menstruations	122/673 18,13	279/1569 17,78	255/1343 18,99	452/2743 16,48	455/2174 20,93	815/3821 21,33			
Rapports anaux	0/670 0	16/1551 100	0/1334 0	5/2664 0,19	10/2157 0,46	34/3734 0,91			
Douches vaginales	17/670 2,54	48/1552 3,09	26/1334 1,95	7/2660 0,26	8/2158 0,37	26/3734 0,70			
Lubrifiant	18/670 2,69	29/1552 1,87	33/1334 2,47	21/2630 0,80	48/2141 2,24	71/3709 1,91			
Préservatif	6/670 0,90	17/1552 1,10	59/1334 4,42	33/2664 1,24	84/2157 3,89	120/3640 3,21			
Rapports digitaux/Sex toys	59/670 8,81	62/1551 4,00	26/1334 1,95	84/2663 3,15	152/2155 7,05	182/3732 4,88			
Rapports oraux	50/670 7,46	72/1551 4,64	39/1334 2,92	82/2664 3,08	105/2157 4,87	126/3732 3,38			
Sous-vêtement string	111/670 16,57	264/1552 17,01	217/1334 16,27	264/2653 9,95	335/2155 15,55	270/3726 7,25			
Rapports vaginaux non protégés	50/670 7,46	72/1551 4,64	39/1334 2,92	199/2663 7,47	182/2156 8,44	407/3732 10,91			

\*Les femmes étaient regroupées en classes en fonction du type d'état communautaire (CST) majoritaire au cours de l'étude : LC pour un CST I majoritaire, LG pour un CST II majoritaire, LI pour un CST III majoritaire, LID pour un CST III majoritaire mais en moindre proportion, DA pour un CST IV-A majoritaire, DB pour un CST IV-B majoritaire et DC pour un CST IV-C majoritaire.

### 21.3.1 Analyse chez les femmes des classes LC/LG/DA/DB/DC

Lorsque l'on s'intéresse aux transitions des femmes appartenant aux classes LC, LG, DA, DB et DC seulement, l'effet des menstruations sur le risque de transition vers un état LL-VMB est très marqué dans les deux études (HR 6,52 IC 95% 4,21-10,10 pour les menstruations le jour même dans l'étude DC, et 2,13 IC 95% 1,43-3,17 dans l'étude HMP-UMB). À noter que dans l'étude HMP-UMB, les menstruations rapportées dans les journaux intimes des participantes étaient beaucoup moins régulières que dans l'étude DC (voir Annexe D). Le reste des expositions est non significatif dans l'étude DC du fait de la perte de puissance liée à la stratification. Dans l'étude HMP-UMB, le lubrifiant est associé à un risque accru de transition vers un état LL-VMB (7,82 IC 95% 2,90-21,07) le jour même), et l'usage d'une contraception hormonale est protecteur vis-à-vis de ces transitions comparé à une contraception non-hormonale (0,48 IC 95% 0,25-0,94).

Concernant les transitions vers un état HL-VMB, les menstruations sont associées à une probabilité plus faible de transition, dans l'étude DC seulement (0,12 IC 95% 0,02-0,92 le jour même). La douche vaginale apparaît comme positivement associée à une transition vers un état HL-VMB mais avec seulement 5 évènements observés. À noter également que la raison principale d'utilisation des douches vaginales dans cette étude était en utilisation post-menstruations. De plus, par *design*, l'étude DC recrutait des femmes ayant recours aux douches vaginales qui continuaient leurs pratiques pendant 4 semaines puis étaient invitées à arrêter les douches vaginales pendant 12 semaines.

### 21.3.2 Analyse chez les femmes des classes LI/LID

À l'inverse, lorsque l'on s'intéresse uniquement aux femmes des classes LI et LID dans les deux études, outre les règles qui favorisent les transitions vers un état LL-VMB, l'usage du lubrifiant dans l'étude DC favorise ces mêmes transitions (7,57 IC 95% 2,05-27,95 dans les 72h précédentes).

Concernant les transitions vers un état HL-VMB dans l'étude DC seule, l'usage du lubrifiant à nouveau, les rapports vaginaux sans préservatif (0,47 IC 95% 0,28-0,79), la pénétration digitale (0,23 IC 95% 0,08-0,66), l'origine hispanique (bien que très peu d'observations) et de manière surprenante la contraception hormonale, sont des facteurs qui diminuent la probabilité de retour vers un état HL-VMB. Dans l'étude HMP-UMB, les facteurs diminuant cette même probabilité sont les douches vaginales, l'origine africaine-américaine et l'âge (30 ans et plus), tandis que l'usage du préservatif dans les 72h précédentes est associé à une probabilité plus élevée de transition vers un état HL-VMB (1,85 IC 95% 1,18-2,89).

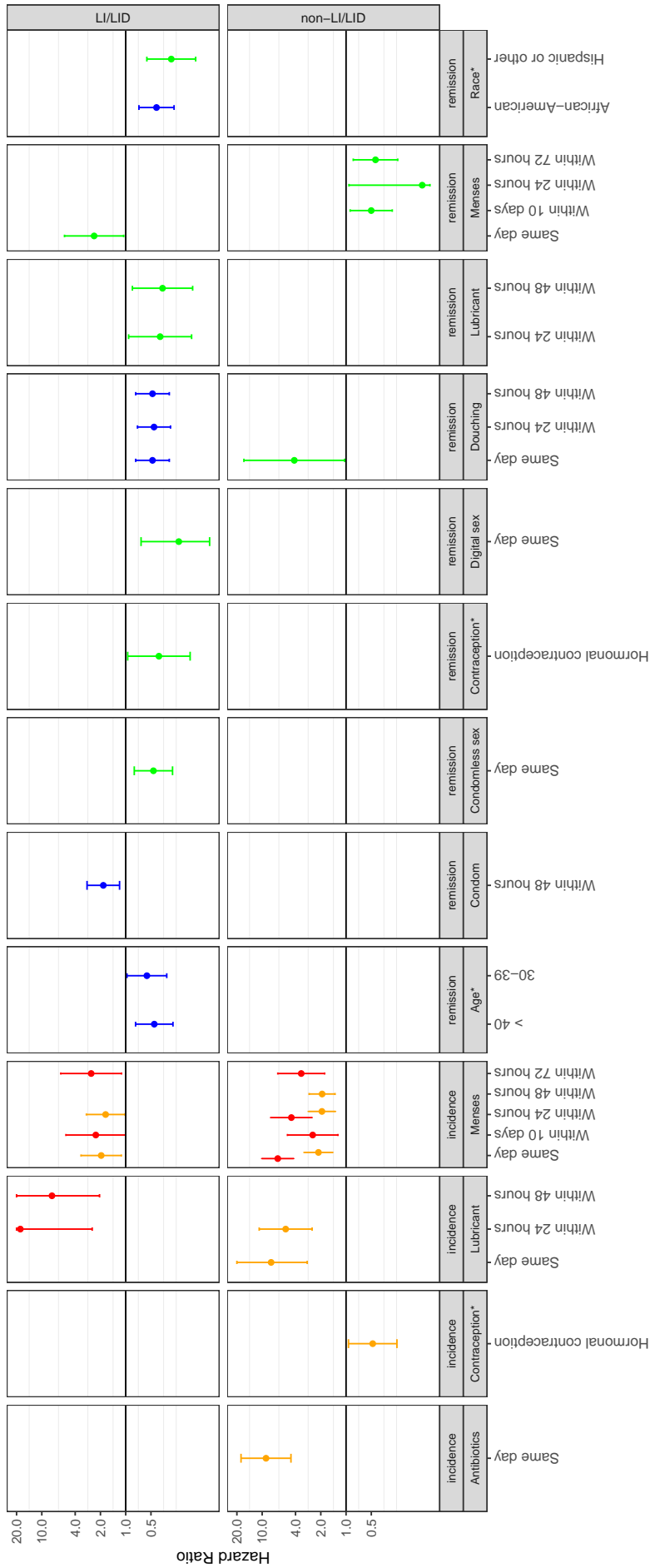


FIGURE 21.3 – Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la clairance d'un état non dominé par des *Lactobacillus* (LL-VMB) en stratifiant sur le CST dominant des participantes, dans l'étude "Douching Cessation" (DC - N=32) et dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

CST : *Community State Type*; VB : Vaginose bactérienne; LI : femmes dont le CST majoritaire est le CST III; LID : femmes dont les CST majoritaires sont le CST III et le CST IV.

\*Les classes de référence pour les variables âge, race et contraception sont "18-29 ans", "Blanche" et "Non-hormonale" respectivement.



TABLE 21.3 – Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des *Lactobacillus* (LL-VMB) dans l'étude "Douching Cessation" (DC - N=32), en stratifiant selon la classe.

Etude DC		Incidence LL-VMB						
Covariables		sans classe LI/LID			classe LI/LID			
	N	HR	IC 95%	p-value	N	HR	IC 95%	
Age								
Plus de 40 ans	122/238				113/316	1,22	0,47-3,17	0,68098
30-39 ans	88/238				111/316	0,36	0,08-1,62	0,18307
18-29 ans	28/238				92/316	ref	-	-
Origine raciale								
Africaine-Américaine	74/238	1,43	0,62-3,26	0,40153	119/316	1,32	0,44-3,90	0,61942
Hispanique ou autre	0/238				56/316	0,63	0,12-3,28	0,58616
Blanche	164/238	ref	-	-	141/316	ref	-	-
Contraception								
Hormonale	34/238	0,94	0,14-6,27	0,94528	56/316	1,60	0,82-3,12	0,16992
DIU	29/238	1,36	0,63-2,94	0,43115	0/316			
Non-hormonale	175/238	ref	-	-	260/316	ref	-	-
Menstruations								
le jour même	47/238	6,52	4,21-10,10	0,00000	60/316	2,13	0,80-5,71	0,13109
dans les 48h	54/238	4,49	2,54-7,93	0,00000	66/316	2,06	0,79-5,37	0,13781
dans les 3 derniers jours	64/238	3,42	1,80-6,51	0,00017	90/316	2,58	1,12 - 5,94	0,02590
dans les 10 derniers jours	117/238	2,50	1,25-4,99	0,00953	156/316	2,27	1,00 - 5,16	0,04960
Lubrifiant								
dans les 48h	11/238				4/312	18,03	2,51-129,57	0,00405
dans les 72h	12/238				9/304	7,57	2,05-27,95	0,00238
Préservatif								
dans les 48h	10/238	4,18	0,46-37,63	0,20222	5/312			
dans les 72h	13/230	1,50	0,35-6,46	0,58276	8/304			
Sous-vêtement string								
le jour même	27/238				66/315	0,44	0,14-1,40	0,16505
dans les 48h	28/238				72/312	0,57	0,18-1,84	0,34846
dans les 72h	29/231				76/306	0,52	0,16-1,72	0,28237
Rapports anaux								
dans les 72h	0/230				9/303	1,38	0,19-9,89	0,74642

Etude DC (Suite)		Incidence LL-VMB								
		N	sans classe LI/LID HR	IC 95%	p-value	N	HR	IC 95%	p-value	
Covariables	Pénétration digitale	17/238				14/315	0,79	0,17-3,66	0,76450	
	le jour même	35/238	1,36	0,33-5,65	0,67506	20/312	0,70	0,15-3,35	0,65550	
	dans les 48h	44/230	0,83	0,28-2,50	0,74530	26/303	1,10	0,39-3,05	0,86046	
	dans les 72h	17/238				10/315	1,09	0,52-2,30	0,82196	
	Rapports oraux	33/238	0,62	0,15-2,50	0,50215	18/312	2,18	0,96-4,95	0,06348	
	le jour même	40/230	0,52	0,26-1,02	0,05874	27/303	2,25	0,92-5,50	0,07649	
	dans les 48h	27/238	0,90	0,20-4,08	0,89308	61/315	1,04	0,48-2,22	0,92703	
	dans les 72h	49/238	1,50	0,58-3,89	0,40751	104/312	1,17	0,66-2,09	0,58963	
	Rapports vaginaux non protégés	60/230	1,43	0,64-3,19	0,38575	125/304	1,31	0,73-2,33	0,36245	
	le jour même	87/228	1,06	0,45-2,53	0,88801	210/300	1,94	0,79-4,77	0,14827	
HPV	85/220	1,54	0,64-3,70	0,33529	204/290	2,14	0,89-5,14	0,08906		
		<b>Rémission vers HL-VMB</b>								
Age	Plus de 40 ans	79/299				64/97	2,32	0,96-5,61	0,06225	
	30-39 ans	189/299				9/97	2,50	0,92-6,75	0,07163	
	18-29 ans	31/299				24/97	ref	-	-	
	Origine raciale	Africaine-Américaine	188/299	0,51	0,19-1,37	0,18032	62/97	0,97	0,53-1,78	0,92245
		Hispanique ou autre	30/299				3/97	0,29	0,15-0,56	0,00025
		Blanche	81/299				32/97	ref	-	-
	Contraception	Hormonale	55/299	1,37	0,29-6,57	0,69138	34/97	0,40	0,17-0,95	0,03709
		DIU	33/299	1,41	0,64-3,11	0,38873	0/97	ref	-	-
		Non-hormonale	211/299	ref	-	-	63/97	ref	-	-
	Menstruations	le jour même	58/241				15/97	2,38	1,06-5,36	0,03627
dans les 48h		68/299	0,12	0,02-0,92	0,04153	19/97	1,23	0,60-2,54	0,57432	
dans les 3 derniers jours		100/299	0,45	0,24-0,82	0,00948	28/97	1,06	0,43-2,57	0,90593	
dans les 10 derniers jours		167/299	0,50	0,28-0,89	0,01908	60/97	0,95	0,42-2,12	0,89681	

Etude DC (Suite)		Rémission vers HL-VMB							
		sans classe LI/LID			classe LI/LID				
Covariables	N	HR	IC 95%	p-value	N	HR	IC 95%	p-value	
Douches vaginales	le jour même	5/295	4,14	1,04-16,50	0,04398	5/94			
	dans les 48h	12/296	3,17	0,62-16,23	0,16584	8/94			
	dans les 72h	18/288	1,01	0,15-6,94	0,98873	8/93			
Lubrifiant	le jour même	8/295				6/94	0,46	0,19-1,11	0,08244
	dans les 48h	16/296				8/94	0,39	0,16-0,92	0,03215
	dans les 72h	23/288	1,11	0,14-9,02	0,91967	9/92	0,36	0,16-0,83	0,01660
Préservatif	le jour même	14/295	0,88	0,23-3,35	0,85026	2/94			
	dans les 48h	25/296	1,14	0,64-2,06	0,65470	4/94			
	dans les 72h	31/288	0,86	0,43-1,71	0,66544	5/93			
Sous-vêtement string	le jour même	59/295				8/94	0,53	0,18-1,58	0,25490
	dans les 48h	60/296				11/94	0,68	0,20-2,32	0,54159
	dans les 72h	61/291				13/92	0,49	0,23-1,07	0,07292
Pénétration digitale	le jour même	6/295				11/94	0,23	0,08-0,66	0,00582
	dans les 48h	11/296				14/94	0,45	0,17-1,22	0,11578
	dans les 72h	13/288				17/93	0,51	0,18-1,48	0,21760
Rapports oraux	le jour même	11/295				14/94	0,25	0,04-1,63	0,14727
	dans les 48h	17/296	0,86	0,25-2,98	0,80902	18/94	0,49	0,08-3,00	0,43672
	dans les 72h	23/288	1,70	0,55-5,25	0,35657	19/92	0,47	0,08-2,71	0,39667
Rapports vaginaux non protégés	le jour même	22/295	1,30	0,35-4,76	0,69577	33/94	0,47	0,28-0,79	0,00456
	dans les 48h	45/296	1,63	0,60-4,44	0,33664	48/94	0,76	0,37-1,54	0,44226
	dans les 72h	53/288	1,79	0,63-5,06	0,27539	60/92	1,10	0,52-2,32	0,80103
HPV	le jour même	191/273	0,96	0,34-2,67	0,93255	83/94	0,79	0,41-1,51	0,47040
	au dernier prélèvement	185/265	0,83	0,31-2,27	0,72196	80/90	0,84	0,46-1,54	0,57496

Quatorze femmes appartenaient à la classe LI/LID et 18 aux autres classes.

TABLE 21.4 – Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des *Lactobacillus* (LL-VMB) dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100), en stratifiant selon la classe.

Etude HMP-UMB		Incidence LL-VMB						
Covariables		sans classe LI/LID			classe LI/LID			
	N	HR	IC 95%	p-value	N	HR	IC 95%	p-value
Age								
Plus de 40 ans	190/1742	1,21	0,46-3,24	0,69792	71/823	0,70	0,33-1,47	0,34634
30-39 ans	729/1742	0,69	0,33-1,44	0,32835	243/823	0,59	0,28-1,21	0,14942
18-29 ans	823/1742	ref	-	-	509/823	ref	-	-
Origine raciale								
Africaine-Américaine	833/1742	1,37	0,71-2,65	0,35427	491/823	0,77	0,30-1,98	0,58181
Hispanique ou autre	218/1742	1,35	0,48-3,83	0,57243	26/823	1,73	0,70-4,31	0,23754
Blanche	691/1742	ref	-	-	306/823	ref	-	-
Contraception								
Hormonale	370/1416	0,48	0,25-0,94	0,03113	284/763	0,89	0,32-2,53	0,83333
DIU	67/1416	2,13	0,67-6,78	0,20193	0/763	ref	-	-
Non-hormonale	979/1416	ref	-	-	479/763	ref	-	-
Menstruations								
le jour même	295/1742	2,13	1,43-3,17	0,00018	137/823	1,96	1,13 - 3,41	0,017258
dans les 48h	344/1711	1,94	1,34-2,82	0,00050	170/810	1,74	1,02 - 2,94	0,040610
dans les 3 derniers jours	430/ 1647	1,93	1,35-2,75	0,00029	229/789	1,45	0,89-2,36	0,13632
Douches vaginales								
dans les 48h	11/1682	1,46	0,25-8,48	0,67082	5/805	ref	-	-
dans les 72h	14/1656	1,40	0,25-7,79	0,69918	7/799	ref	-	-
Lubrifiant								
le jour même	7/1712	7,82	2,90-21,07	0,00005	22/813	0,43	0,06-2,83	0,37668
dans les 48h	14/1668	5,25	2,54-10,84	0,00001	42/799	0,73	0,26-2,03	0,53995
dans les 72h	15/1643	2,25	0,97-5,23	0,05945	58/791	0,82	0,31-2,16	0,68087
Préservatif								
le jour même	29/1729	0,76	0,35-1,66	0,49395	42/822	1,53	0,54-4,29	0,42216
dans les 48h	53/1686	1,07	0,51-2,24	0,85941	78/804	1,25	0,51-3,05	0,62947
dans les 72h	78/1659	1,03	0,39-2,75	0,95154	100/798	1,37	0,56-3,36	0,48775
Sous-vêtement string								
le jour même	165/1723	0,89	0,35-2,29	0,81557	193/823	1,11	0,55-2,24	0,76298
dans les 48h	191/1682	0,83	0,35-2,02	0,68825	237/804	1,36	0,68-2,74	0,38614
dans les 72h	216/1654	0,83	0,35-2,02	0,68825	272/799	1,43	0,68-3,00	0,34504

Etude HMP-UMB (Suite)		Incidence LL-VMB					
Covariables	N	sans classe LI/LID		classe LI/LID		p-value	p-value
		HR	IC 95%	HR	IC 95%		
Rapports anaux							
le jour même	14/1729	0,66	0,12-3,65			0,63705	
dans les 48h	19/1686	1,15	0,38-3,44			0,80453	0,84943
dans les 72h	23/1657	1,88	0,76-4,68			0,17194	0,46523
Pénétration digitale							
le jour même	55/1727	1,38	0,58-3,28			0,46345	0,05452
dans les 48h	87/1683	1,18	0,56-2,47			0,65804	0,13270
dans les 72h	118/1656	1,15	0,61-2,19			0,66931	0,17258
Rapports oraux							
le jour même	51/1728	0,55	0,16-1,94			0,35630	0,84616
dans les 48h	77/1684	0,71	0,27-1,84			0,48134	0,40030
dans les 72h	103/1657	0,97	0,43-2,19			0,93998	0,22047
Rapports vaginaux non protégés							
le jour même	121/1728	0,90	0,46-1,76			0,75897	0,80804
dans les 48h	188/1685	1,03	0,61-1,75			0,90417	0,92542
dans les 72h	249/1659	0,96	0,60-1,53			0,86225	0,96353
Antibiotiques							
le jour même	3/1742	9,00	4,54-17,86			<0,00001	
au cours de l'étude	117/1742	0,81	0,46-1,49			0,50441	0,63233
<b>Rémission vers HL-VMB</b>							
Age							
Plus de 40 ans	196/1994	0,92	0,34-2,48			0,86515	0,00276
30-39 ans	626/1994	0,94	0,45-1,98			0,87765	0,03691
18-29 ans	1172/1994	ref	-			-	-
Origine raciale							
Africaine-Américaine	1526/1994	0,75	0,38-1,46			0,39238	0,00059
Hispanique ou autre	73/1994	1,47	0,64-3,39			0,36063	0,65088
Blanche	395/1994	ref	-			-	-
Contraception							
Hormonale	132/1738	1,11	0,69-1,79			0,65382	0,42229
DIU	144/1738	2,04	0,60-6,95			0,25579	-
Non-hormonale	1462/1738	ref	-			-	-
Menstruations							
le jour même	463/1994	0,82	0,54-1,23			0,33231	0,41023
dans les 48h	550/1970	0,93	0,65-1,33			0,68295	0,34642
dans les 3 derniers jours	675/1912	1,05	0,74-1,51			0,77292	0,41421

Etude HMP-UMB (Suite)		Rémission vers HL-VMB					
Covariables	N	sans classe LI/LID			classe LI/LID		
		HR	IC 95%	p-value	HR	IC 95%	p-value
Douches vaginales							
le jour même	19/1955	1,49	0,36-6,19	0,57959	0,48	0,30-0,76	0,00178
dans les 48h	31/1928	1,30	0,35-4,84	0,69417	0,46	0,29-0,72	0,00079
dans les 72h	44/1909	1,24	0,35-4,44	0,73926	0,48	0,30-0,76	0,00178
Lubrifiant							
le jour même	36/1935	0,31	0,04-2,50	0,27091	0,82	0,56-1,19	0,28831
dans les 48h	68/1910	0,94	0,39-2,26	0,89452	0,92	0,66-1,28	0,63212
dans les 72h	95/1888	1,09	0,48-2,48	0,84210	0,79	0,40-1,56	0,50370
Préservatif							
le jour même	70/1958	0,32	0,09-1,22	0,09596	1,15	0,61-2,16	0,66347
dans les 48h	66/1931	0,73	0,35-1,52	0,39639	1,48	0,90-2,46	0,12523
dans les 72h	116/1911	0,55	0,27-1,13	0,10375	1,85	1,18-2,89	0,00692
Sous-vêtement string							
le jour même	127/1952	1,68	0,78-3,61	0,18412	1,08	0,62-1,90	0,77667
dans les 48h	133/1924	1,58	0,78-3,23	0,20725	1,36	0,76-2,42	0,30262
dans les 72h	205/1906	1,50	0,69-3,24	0,30381	1,42	0,80-2,51	0,23198
Rapports anaux							
le jour même	21/1955	2,36	0,49-11,41	0,28408	0/219		
dans les 48h	37/1928	1,73	0,43-6,97	0,44367	1/212		
dans les 72h	50/1909	1,57	0,39-6,22	0,52257	2/209		
Pénétration digitale							
le jour même	95/1956	0,99	0,48-2,06	0,98041	1,41	0,77-2,58	0,26318
dans les 48h	179/1929	0,97	0,57-1,66	0,91161	1,08	0,56-2,06	0,81868
dans les 72h	245/1910	1,02	0,62-1,68	0,94390	1,15	0,62-2,15	0,65357
Rapports oraux							
le jour même	77/1957	0,81	0,30-2,22	0,68303	0,72	0,22-2,30	0,57431
dans les 48h	136/1929	0,83	0,39-1,76	0,62606	1,00	0,44-2,29	0,99727
dans les 72h	193/1911	0,83	0,47-1,47	0,51845	0,97	0,51-1,84	0,93231
Rapports vaginaux non protégés							
le jour même	178/1954	1,11	0,67-1,85	0,69086	0,44	0,19-1,05	0,06371
dans les 48h	305/1928	0,96	0,61-1,53	0,87303	0,69	0,36-1,32	0,25855
dans les 72h	409/1906	0,89	0,58-1,39	0,61769	0,78	0,37-1,67	0,52783
Antibiotiques							
le jour même	10/1994	1,56	0,18-13,32	0,68320	2/219		
au cours de l'étude	143/1994	0,75	0,35-1,61	0,46701	23/219	0,31-1,16	0,12772

Vingt-trois femmes appartenaient à la classe LI/LID, et 77 aux autres classes.



## Chapitre

# 22

## Discussion

### 22.1 Mise en perspective des résultats

Dans la littérature publiée, les facteurs associés au fait de transitionner vers une VB ont été largement étudiés. L'origine raciale/éthnique, le jeune âge, un faible niveau d'éducation, un nouveau partenaire sexuel, un nombre important de partenaires sexuels vie entière, la douche vaginale et la consommation d'alcool et de tabac sont tous associés à la VB tandis que la contraception à base d'oestrogènes et l'utilisation de préservatifs sont quelques-uns des rares facteurs négativement associés à la VB [89, 180–186]. Cependant, ces études se sont rarement penchées sur les expositions variant dans le temps, telles que les pratiques sexuelles et d'hygiène intime au quotidien et leurs effets immédiats sur la dynamique du microbiote vaginal.

De plus, malgré le fait que la VB soit diagnostiquée fréquemment dans des centres cliniques et associée à d'autres problèmes de santé, les facteurs associés à la clairance spontanée de la VB ou à la rémission de cette condition, i.e. le fait de transitionner vers un microbiote vaginal dominé par une espèce de *Lactobacillus* en l'absence de traitement de la VB, n'ont que très peu été étudiés. Une seule étude, de Taha et al. (2007), a montré que la détection de *Trichomonas vaginalis* et le fait d'avoir plusieurs partenaires sexuels sur une période étaient associés à une moindre clairance de la VB, tandis qu'un pH inférieur à 4.5 était associé à la clairance de la VB [187]. Cependant, le temps médian de clairance spontanée de la VB dans cette étude était de 4 mois.

Dans notre étude, nous avons utilisé la caractérisation moléculaire du microbiote vaginal pour mieux décrire la dynamique du microbiote. Nous montrons que les épisodes de VB moléculaire, définis comme un CST IV, peuvent être soit des transitions courtes durant en moyenne 2.2 jours (d'après l'étude HMP-UMB) pour des femmes présentant un microbiote vaginal dominé par une espèce de *Lactobacillus*, ou une condition durable (12 jours en moyenne dans l'étude HMP-UMB) au milieu de laquelle ces femmes présentent des transitions passagères vers des CST dominés par des *Lactobacillus*. Ces données posent évidemment la question du diagnostic



de la VB, de sa pertinence clinique et de l'évaluation de la récurrence de la VB. Contrairement à l'étude de Taha et al. (2007), notre étude se focalise sur les transitions courtes uniquement. Dans ces deux études longitudinales à échantillonnage fréquent, nous avons cherché à déterminer les facteurs associés aux transitions vers un CST IV et à la clairance de cet état.

Nous avons montré que les expositions variaient en fonction de la classe à laquelle appartient une femme, i.e. son CST dominant au cours de l'étude. De plus, les femmes des classes LI et LID (présentant un CST III la majeure partie du temps) fluctuaient beaucoup plus entre HL-VMB et LL-VMB que les femmes des classes LC, LG, DA, DB et DC, d'où une stratification sur cette classe. Cette approche est pertinente vis-à-vis des résultats de la littérature montrant que le CST III, comme le CST IV, est associé à l'infection par *C. trachomatis* [104, 142] et que *L. iners* présente des propriétés différentes des autres *Lactobacillus*, notamment une incapacité à produire de l'acide lactique D protégeant de l'infection [188, 189]. L'analyse des facteurs associés aux transitions entre HL-VMB et LL-VMB en stratifiant sur la classe des femmes a permis d'identifier les facteurs déterminants pour la classe LI/LID et pour les classes LC/LG/DA/DB/DC. Pour les femmes des classes LC/LG/DA/DB/DC, les menstruations apparaissent comme le facteur le plus déterminant, quelle que soit l'étude considérée, aussi bien dans l'incidence d'un état LL-VMB que dans la rémission vers un état HL-VMB. Ce résultat est concordant avec de précédentes études décrivant la diminution de *L. crispatus* et *L. jensenii* pendant les règles, et une augmentation de *G. vaginalis* et de manière surprenante de *L. iners* [144, 190]. Chez les femmes de la classe LI/LID, les règles semblent également jouer un rôle, bien que moins évident, rejoignant ainsi l'observation de l'étude sus-mentionnée du rôle ambivalent de *L. iners* pendant les règles.

D'autres facteurs sont apparus comme associés aux transitions de HL-VMB vers LL-VMB et de LL-VMB vers HL-VMB, tels que l'usage du lubrifiant dont l'effet est particulièrement délétère chez les femmes des classes LI et LID. Chez ces mêmes femmes, les douches vaginales sont négativement associées à une transition de LL-VMB vers HL-VMB (rémission) dans l'étude HMP-UMB, de même que l'origine Africaine-Américaine et un âge supérieur à 30 ans. L'origine ethnique Hispanique est également associée à une moindre probabilité de transition vers HL-VMB, cette fois dans l'étude DC. Dans deux études de Zhou et al. (2007) et de Ravel et al. (2011), les auteurs ont montré que les communautés vaginales dominées par des bactéries anaérobies étaient présentes dans 32% et 40% des femmes Africaines-Américaines contre 8% et 10% chez les femmes caucasiennes respectivement [42, 191], bien qu'il s'agisse d'études transversales ne pouvant prendre en compte les dynamiques. De même, Fettweis et al. (2014) ont montré que les femmes Africaines-Américaines présentaient un indice de diversité de Simpson plus élevé, même quand le microbiote vaginal contenait des *Lactobacillus* [192]. Quant à l'association entre douche vaginale et VB, elle a été suggérée dans plusieurs études comme un facteur de risque d'acquisition d'une VB [69, 183, 184], ainsi que dans l'étude "Douching Cessation" (dont les données ont été utilisées dans la présente analyse) précédemment publiée en utilisant le critère du score de Nugent [177]. Il est intéressant de noter cependant que ce facteur n'a pas été évoqué comme un facteur empêchant la rémission spontanée de la VB dans la littérature existante.

Enfin, nous avons montré que chez les femmes des classes LI et LID, l'usage du préservatif favorisait la rémission de la VB et que les rapports sexuels non protégés empêchaient cette rémission. Dans la littérature, aucune étude à notre connaissance n'a identifié ce facteur comme un facteur important dans la rémission de la VB, et concernant son rôle dans l'incidence de la

VB les résultats sont contradictoires. Certaines études ont montré une association entre usage du préservatif et moindre risque de VB incidente [193, 194], tandis que d'autres non [195]. Dans nos deux études, il est intéressant de noter que les autres pratiques sexuelles semblent avoir un rôle très limité dans l'incidence et la rémission d'un état LL-VMB.

## 22.2 Limites

Ces analyses présentent plusieurs limites. Tout d'abord, bien que le schéma d'étude soit similaire dans les deux études, l'étude DC manquait de puissance statistique pour détecter d'autres potentielles associations. De plus, les populations d'études ne sont pas parfaitement comparables. Les femmes ayant participé dans l'une ou l'autre des deux études ne présentent probablement pas le même profil de risque. Troisièmement, la prise d'antibiotiques était fréquemment rapportée par les femmes de l'étude HMP-UMB et il est possible que cette exposition ait fortement affecté la composition et la dynamique du microbiote vaginal à court et long terme. Malgré tout, cette analyse apporte de l'information sur les dynamiques quotidiennes du microbiote vaginal et est la première à faire état de facteurs associés aux fluctuations dans les deux sens avec un intervalle d'échantillonnage aussi fréquent et le recours au séquençage génomique.

## 22.3 Conclusions

Nous pouvons identifier deux schémas de microbiote vaginal : les femmes ayant un microbiote vaginal stable (que ce soit CST IV ou pas) et les femmes présentant des fluctuations aiguës de courte durée en dehors et vers leur CST dominant. Il peut être hasardeux de traiter tous les échantillons CST IV de la même manière, sans prendre en compte le fait qu'ils représentent des transitions aiguës réversibles, un changement persistant ou une condition stable et pérenne. Notre taille d'échantillon et les schémas de ces deux études ne nous ont pas permis de réaliser des analyses stratifiées pour ces différentes situations et d'étudier les dynamiques de long terme, mais la recherche devrait s'attacher à traiter séparément ces situations à l'avenir. Il a été suggéré que le CST IV était associé à une plus grande susceptibilité vis-à-vis des IST, mais sans considérer la durée et la fréquence de ces épisodes. Nos résultats suggèrent que les femmes font face à des fluctuations rapides qui ne sont pas drastiquement affectées par les pratiques sexuelles, mais des perturbations persistant dans le temps pourraient bien être essentielles en termes de santé sexuelle et reproductive. Il n'est pas clairement établi que le CST IV est intrinsèquement moins protecteur (que ce soit pour des femmes avec un CST IV stable ou pour celles qui expérimentent des transitions de courte durée vers celui-ci), ou si ce sont les fluctuations fréquentes en dehors et vers ce dernier qui sont un marqueur d'un dysfonctionnement du microbiote vaginal et donc d'une faible protection.

Notre étude confirme que les menstruations sont un facteur important vis-à-vis de l'incidence du CST IV - ou VB moléculaire - et suggèrent que l'usage du lubrifiant peut également être un facteur de risque, bien que plus de recherche soit nécessaire sur cet aspect. En stratifiant sur la classe, nous avons mis en évidence des facteurs liés à la clairance du CST IV distincts, justifiant ainsi une approche différencielle selon le CST dominant. Pour les femmes des classes LI et LID seules, nos analyses ont identifié l'utilisation du préservatif comme un facteur augmentant la probabilité de transitionner spontanément vers un état HL-VMB (non-CST IV),

et plusieurs facteurs tels que l'usage du lubrifiant, les douches vaginales, un âge supérieur à 30 ans et une origine raciale ou ethnique Africaine-Américaine et Hispanique semblaient être associés à une moindre probabilité de rémission.





---

## Conclusion

---



## Conclusions et perspectives

### 23.1 Discussion des résultats principaux

#### 23.1.1 Le microbiote vaginal : marqueur d'infections sexuellement transmissibles

##### Microbiote vaginal et infection prévalente par *Chlamydia trachomatis*

Dans les parties I et II, nous avons montré que les microbiotes vaginaux déficitaires en *Lactobacillus* étaient associés à l'infection prévalente par *C. trachomatis*, que ce soit dans des études utilisant le score de Nugent, les critères d'Amsel ou le séquençage du gène de l'ARNr 16S. Notre méta-analyse a permis de confirmer cette association, particulièrement forte dans les études se restreignant à des populations de femmes de moins de 40 ans. Les analyses que nous avons menées sur deux études, une en France et une aux Etats-Unis, confirment cette tendance, bien que les résultats n'aient pas été significatifs dans l'étude française par manque de puissance.

Bien que de précédentes études se soient concentrées sur le rôle délétère d'un microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus*, l'utilisation de la méthode du séquençage du gène de l'ARNr 16S dans les deux études nous a permis d'aller plus loin dans l'analyse du microbiote vaginal et de distinguer un type de microbiote particulier, lui aussi associé à l'infection prévalente par *C. trachomatis*, les communautés bactériennes dominées par *L. iners*. Il s'avère que le morphotype de *L. iners* se distingue des autres *Lactobacillus* en ce qu'il s'agit de bâtonnets plus courts et plus ronds, se confondant facilement avec les morphotypes de bactéries anaérobies strictes et facultatives retrouvées dans le vagin dans le cas d'un score de Nugent élevé. Les heatmaps des abondances relatives bactériennes chez les femmes des deux études montrent que *L. iners* partage fréquemment son milieu avec des bactéries anaérobies strictes ou facultatives telles que *G. vaginalis* ou *A. vaginae*. Par ailleurs, même en l'absence d'infection, nous avons montré dans l'étude CHARM (partie III) figure 17.12b page 116) et dans les études DC et HMP



(partie IV) que des transitions pouvaient survenir facilement entre les CST III (dominés par *L. iners*) et CST IV (absence de *Lactobacillus* et large éventail de bactéries anaérobies), montrant une porosité entre les deux types de microbiote vaginal. Enfin, des travaux menés par l'équipe de Jacques Ravel auxquels j'ai participé ont montré que seul l'acide lactique D était efficace contre l'infection par *C. trachomatis* et que *L. iners* était justement déficient en acide lactique D et ne produisait que de l'acide lactique L [189]. Ces arguments convergent vers un déficit de protection associé à un microbiote vaginal dominé par cette espèce de *Lactobacillus*. Epidémiologiquement, cette association entre CST III et infection prévalente par *C. trachomatis* a également été démontrée par les mêmes méthodes de séquençage moléculaire dans une étude aux Pays-Bas [104], lorsque le CST I (dominé par *L. crispatus*) est pris comme référence.

L'identification de ces deux types de communautés bactériennes vaginales comme des microbiotes "à risque" présente un intérêt pour le diagnostic de l'infection par *C. trachomatis*, une infection asymptomatique dans 30 à 90% des cas [18]. Comme des tests par amplification d'acides nucléiques efficaces existent déjà, le *monitoring* du microbiote vaginal ne présente d'avantages qu'en ce qu'il peut également être un marqueur d'autres IST. Nous avons montré en partie I que les microbiotes vaginaux déficients en *Lactobacillus* étaient également associés aux infections par HPV. D'autres études ont montré que ces microbiotes vaginaux pouvaient également être associés aux infections par le VIH [51, 156–158] ou le HSV-2 [75, 159]. Ces résultats combinés montrent la pertinence d'un suivi clinique plus poussé pour les femmes faisant face de manière ponctuelle ou récurrente à un microbiote vaginal non-optimal ou sub-optimal, en particulier après traitement d'une IST afin de moduler le risque de réinfection.

### Microbiote vaginal et infection incidente par *Chlamydia trachomatis*

Même si le microbiote vaginal peut être un marqueur de l'infection prévalente, il n'est pas certain qu'un microbiote vaginal non-optimal précède et donc prédispose à l'infection. Dans l'analyse de sous-groupe de notre méta-analyse (partie I), nous avons montré que cette association entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* (VB selon le score de Nugent ou les critères d'Amsel) et infection par *C. trachomatis* se retrouvait dans des études où le microbiote vaginal était évalué en amont de l'infection incidente [82, 92, 96]. Une étude aux Pays-Bas portant sur des cas incidents d'infection par *C. trachomatis* a montré que les communautés vaginales dominées par *L. iners* étaient plus à même de favoriser l'acquisition de *C. trachomatis* [142].

L'essai de prévention interventionnel i-Predict (*Prevention of diseases induced by C. trachomatis*) mis en place en France en parallèle de ce travail de thèse a comme objectif de déterminer si le dépistage et le traitement précoce chez les jeunes femmes des infections génitales à *C. trachomatis* réduit l'incidence cumulative des IGH à 24 mois [146]. L'un des objectifs secondaires de cette étude consiste à caractériser le microbiote vaginal dans des prélèvements vaginaux semestriels pendant 2 ans afin d'étudier l'association entre composition du microbiote vaginal et infections prévalentes ou incidentes par *C. trachomatis* en utilisant la méthode de caractérisation par séquençage du gène de l'ARNr 16S. Par ailleurs, par son schéma d'étude cet essai permettra de clarifier la dynamique du microbiote vaginal après infection par *C. trachomatis* et l'association entre composition du microbiote vaginal et clairance naturelle de l'infection.

### 23.1.2 Dynamique du microbiote vaginal

La VB est de moins en moins considérée comme une maladie, sauf lorsqu'elle est symptomatique, et correspond plus justement à un état non-optimal du microbiote vaginal [48]. La description des dynamiques de microbiote vaginal dans les études DC et HMP (partie IV) permet de voir que cet état peut être soit durable et stable ou avec de rapides transitions vers d'autres CST, soit transitoire lorsque le CST dominant est un CST à *Lactobacillus*. Cette condition étant parfois pérenne, la question du traitement par antibiotiques se pose. Au-delà même de la problématique de l'usage excessif des antibiotiques et de l'antibiorésistance, les taux de succès des traitements antibiotiques par imidazolés contre la VB (principale métronidazole ou secnidazole) sont décevants, atteignant difficilement 50 à 80% [165–170] et la récurrence de la VB est courante [171]. Si la VB n'est ni symptomatique ni handicapante, une prise en compte de l'état du microbiote vaginal pour les personnes à risque peut s'avérer plus judicieux dans la gestion clinique.

#### Effet des antibiotiques sur le microbiote vaginal

Dans le cas du traitement antibiotique pour l'infection par *C. trachomatis*, nous avons présenté dans la partie III les effets d'un traitement par azithromycine 1g *per os* sur le microbiote vaginal. Nous avons montré que la prise de cet antibiotique favorisait l'évolution vers un microbiote vaginal de type CST III ou IV, soit des microbiotes vaginaux potentiellement à risque vis-à-vis de l'infection par *C. trachomatis* (et donc vis-à-vis de la réinfection), et d'autres IST. S'il ne se vérifie pas nécessairement au niveau individuel, ce schéma se traduit dans les fréquences observées des CST au niveau populationnel, avec notamment une sur-représentation du CST III durable dans le temps (9 mois). Ce faisant, les femmes acquièrent ou conservent un microbiote vaginal les maintenant à risque après traitement de l'infection. D'avantages d'études sur les effets d'autres antibiotiques pris pour d'autres indications sur le microbiote vaginal sont absolument nécessaires, par exemple dans le cas des infections urinaires. Des stratégies de restauration du microbiote vaginal après antibiothérapie sont à envisager.

#### Effet des expositions sexuelles et pratiques sur le microbiote vaginal

Nous avons exploré la contribution de différentes expositions sexuelles et pratiques gynécologiques dans les dynamiques observées du microbiote vaginal dans deux études prospectives américaines. Les données de littérature indiquaient un possible rôle des menstruations, de l'usage des préservatifs et des rapports sexuels sur les fluctuations entre microbiotes dominés par des *Lactobacillus* et microbiotes déficients en *Lactobacillus* [144, 172–176]. Nous avons pu confirmer l'effet des menstruations dans les deux études et de celui du lubrifiant sur le risque de transition vers un état déficient en *Lactobacillus*, et le rôle potentiellement important de l'usage du préservatif dans la rémission vers un état dominé par des *Lactobacillus*.

L'observation des schémas de fluctuation indique que des transitions spontanées vers des états dominés par des *Lactobacillus* sont fréquentes. L'étude de ces facteurs dans la probabilité de rémission spontanée vers un état dominé par des *Lactobacillus* apporte un éclairage sur ces schémas fluctuants.

## 23.2 Perspectives en santé publique

### 23.2.1 Vaginose bactérienne et santé sexuelle et reproductive

Malgré de nombreuses et diverses stratégies pour mieux contrôler les IST, le nombre de cas de certaines IST, notamment l'infection par *C. trachomatis*, continue d'augmenter partout dans le monde, y compris là où de telles stratégies sont accessibles [2]. Ce constat est d'autant plus étonnant pour l'infection par *C. trachomatis* que des méthodes diagnostiques fiables et sensibles existent et que les traitements antibiotiques contre cette infection montrent une efficacité de plus de 95% [31, 150]. Trois autres caractéristiques de cette infection attirent l'attention :

- un taux élevé de réinfection [14, 15, 17]
- un taux de transmission modéré, entre 12 et 25% [11]
- un taux de clairance naturelle d'environ 50% au bout d'un an [13]

Ces trois caractéristiques laissent penser que d'autres facteurs pourraient moduler le risque d'acquisition ou de réacquisition de l'infection ainsi que la durée de l'infection. A cela s'ajoute le fait que seules 10% des infections génitales basses vont se compliquer en IGH [20, 21], et que là aussi, d'autres facteurs pourraient être déterminants (figure 23.1). Le microbiote vaginal est l'un des facteurs étudiés pour sa capacité à produire de l'acide lactique pour faire baisser le pH vaginal et des bactériocines [110, 196].

Les résultats d'association entre VB et infection prévalente par *C. trachomatis* indiquent que la VB, en plus d'être une condition qui peut être problématique pour les femmes si elle est symptomatique, peut également être un marqueur de l'infection. Il devient donc opportun de dépister la VB, d'autant qu'elle serait également associée à d'autres IST et conditions cliniques, comme la prématurité [197], les fausses couches [198], les faibles taux de succès de fécondation *in vitro* [199, 200], entre autres. Détecter la VB et instaurer un suivi plus régulier des femmes qui présentent une VB récurrente pourrait constituer une stratégie intéressante pour le contrôle des IST et des conditions de santé sexuelle et reproductive évoquées. De plus en plus d'études s'intéressent à l'association entre VB et infection incidente ou condition clinique incidente, ce qui pourrait avoir de grandes implications sur le dépistage de la VB afin de prévenir la survenue de ces complications. Par exemple, si la VB module le risque d'acquisition de l'infection par *C. trachomatis*, cela pourrait justifier un ciblage de la stratégie de dépistage sur les populations considérées comme "à risque", notamment celles dont la composition du microbiote vaginal les prédispose à l'infection. Le ciblage du dépistage peut permettre de rendre la stratégie de dépistage plus coût-efficace. Cette question pourrait être étudiée grâce à la modélisation mathématique des différentes stratégies, à laquelle s'ajoute ensuite un volet économique.

En utilisant le séquençage du gène de l'ARNr 16S bactérien, nous confirmons l'association entre CST IV et infection prévalente de *C. trachomatis*, et donc la possibilité de suivre de plus près les personnes présentant un CST IV (aussi dénommée VB moléculaire [48]), puisque le CST IV et les bactéries associées sont également des biomarqueurs de l'infection prévalente (des biomarqueurs beaucoup plus sensibles que la VB déterminée par score de Nugent ou critères d'Amsel [201]). Cela dit, il est encore prématuré de penser une application directe du séquençage en santé publique du fait du coût de cette technologie. Si d'autres conditions de santé apparaissent elles aussi liées à la composition ou la structure du microbiote vaginal, alors cette caractérisation moléculaire devient intéressante malgré son coût.

### 23.2.2 L'écologie microbienne en santé publique

Les résultats de cette thèse, qui se fondent sur l'utilisation de la technologie du séquençage, présentent au moins deux avantages par rapport à la caractérisation clinique ou microbiologique du microbiote vaginal.

Premièrement, l'étude du microbiote vaginal par une approche plus écologique a permis de renverser l'idée selon laquelle la VB était nécessairement "anormale". De fait, dans nos études de nombreuses femmes présentent un CST IV et ce CST IV peut même être une condition pérenne avec de rares transitions temporaires vers d'autres CST, bien qu'il s'agisse d'un type non-optimal de microbiote vaginal vis-à-vis du risque d'infection.

Deuxièmement, le séquençage nous a permis d'aller beaucoup plus loin dans l'évaluation des profils à "risque", et notamment en distinguant un type de communauté bactérienne dominée par *L. iners* également associé à l'infection prévalente par *C. trachomatis*, contrairement aux autres communautés bactériennes dominées par des espèces de *Lactobacillus*. En cela la caractérisation moléculaire du microbiote vaginal est beaucoup plus fine que la caractérisation clinique ou microbiologique (critères d'Amsel ou score de Nugent).

### 23.2.3 Préservation de l'équilibre du microbiote vaginal

Enfin, l'approche écologique du microbiote vaginal permet de modifier nos représentations sur la santé vaginale. Nous comprenons désormais que le microbiote vaginal correspond à un équilibre dynamique et fragile, plus ou moins à risque vis-à-vis de certaines conditions cliniques ou infections et qu'il s'agit moins de "soigner" une dysbiose que de promouvoir des pratiques ne mettant pas en péril son équilibre et de trouver les moyens de favoriser un retour vers l'équilibre lorsqu'il y a effectivement déséquilibre ou risque de déséquilibre. Le développement des probiotiques est une piste intéressante pour favoriser ces équilibres et prévenir les déséquilibres, lorsqu'une perturbation est plausible (par exemple par l'usage d'antibiotiques dans le traitement d'une infection).

Il devient de plus en plus évident que certains facteurs sont associés à un microbiote vaginal dominé par des *Lactobacillus* (comme l'exposition aux oestrogènes par exemple), tandis que d'autres favorisent les déséquilibres transitoires ou persistants (comme les règles, la prise d'antibiotiques, la douche vaginale) (figure 23.1). D'autres facteurs restent à élucider, comme la question de l'origine des femmes, un élément identifié dans des études non-françaises, mais qui peut s'avérer être un proxy pour d'autres caractéristiques, notamment socio-économiques ou culturelles.

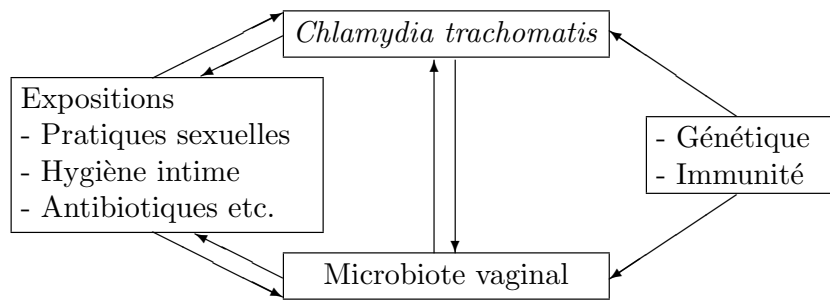


FIGURE 23.1 – Représentation schématique des associations entre expositions, infection par *Chlamydia trachomatis* et microbiote vaginal.

## 23.3 Orientations futures

La portée de ces résultats dépend également des orientations futures des programmes de recherche. Au moins deux pistes sont esquissées : l'étude de la dichotomie composition/fonctionnalité du microbiote vaginal, et l'interaction du microbiote vaginal avec d'autres caractéristiques de l'hôte, notamment des caractéristiques immunologiques et génétiques.

### 23.3.1 Composition versus fonctionnalité du microbiote vaginal

Nous avons vu que la composition du microbiote vaginal est associée à plusieurs problèmes de santé et module peut-être même le risque d'acquisition de ces conditions. Cependant, l'approche écologique du microbiote vaginal nous oblige à envisager la communauté bactérienne sous l'angle de la fonctionnalité qu'elle assure. Par exemple, des communautés bactériennes dominées par *L. crispatus*, *L. gasseri* et *L. jensenii* sont-elles équivalentes en termes de fonctions ? Certaines communautés diverses (CST IV) peuvent-elles assurer les mêmes fonctions que des communautés dominées par des espèces de *Lactobacillus* ? Les résultats que nous obtenons concernant *L. iners* combinés à ceux de la littérature [189] vont déjà en ce sens en suggérant que *L. iners* n'assure pas la même fonction protectrice que d'autres espèces de *Lactobacillus*, notamment parce que cette espèce ne produit pas d'acide lactique D.

Afin d'étudier la fonctionnalité des communautés bactériennes, de nouvelles technologies moléculaires sont disponibles, comme la transcriptomique soit l'étude des transcrits ARN des espèces bactériennes en présence, la protéomique soit l'étude des protéines produits par la communauté bactérienne, ou encore la métabolomique soit l'étude des métabolites retrouvés dans le tractus génital. Il est intéressant de constater que dans ces approches, la distinction entre les contributions respectives de la communauté bactérienne et de l'hôte tend à se réduire puisque l'hôte contribue également à ces équilibres fonctionnels par ses propres transcrits, protéines et métabolites.

### 23.3.2 Susceptibilité de l'hôte

Cette interaction hôte/microbiote vaginal fondamentale et la modulation de l'un par l'autre se retrouvent également dans l'étude des facteurs de susceptibilité à l'infection et à d'autres conditions de santé de l'hôte, comme dans l'immunologie ou la génétique (figure 23.1). Dans le cas de l'infection par *C. trachomatis*, de nombreuses cibles immunogénétiques sont suspectées d'être associées à l'infection [202]. Il est donc intéressant de se demander si cette modulation du risque pourrait ou non passer par le microbiote vaginal.

De plus, de nombreuses questions restent à élucider sur l'origine et la formation du microbiote vaginal. De nombreuses hypothèses sont à tester, notamment sur le rôle du microbiote vaginal maternel à la naissance, et sur les caractéristiques génétiques et immunologiques de l'individu.



---

# Annexes

---





## Annexe

# A

## Ayant trait à la partie I

### A.1 Article



## Systematic review

# The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis

J. Tamarelle<sup>1,\*</sup>, A.C.M. Thiébaud<sup>1</sup>, B. de Barbeyrac<sup>2,3</sup>, C. Bébéar<sup>2,3</sup>, J. Ravel<sup>4</sup>,  
E. Delarocque-Astagneau<sup>1,5</sup>

<sup>1</sup> Biostatistics, Biomathematics, Pharmacoepidemiology and Infectious Diseases (B2PHI), UVSQ, INSERM, Institut Pasteur, Université Paris-Saclay, Paris, France

<sup>2</sup> USC EA 3671 Mycoplasmal and Chlamydial Infections in Humans, University of Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>3</sup> French National Reference Centre for Bacterial STIs, CHU Bordeaux, Bordeaux, France

<sup>4</sup> Institute for Genome Sciences and Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD, USA

<sup>5</sup> AP-HP, Raymond-Poincaré Hospital, Garches, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 18 December 2017

Received in revised form

16 April 2018

Accepted 19 April 2018

Available online 3 May 2018

Editor: M. Leeflang

## Keywords:

*Chlamydia trachomatis*

Human papillomavirus

Meta-analysis

*Mycoplasma genitalium*

*Neisseria gonorrhoeae*

Sexually transmitted infection

Vaginal microbiota

## ABSTRACT

**Background:** The vaginal microbiota may modulate susceptibility to human papillomavirus (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections. Persistent infection with a carcinogenic HPV is a prerequisite for cervical cancer, and *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *M. genitalium* genital infections are all associated with pelvic inflammatory disease and subsequent infertility issues.

**Objectives:** To evaluate the association between these infections and the vaginal microbiota.

**Data sources:** The search was conducted on Medline and the Web of Science for articles published between 2000 and 2016.

**Study eligibility criteria:** Inclusion criteria included a measure of association for vaginal microbiota and one of the considered STIs, female population, cohort, cross-sectional and interventional designs, and the use of PCR methods for pathogen detection.

**Methods:** The vaginal microbiota was dichotomized into high-Lactobacillus vaginal microbiota (HL-VMB) and low-Lactobacillus vaginal microbiota (LL-VMB), using either Nugent score, Amsel's criteria, presence of clue cells or gene sequencing. A random effects model assuming heterogeneity among the studies was used for each STI considered.

**Results:** The search yielded 1054 articles, of which 39 met the inclusion criteria. Measures of association with LL-VMB ranged from 0.6 (95% CI 0.3–1.2) to 2.8 (95% CI 0.3–28.0), 0.7 (95% CI 0.4–1.2) to 5.2 (95% CI 1.9–14.8), 0.8 (95% CI 0.5–1.4) to 3.8 (95% CI 0.4–36.2) and 0.4 (95% CI 0.1–1.5) to 6.1 (95% CI 2.0–18.5) for HPV, *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *M. genitalium* infections, respectively.

**Conclusions:** Although no clear trend for *N. gonorrhoeae* and *M. genitalium* infections could be detected, our results support a protective role of HL-VMB for HPV and *C. trachomatis*. Overall, these findings advocate for the use of high-resolution characterization methods for the vaginal microbiota and the need for longitudinal studies to lay the foundation for its integration in prevention and treatment strategies.

**J. Tamarelle, Clin Microbiol Infect 2019;25:35**

© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

\* Corresponding author. J. Tamarelle, 2 avenue de la source de la Bièvre 78180 Montigny-le-Bretonneux, France.

E-mail address: [Jeanne.tamarelle@uvsq.fr](mailto:Jeanne.tamarelle@uvsq.fr) (J. Tamarelle).

## Introduction

Sexually Transmitted Infections (STIs) are a major health issue worldwide [1] and a cause of genital and reproductive morbidity. Human papillomavirus (HPV), *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* are four of the most prevalent genital infections. *Chlamydia trachomatis*, *N. gonorrhoeae* and *M. genitalium* are curable bacterial STIs. They affect predominantly young people and can result in long-term devastating complications.

In 2012, there were 127 million and 27 million adults living with *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* worldwide [2]. Both infections are mainly asymptomatic [3]. If left untreated, *C. trachomatis* infection can lead to pelvic inflammatory disease, ectopic pregnancy and tubal infertility [4]. Infection with *C. trachomatis* is also associated with pregnancy adverse outcomes such as chorioamnionitis [5], preterm delivery [6] and low birthweight [7]. *Mycoplasma genitalium* is an emerging STI. Its prevalence among low-risk and high-risk populations worldwide is estimated to be 2.0% and 7.3%, respectively [8]. It is thought to be associated with urethritis, cervicitis [9], pelvic inflammatory disease [10] and tubal infertility [11]. These elements combined with its high prevalence, close to that of *C. trachomatis*, makes it a subject of concern. Human papillomavirus infections are strongly associated with cervical cancer [12–15], in particular HPV genotypes 16 and 18. Up to 80% of women will be infected by HPV over their lifetime [16].

However, not all sexual contacts with these pathogens lead to infections, and not all infections evolve towards long-term complications, which suggest that factors such as the vaginal microbiota, host innate and adaptive immunity, pathogen fitness and load may modulate the natural history of these infections. Molecular and high-throughput sequencing of 16S rRNA gene amplicons has led to an improved and in-depth characterization of the composition of the vaginal microbiota [17–19]. These studies have identified different kinds of vaginal microbiota that are either dominated by one of four species of *Lactobacillus* (*Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus jensenii*) or characterized by a paucity of *Lactobacillus* spp. and a diverse set of strict and facultative anaerobes. The latter is associated with high Nugent score, a research tool used to diagnose bacterial vaginosis (BV). The Nugent score enumerates the number of *Lactobacillus*, *Gardnerella vaginalis* and curved Gram-negative rods on a Gram-stained vaginal smear. A score between 7 and 10 is indicative of BV (no *Lactobacillus*, but high number of *G. vaginalis* and curved Gram-negative rods morphotypes) whereas a score between 0 and 3 corresponds to normal microbiota (high *Lactobacillus* morphotypes) and a score between 4 and 6 indicates an intermediate microbiota. Clinically, BV is evaluated using the Amsel's criteria, which establish a positive diagnosis if at least three of the following clinical signs are present: thin grey homogeneous discharge, vaginal fluid pH > 4.5, release of a fishy amine odour from vaginal fluid when mixed with 10% potassium hydroxide (positive whiff test) and presence of clue cells on wet mount. Whichever way it is diagnosed, BV can be associated with reported odour, discharge and itching, but in many cases, can be asymptomatic. We hypothesize that the vaginal microbiota interacts with sexually transmitted pathogens in two forms: different vaginal microbiotas could contribute differentially to the physiopathology of genital infections and their long-term sequelae, and STI pathogens could influence the vaginal microbiota composition. This putative two-way biological interaction should therefore be reflected in a statistical association in both cross-sectional and longitudinal studies. Improved knowledge on these aspects could lay the foundation for the development of probiotics that may constitute a simpler and better prevention and/or restorative approach. Our

review constitutes a first step towards clarifying the interrelation between STI pathogens and the vaginal microbiota.

The objective of this review is to evaluate the statistical association between *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* and HPV infections, four of the most common STIs, and the vaginal microbiota, in both cross-sectional and longitudinal studies.

## Materials and methods

### Literature search

Medline and the Web of Science were searched from January 2000 to December 2016 (last search 1 January 2017) for relevant studies on association between vaginal microbiota and HPV, *C. trachomatis*, *M. genitalium* and *N. gonorrhoeae* infections.

The search terms used were ('human papillomavirus' OR '*Chlamydia trachomatis*' OR '*Neisseria gonorrhoeae*' OR '*Mycoplasma genitalium*') AND (\*genital OR vagin\*) AND ('microbiota' OR 'microbiome' OR 'vaginosis' OR 'lactobacill\*'). Citation lists of publications were hand searched for additional references.

Titles and abstracts were reviewed first by JT and EDA, and only relevant publications were selected for full reading. To be eligible for the analysis, full published articles had to fit the following inclusion criteria:

- association between one of the above mentioned infections and microbiota state, characterized by 16S rRNA gene amplicon sequencing, Nugent score [20], Amsel's criteria [21] or presence of clue cells only [22].
- human, female population
- cohort, cross-sectional, interventional designs
- methods for detection of STIs based on PCR.

Exclusion criteria were:

- human immunodeficiency virus (HIV) -positive population (unless stratified on HIV status) or proportion of HIV-positive participants >10% of total sample
- pregnancy
- literature reviews, letters and editorials
- sample size (<30).

### Data extraction

For each study, the following data were extracted: date of publication, authors, study design, study population, age range, sample size, study site, methods for microbiota characterization and STI diagnosis, measure of association or raw data, BV prevalence when applicable, and prevalence of STI of interest.

For this meta-analysis, we dichotomized the vaginal microbiota into two categories, namely low-*Lactobacillus* vaginal microbiota (LL-VMB) and high-*Lactobacillus* vaginal microbiota (HL-VMB). LL-VMB is characterized by a paucity of *Lactobacillus* and a wide array of strict and facultative anaerobes. This definition correlated well with the Nugent score 7–10 category and a positive Amsel's test, as well as with the presence of clue cells. HL-VMB corresponded to vaginal community state types dominated by either *L. crispatus*, *L. iners*, *L. gasseri* and *L. jensenii*, low Nugent score (0–6) and a negative Amsel's score.

### Statistical analysis

#### Measure of association

A random effects model assuming heterogeneity among the studies within the *metan* command in STATA 14.0 was used to

summarize the effect sizes. The effect sizes were odds ratios, relative risks, hazard ratios or incidence rate ratios. When an adjusted measure of association was available with details on confounders, this measure and its 95% CI was used for the meta-analysis rather than the raw estimate. When no measure of association was available, raw data were used to calculate an odds ratio with its 95% CI using the Mantel–Haenszel method. Estimates of association retrieved from the studies and their 95% CIs were displayed in forest plots.

#### Assessment of risk of bias and heterogeneity in included studies

For each STI considered in this review, funnel plots were performed to evaluate the existence of a publication bias. These plots were combined with Egger's tests. The Cochran's  $Q$  two-sided homogeneity test [23] and the  $I^2$  statistic were used to assess the heterogeneity in measures of association among the included studies. Subgroup analyses were performed when the  $Q$ -test was statistically significant at the 5% level or if the  $I^2$  statistic was >50%, to identify potential sources of heterogeneity. Cochran's  $Q$  two-sided heterogeneity test was also used to compare subgroups.

The methodological quality of selected studies as relevant to this review's research objective was assessed using the Newcastle–Ottawa scale, consisting of a 'star system', with a maximum of nine stars to be attributed (see [Supplementary material, Table S1](#)).

Sensitivity analyses were performed for *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* excluding two studies that displayed the Nugent score in three groups: 0–3, 4–6 and 7–10 and provided estimates of measure of association taking the 0–3 category as a reference

instead of 0–3 and 4–6 categories altogether ([24,25], see [Supplementary material, Fig. S1](#)).

## Results

### Search results

The search yielded 390 published articles from Medline and 664 from the Web of Science. After removal of duplicates and exclusion on the basis of the language or inappropriateness evaluated after reading titles and abstracts, 105 articles were left for full reading. We removed 72 articles because they did not fit the inclusion criteria. After adding six articles through cross-referencing, 39 articles were left for analysis ([Fig. 1](#)). Among these 39 articles, 11 used Amsel's criteria, 20 used Nugent score, three used the presence of clue cells and one article used both Amsel's criteria and Nugent score to characterize LL-VMB; four used 16S rRNA gene sequencing for vaginal microbiota characterization. Of the 39 selected studies, 19 were cohort studies and 20 were cross-sectional studies. As the association between vaginal microbiota and STI was not always the primary objective of the selected studies, the data were only available at baseline in 6 of the 19 cohort studies (cross-sectional data type). Longitudinal data on vaginal microbiota and STIs were available for 13 of the 19 cohort studies. Cohort studies allowed identifying incident cases of infection, but even with incident cases of infection, the vaginal microbiota was not always assessed before infection, but rather at the same visit as the incident infection, and was assessed after infection only in one study [26]. When the

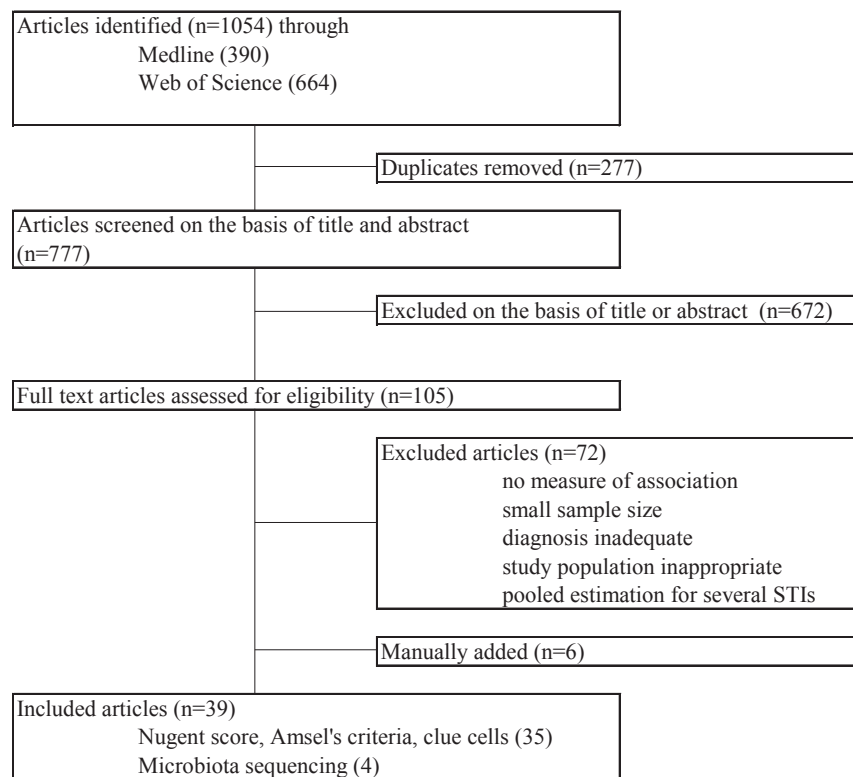
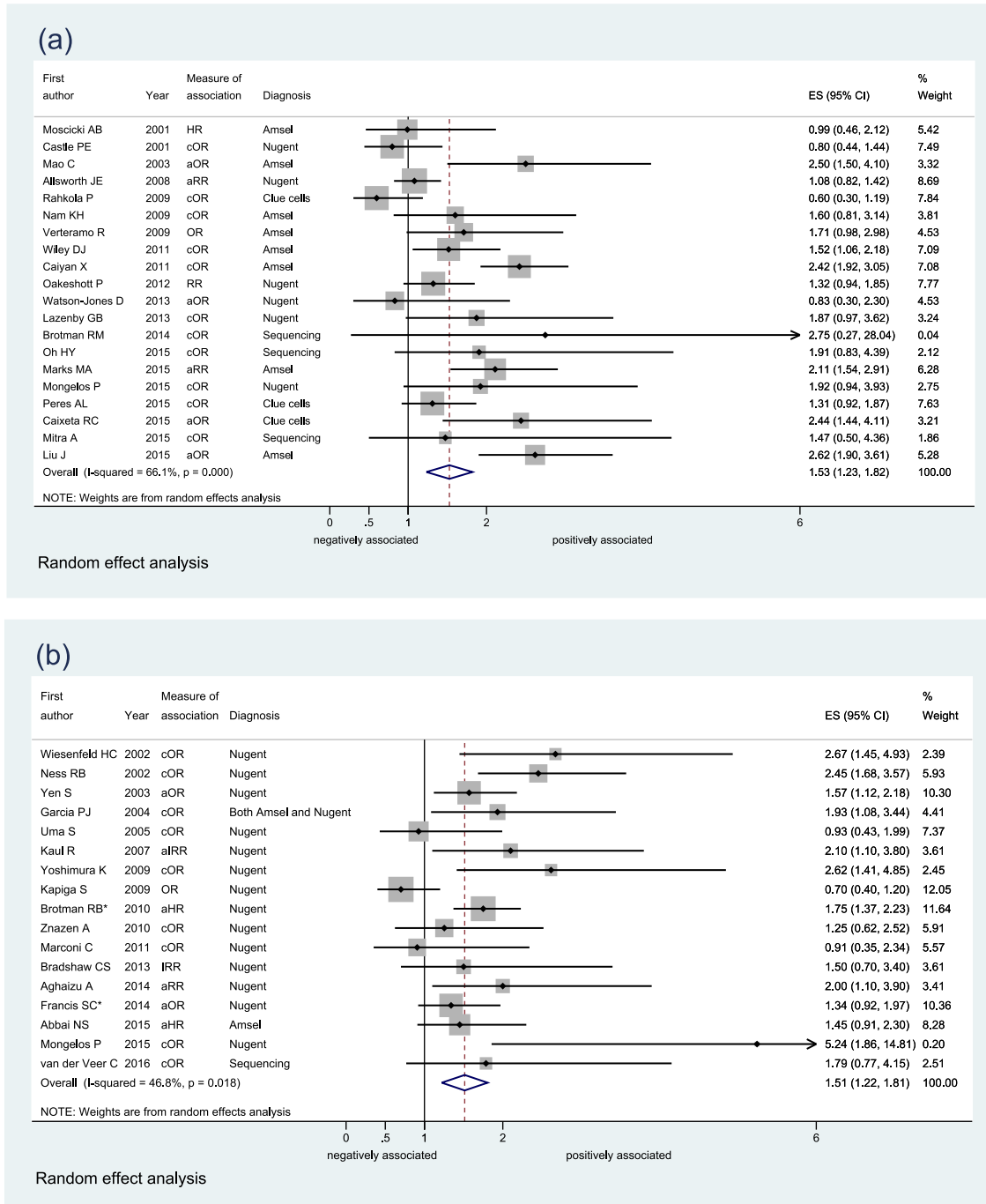


Fig. 1. Flow chart of selection process for article identification and inclusion. BV, Bacterial vaginosis.

vaginal microbiota was assessed before infection, the time lapse varied between 3 months and 2 years. A total of 20 articles were used to evaluate the association between vaginal microbiota and HPV ( $n = 20\ 022$  individuals), 17 for *C. trachomatis* ( $n = 12\ 810$ ), eight for *N. gonorrhoeae* ( $n = 8799$ ) and four for *M. genitalium* ( $n = 2894$ ) (see [Supplementary material, Table S2](#)).

#### STIs and LL-VMB

In the selected studies and the population studied, the proportion of women infected with HPV ranged from 9.9% to 79.5%, from 4.8% to 72.9% for *C. trachomatis*, from 0.7% to 9.9% for *N. gonorrhoeae*, and from 2.5% to 13.8% for *M. genitalium* (when



**Fig. 2.** Forest plots of association between low-*Lactobacillus* vaginal microbiota (LL-VMB) and (a) human papillomavirus (HPV), (b) *Chlamydia trachomatis* (Ct), (c) *Neisseria gonorrhoeae* (Ng), (d) *Mycoplasma genitalium* (Mg). OR, odds ratio; RR, relative risk; IRR, incident rate ratio; HR, hazard ratio; ES, effect size; CI, confidence interval. Adjusted measures are indicated by the a-prefix in front of the measure of association. ORs calculated from raw data are indicated by the c-prefix.

available either in cross-sectional studies or at baseline for longitudinal studies). Across all studies the proportion of women carrying LL-VMB ranged from 3.1% to 70.9%.

Overall association between vaginal microbiota and each STI

For HPV, measures of association with LL-VMB ranged from 0.60 (95% CI 0.30–1.19) to 2.75 (95% CI 0.27–28.04). Six studies out of 20

showed a significant association between vaginal microbiota and HPV infection. These studies were significantly heterogeneous ( $p < 0.001$ ). For *C. trachomatis*, measures of association with LL-VMB ranged from 0.70 (95% CI 0.40–1.20) to 5.24 (95% CI 1.86–14.81). Nine studies out of 17 showed a significant association. Q-test for heterogeneity showed a significant result as well ( $p 0.018$ ) (Fig. 2). Potential sources of heterogeneity were explored in subgroup analyses (see below). Selected studies for *N. gonorrhoeae* were not

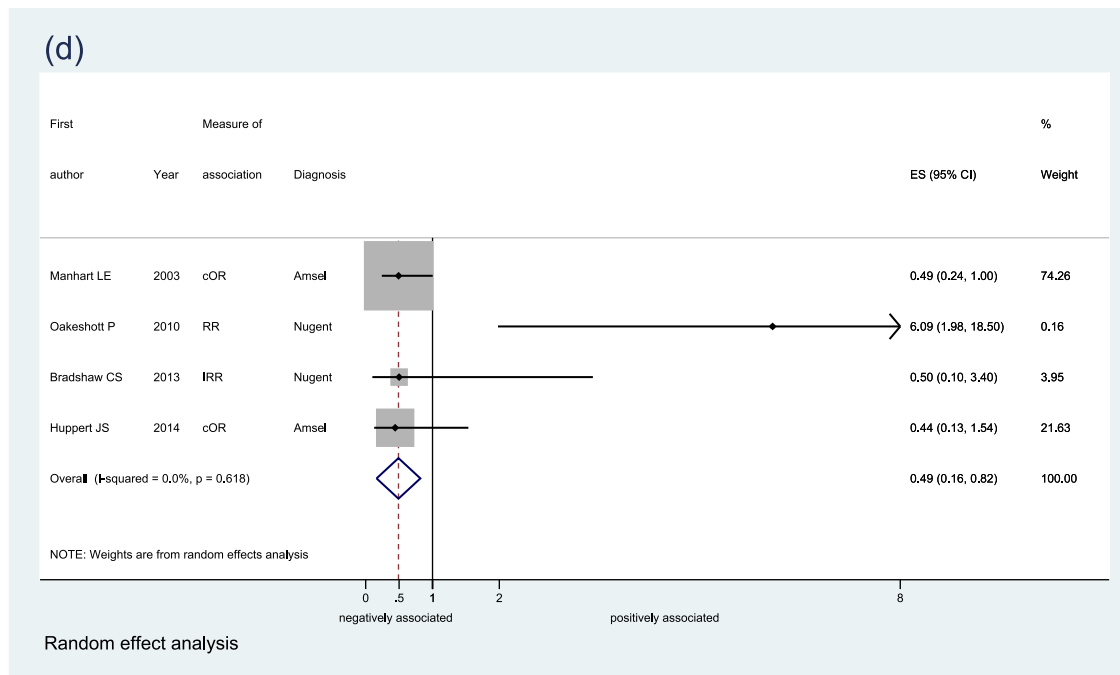
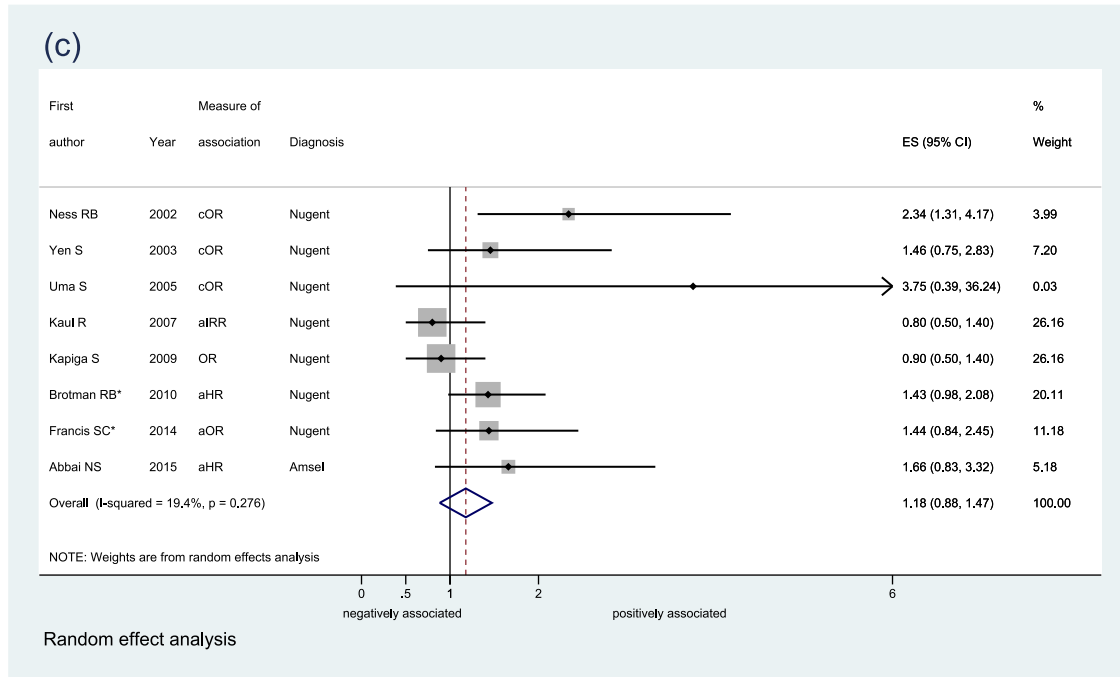


Fig. 2. (continued).

significantly heterogeneous ( $p = 0.276$ ), and measures of association ranged from 0.80 (95% CI 0.50–1.40) to 3.75 (95% CI 0.39–36.24) with only one study showing a significant association. For *M. genitalium*, three studies provided similar estimates of association,

ranging from 0.44 (95% CI 0.13–1.54) to 0.50 (95% CI 0.10–3.40), but one study reported an estimate of association of 6.09 (95% CI 1.98–18.50).

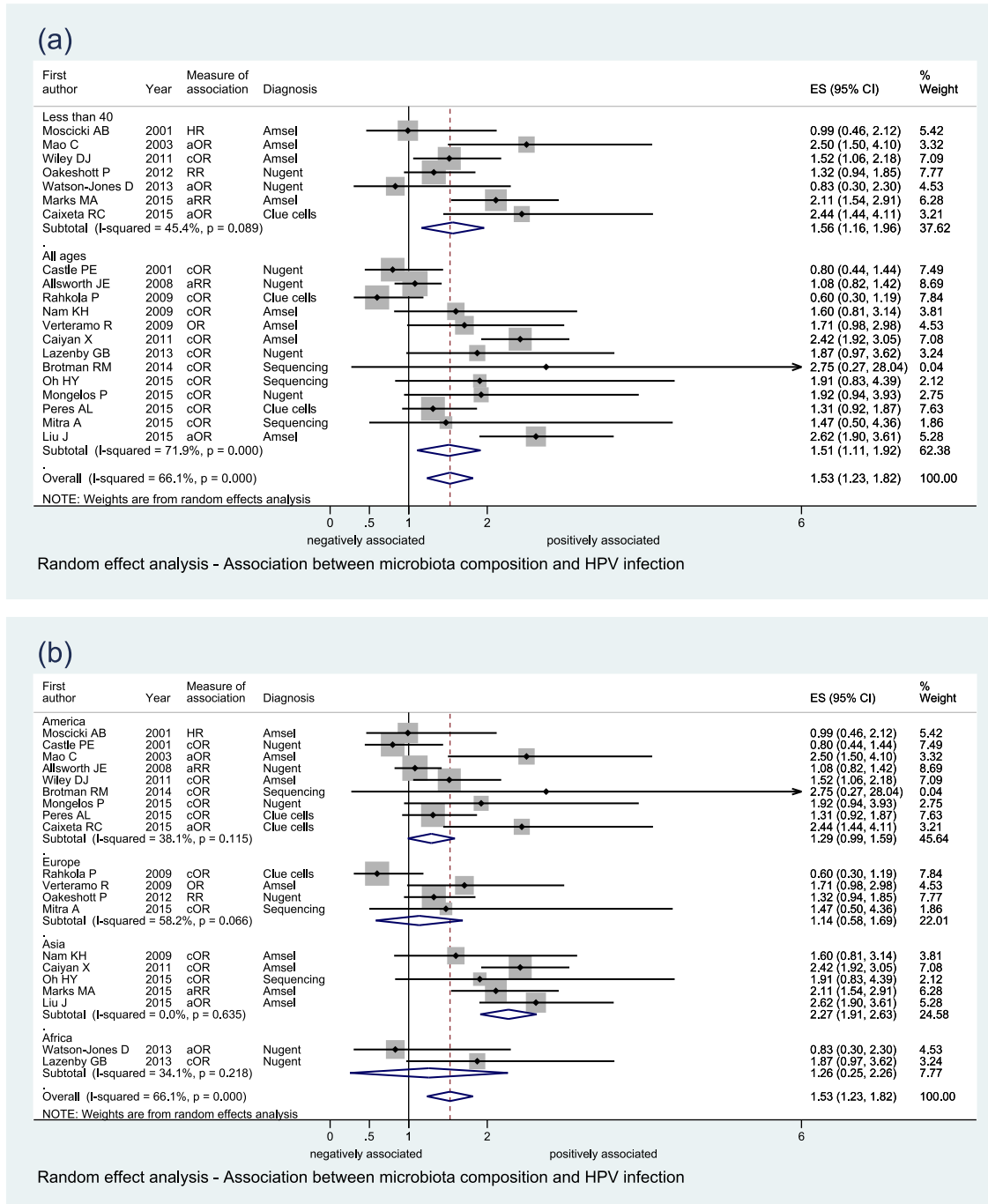


Fig. 3. Subgroup analysis of association between low-*Lactobacillus* vaginal microbiota (LL-VMB) and human papillomavirus (HPV) by (a) age group, (b) study site, (c) odds ratio (OR) versus other effect size measures, (d) adjusted versus non-adjusted effect sizes, (e) vaginal microbiota assessed before infection versus at the same time as infection and (f) diagnosis method.



For both *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*, sensitivity analyses excluding studies that provided estimates of association taking only the Nugent 0–3 category as a reference instead of all individuals in Nugent score 0–3 and 4–6 categories pooled together, did not modify the results significantly (see Supplementary material, Fig. S1).

**Subgroup analysis of association between vaginal microbiota and HPV or *C. trachomatis***

For *C. trachomatis*, when measures of association were restricted to younger ages (<40 years old), results were less heterogeneous

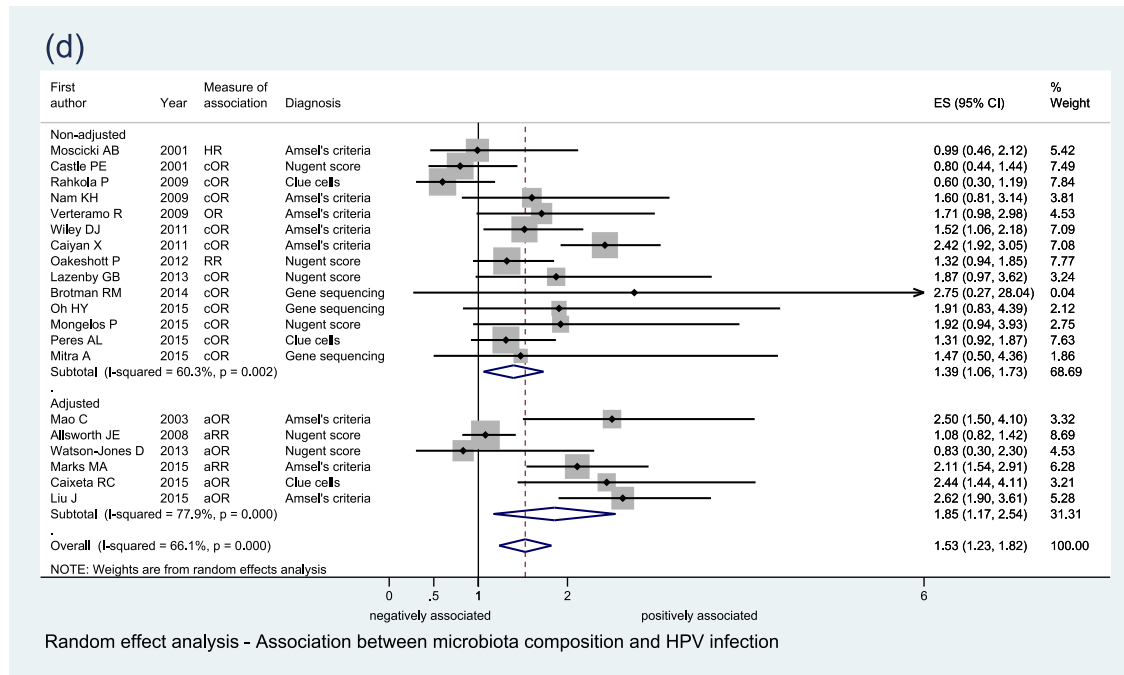
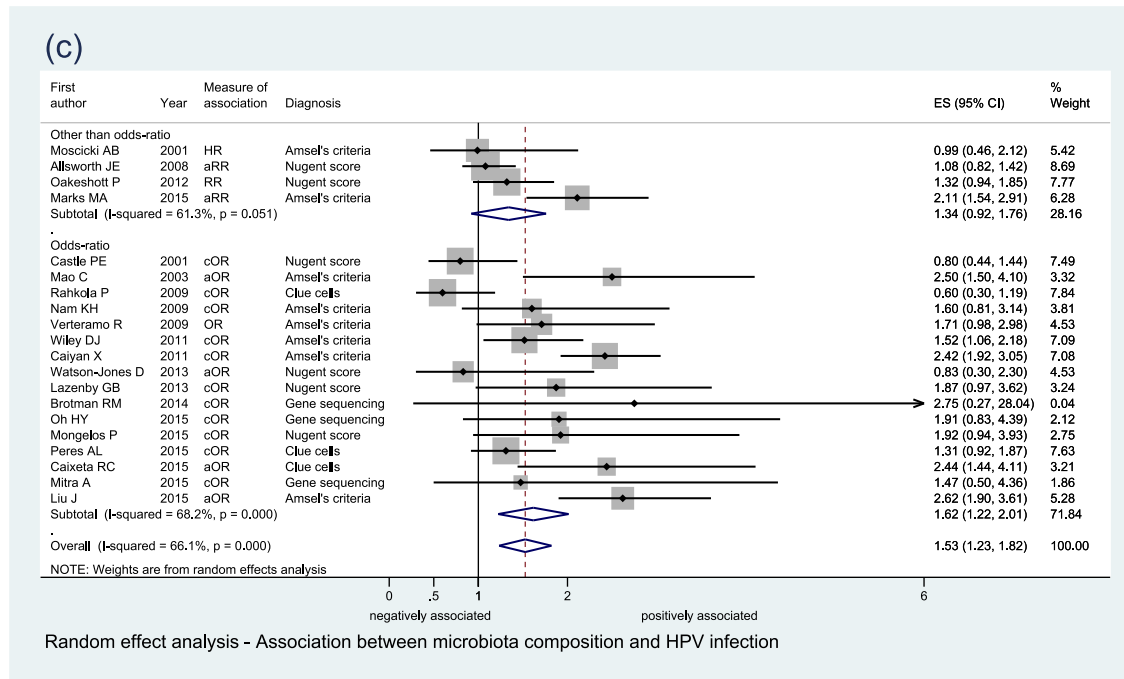


Fig. 3. (continued).

and measures of association were consistent across studies, suggesting a positive association between LL-VMB and *C. trachomatis* infection. Difference in study sites (geographical area) was an important contributor to the heterogeneity for both HPV and *C. trachomatis* (Figs. 3 and 4). Though stratification by study sites resulted in smaller clusters of studies and therefore less statistical power, measures of association were more consistent. For HPV,

studies conducted in Asia showed higher measures of association than elsewhere, and results from these studies were consistent ( $I^2 = 0.0\%$ ,  $p = 0.635$ ).

As selected studies provided different types of measures of association (odds ratio, relative risk, hazard ratio or incidence rate ratios) that are not perfectly comparable, we assessed whether the type of measure of association could partly explain the observed

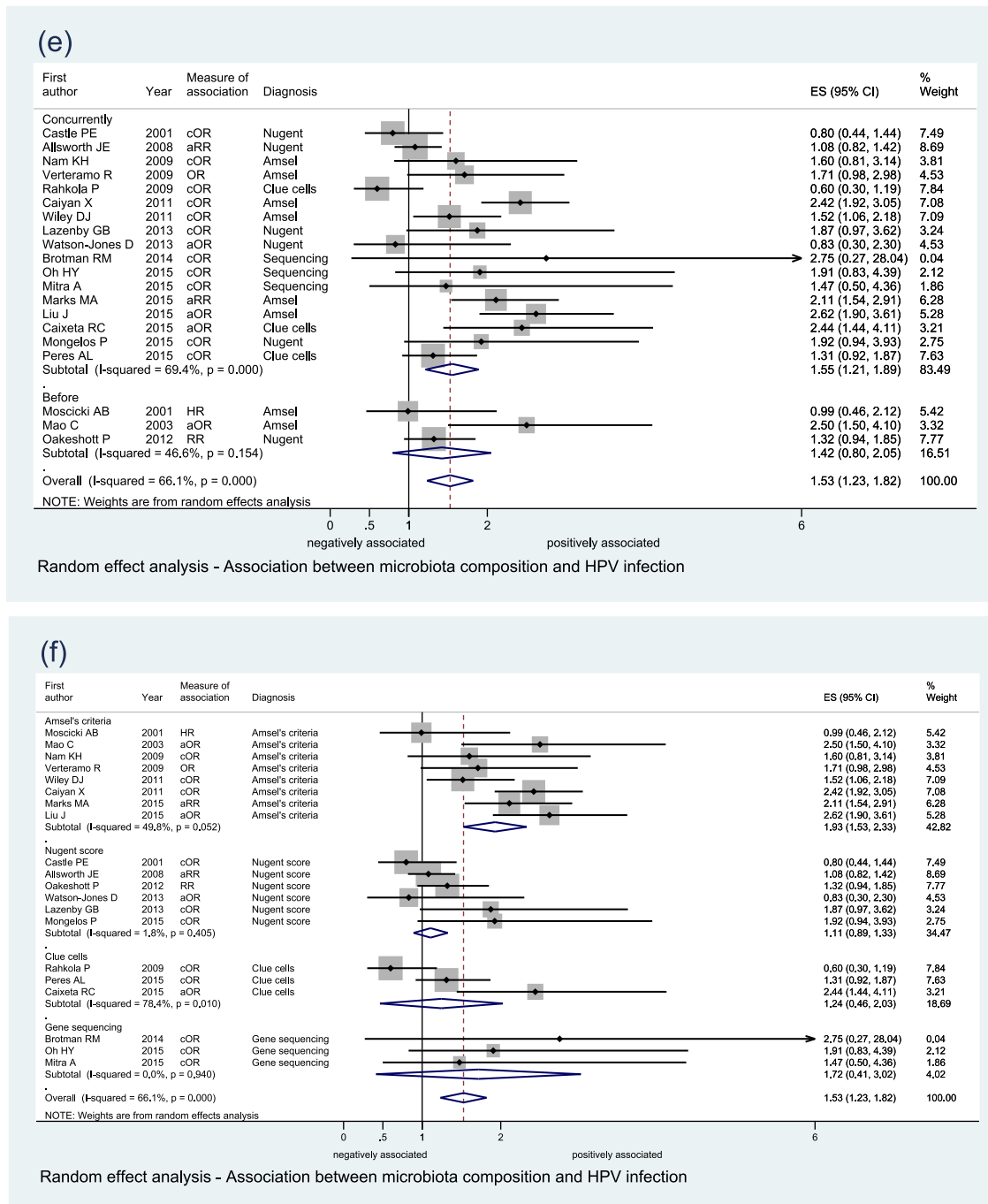


Fig. 3. (continued).

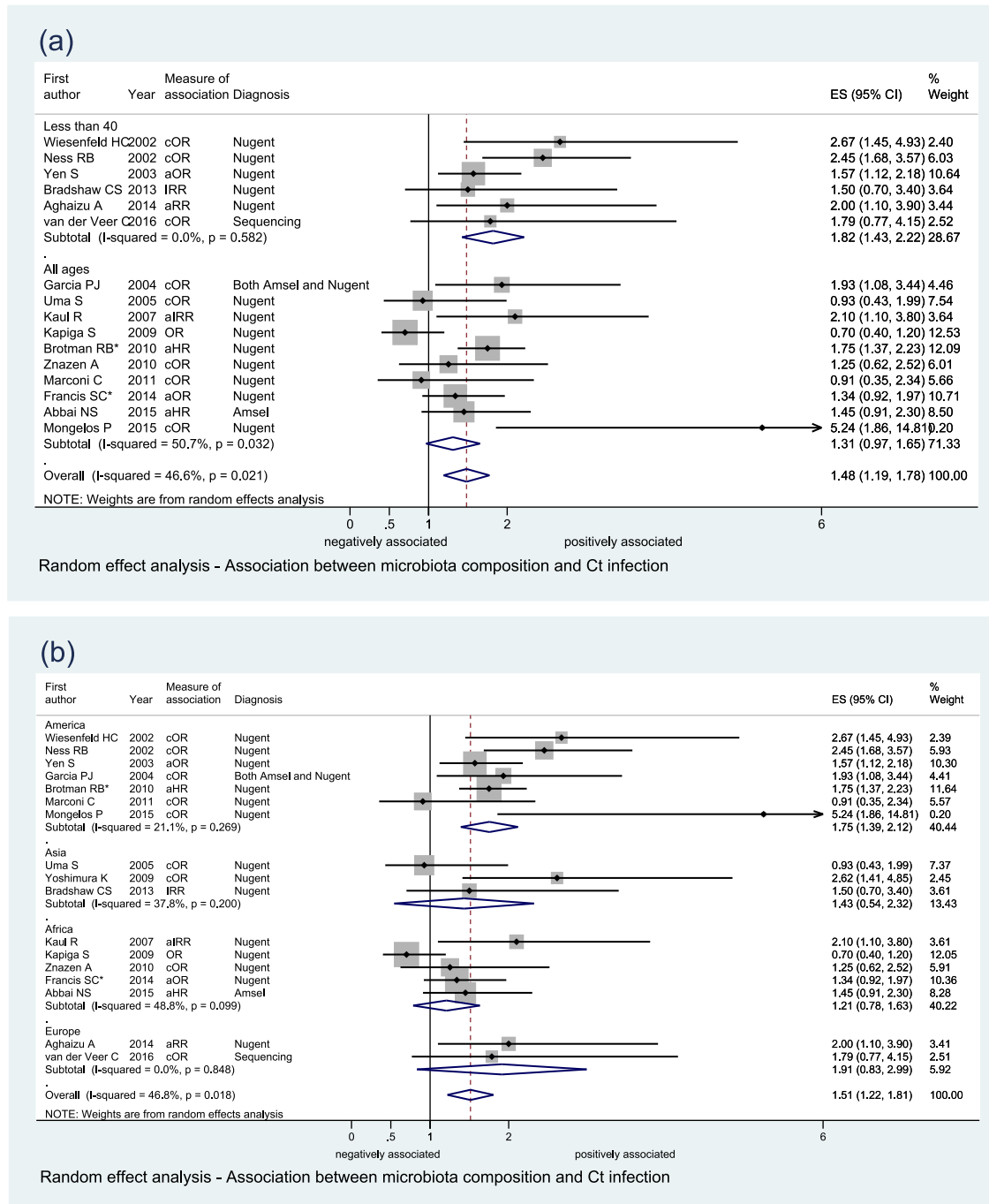


Fig. 4. Subgroup analysis of association between low-Lactobacillus vaginal microbiota (LL-VMB) and Chlamydia trachomatis by (a) age group, (b) study site, (c) odds ratio versus other effect size measures, (d) adjusted versus non-adjusted effect sizes, (e) vaginal microbiota assessed before, after and at the same time as infection and (f) diagnosis method.

heterogeneity among studies. For both HPV and C. trachomatis, no clear effect of the type of measure of association on the heterogeneity could be highlighted. Measures of association were slightly higher for adjusted measures for both HPV and C. trachomatis compared with non-adjusted measures, and only consistent with one another for C. trachomatis. Measures of association did not

differ between studies where the vaginal microbiota was assessed before STI and studies where both were assessed at the same time, results were still highly heterogeneous. Additionally, a subgroup analysis on incident versus prevalent cases of infection is presented in Supplementary material (Fig. S3) and shows no clear effect of this factor.

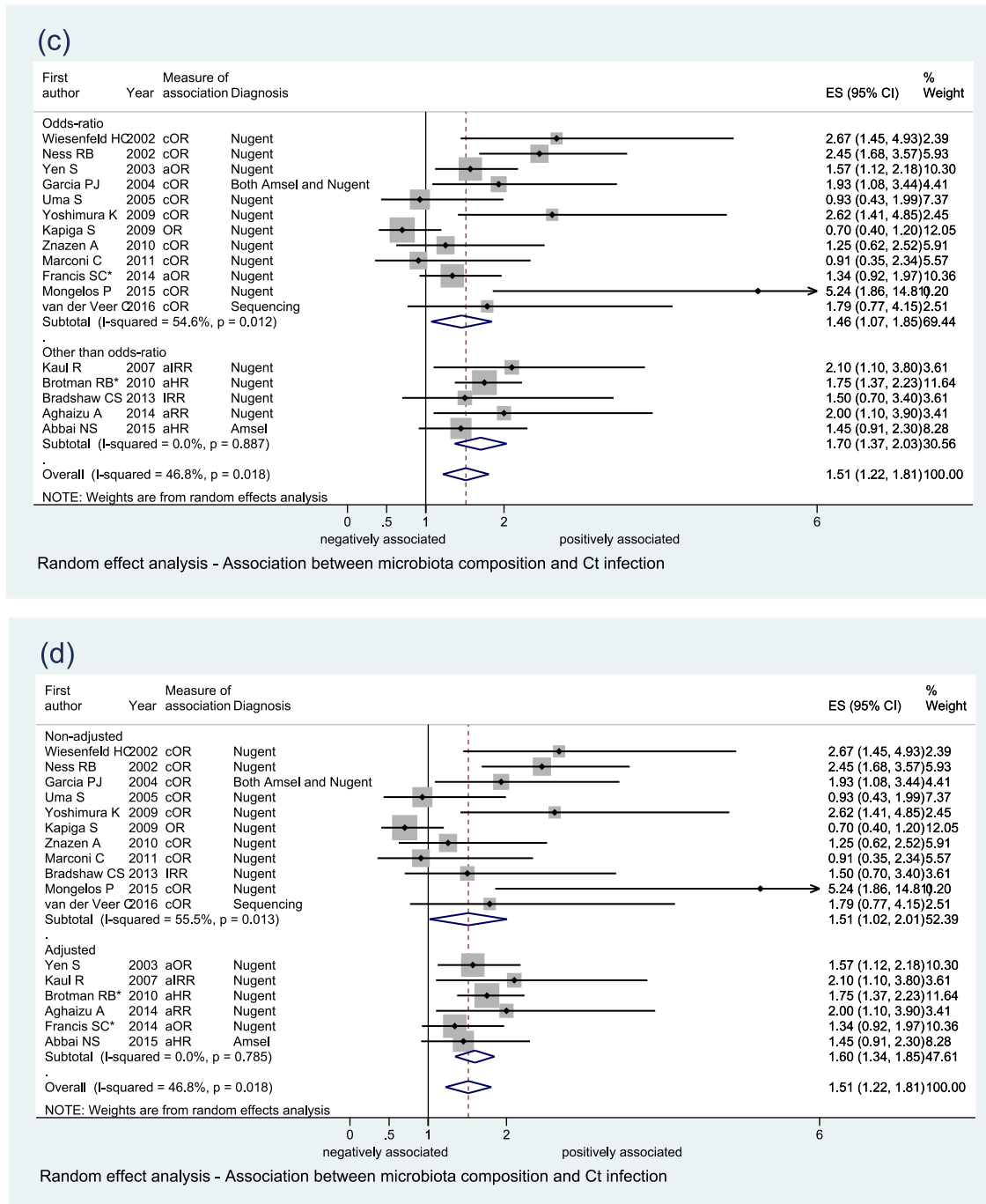


Fig. 4. (continued).

Lastly, the vaginal microbiota characterization method did not explain heterogeneity across studies for *C. trachomatis*. When restricted to studies that used Nugent score, results were still highly heterogeneous. However, for HPV, a trend for higher measures of association was observed when the method used was Amsel's criteria.

#### Risk of bias

Funnel plots and Egger's tests were performed for each STI and no publication bias could be highlighted for any of the considered STIs (see [Supplementary material, Fig. S2](#)), graphically or by means of Egger's test.

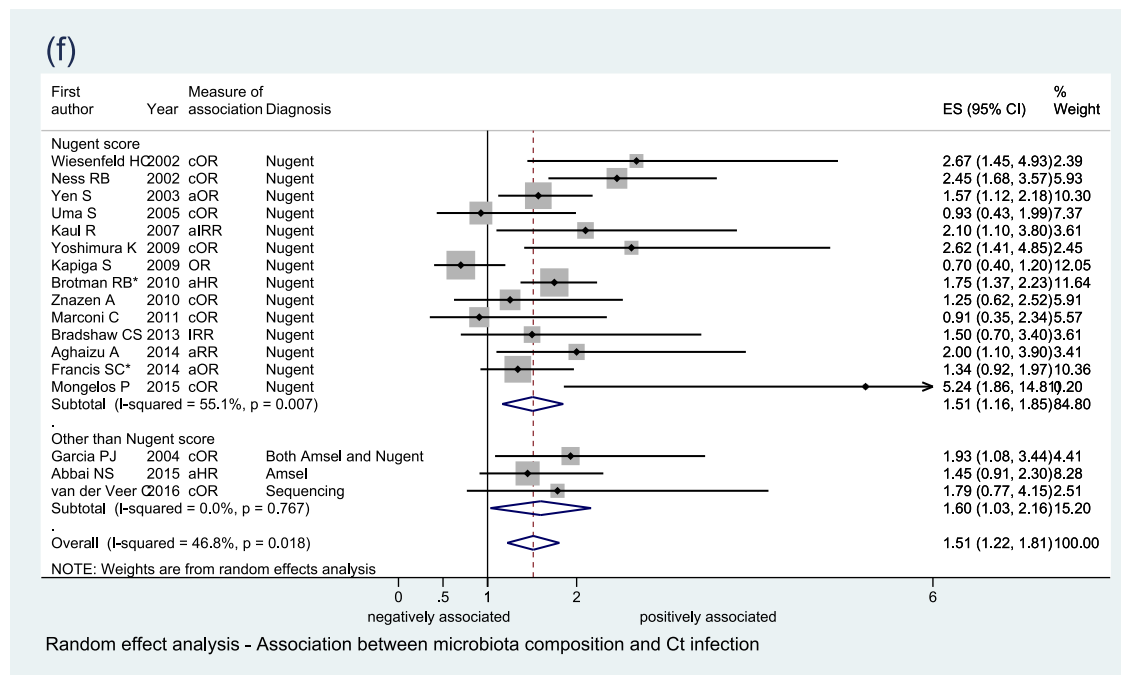
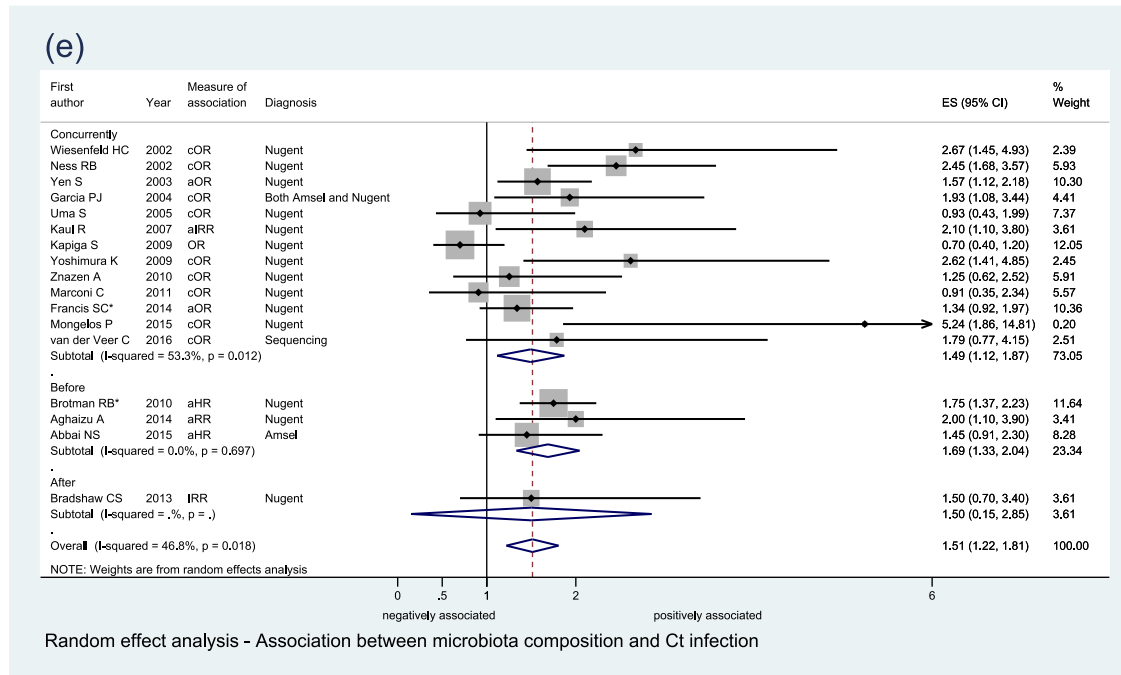


Fig. 4. (continued).

Evaluation of methodological quality was assessed using the Newcastle–Ottawa scale. All the selected studies rated at least five stars out of nine, indicating medium-to-high methodological quality and limited impact on the risk of bias. Studies with the lowest scores on this scale (five stars out of nine, for four studies out of 39) had cross-sectional designs and were lacking adjustment on important cofactors for STI acquisition, in particular factors linked

to recent sexual exposure (e.g. number of partners in recent months/years, lifetime number of partners).

### Discussion

The vaginal ecosystem exists as a finely tuned equilibrium between microorganisms and the host. Modern next-generation

sequencing-based characterization of the vaginal microbiota has provided a more in-depth and detailed composition of the microbiota. It distinguishes several kinds of microbiota: HL-VMB, corresponding to low Nugent scores and negative Amsel test, and a LL-VMB, comprising a wide array of strict and facultative anaerobes, corresponding to high Nugent scores and positive Amsel test [19,27]. Hence, these methods align well despite having different resolutions. It is believed that a disruption of this equilibrium and a lack of *Lactobacillus* spp. could play a role in the physiopathology of reproductive tract infections, such as *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* or HPV. Conversely, STI pathogens could modify the vaginal microbiota composition. Stemming from this hypothesis and as a first step towards understanding the interrelation between the vaginal microbiota and STIs, our systematic review and meta-analysis is the first to our knowledge to evaluate systematically the statistical association between vaginal microbiota and these four STIs and reflects the state of the art on this topic.

Our results suggested a trend towards a positive association between LL-VMB and HPV as well as *C. trachomatis* infection, which is coherent with *in vitro* studies suggesting a potential protective role of HL-VMB through lactic acid production, bacteriocin production or ecological competition [28–32]. In contrast, no clear trend for an association between vaginal microbiota and *N. gonorrhoeae* could be detected. Reasons for this difference could be linked to different characteristics of the considered pathogens in terms of infectivity or pathogenicity. Regarding the potential role of the microbiota, the ability of *Lactobacillus* spp. to prevent *N. gonorrhoeae* infection or contribute to its resolution *in vitro* and *in vivo* has been debated previously [33]. As for *M. genitalium* infection, our systematic review primarily highlighted the fact that too few studies have been conducted, owing to the fact that *M. genitalium* importance is growing and fewer research studies have been undertaken.

For two of the four STIs considered, this meta-analysis identified heterogeneity of the measures of association with vaginal microbiota among the selected studies. Two factors appeared to be important. Study site partially explained the heterogeneity observed among studies. This result suggests that another, as yet unknown, factor such as the genetic background, sexual practices or personal hygiene behaviours varying across geographical areas could greatly influence the composition of the vaginal microbiota. The microbiota characterization method was another important factor driving the observed association. Indeed, the association between LL-VMB and HPV infection was higher in studies using the Amsel's criteria. As these criteria use both microscopy and clinical signs, and Nugent score is solely based on microscopy, the presence of clinical signs used in Amsel's criteria might actually contribute more to the association with HPV infection than the presence or absence of *Lactobacillus* spp. as defined by Nugent score. Under this hypothesis, a focus on combining clinical signs detection and microbiological evaluation of the vaginal microbiota should be explored.

The present meta-analysis has several limitations. Though we selected studies where STI diagnosis was based on DNA or RNA detection, the methods used have different sensitivities, which may have biased the results. To characterize the vaginal microbiota, four different methods were used: Amsel's criteria, Nugent score, presence of clue cells and 16S rRNA gene sequencing. Evaluations of the vaginal microbiota according to the Nugent scoring system, Amsel's criteria and the presence of clue cells do not overlap perfectly and have low resolution [22,34,35]. This could be considered a limitation, but a strong correlation exists between these methods and LL-VMB determined using 16S rRNA gene amplicon sequencing [19,27].

We chose to pool data from all HL-VMB groups commonly identified by 16S rRNA gene sequencing analysis (i.e. *L. crispatus*-, *L. gasseri*-, *L. iners*- and *L. jensenii*-dominated Community State Types), whereas LL-VMB comprised women presenting with a combination of diverse anaerobes, to fit the Nugent score and Amsel's criteria. This pooling may not be relevant as different species of *Lactobacillus* may have different effects on STIs. Zozaya-Hinchliffe et al. have shown that *L. crispatus* and *L. jensenii* were predominantly found in women with a 0–3 Nugent score while *L. iners* could be found in high proportions in all categories of the Nugent score, including the 7–10 category [36]. The use of molecular techniques such as next-generation sequencing applied to genes conserved in all Bacteria and Archaea (16S rRNA gene or *cpn60* [37]) enables a more in-depth characterization of the vaginal microbiota that could provide better insights into the association between microbiota and STIs.

Given the different types of measures of association reported in the selected studies, no overall measure of association could be inferred from our meta-analysis. Intrinsic to meta-analysis, the issue of publication bias arose, in particular when authors reported as not significant the association between vaginal microbiota and a given STI, instead of providing the point estimate and its 95% CI or raw data. This was the case in one of the articles reviewed for full reading and excluded for this reason [38]. Therefore, it is likely that the 'true' value of the association between vaginal microbiota and a given STI is lower than what could be evaluated by pooling published estimates.

There are strong biological arguments to support the hypothesis that LL-VMB and presence of anaerobes are risk factors for STI acquisition. First, *Lactobacillus* species are thought to be protective against STIs through competition, production of lactic acid that lowers pH, and production of target-specific bacteriocins. Therefore, the absence of *Lactobacillus* species would lead to greater susceptibility to infections. Second, vaginal strict and facultative anaerobes seem to produce nitrosamines, cytokines and inflammatory mediators that are thought to be associated with cervical inflammation [39], and mucin-degrading enzymes [40,41] that lower barriers to infections. Because this LL-VMB state can persist over long periods of time or occur frequently in a large number of women [42], it might still represent a normal state but associated with higher risk, should these women be exposed to an STI pathogen.

Overall, our results advocate for the use of a more standardized, reproducible and sensitive method for characterizing the vaginal microbiota. The ability to distinguish communities dominated by different *Lactobacillus* spp. is important, as *Lactobacillus* spp. have unique properties with differential effects on STI pathogens. Further, studies that rely on longitudinal and prospective designs will need to be undertaken to address the directionality of this complex association, in particular whether a change in the vaginal microbiota occurs before, at the same time as (similar or simultaneous transmission mode of the microbiota and STIs [38,43]), or after an infection. Ultimately, more functional analyses of the vaginal microbiota are necessary in the context of STIs, so that it can be leveraged into improved public health strategies. Understanding the relationship between STIs and the vaginal microbiota is key to propose a comprehensive approach to sexual and reproductive health. Characterizing the vaginal microbiota will pave the way to new prevention and screening strategies, diagnostic tools and therapeutic solutions based on individual's predispositions to infection, including the development of probiotics. High throughput DNA sequencing methods have opened the door to an era of personalized medicine and enabled the introduction of genomics in public health and epidemiology.

## Transparency declaration

All authors have stated that there are no conflicts of interest to report. The content is solely the responsibility of the authors and does not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health.

## Funding

This work was supported in part (JT) by the Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale and Région Ile-de-France. Research reported in this publication was supported in part (JR) by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the National Institutes of Health (U19AI084044 and R01AI116799).

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.04.019>.

## References

- Glasier A, Gulmezoglu AM, Schmid GP, Moreno CG, Van Look PF. Sexual and reproductive health: a matter of life and death. *Lancet* 2006;368:1595–607.
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya NS, Unemo M, Low N, et al. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS One* 2015;10:e0143304.
- Detels R, Green AM, Klausner JD, Katzenstein D, Gaydos C, Handsfield H, et al. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. *Sex Transm Dis* 2011;38:503–9.
- Carey AJ, Beagley KW. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:576–86.
- Donders GG, Moerman P, De Wet GH, Hooft P, Goubau P. The association between *Chlamydia* cervicitis, chorioamnionitis and neonatal complications. *Arch Gynecol Obstet* 1991;249:79–85.
- Blas MM, Cancihuanan FA, Alva IE, Hawes SE. Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis*: a population-based cohort study in Washington State. *Sex Transm Infect* 2007;83:314–8.
- Kovacs L, Nagy E, Berbik I, Meszaros G, Deak J, Nyari T. The frequency and the role of *Chlamydia trachomatis* infection in premature labor. *Int J Gynaecol Obstet* 1998;62:47–54.
- McGowin CL, Anderson-Smits C. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001324.
- Manhart LE, Critchlow CW, Holmes KK, Dutro SM, Eschenbach DA, Stevens CE, et al. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis* 2003;187:650–7.
- Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, Hay P, et al. Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol* 2003;56:616–8.
- Svenstrup HF, Fedder J, Kristoffersen SE, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility—a prospective study. *Fertil Steril* 2008;90:513–20.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:796–802.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12–9.
- Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2014;26:13–21.
- de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* 2017;141:664–70.
- Veldhuijzen NJ, Snijders PJ, Reiss P, Meijer CJ, van de Wijert JH. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis* 2010;10:862–74.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* 2005;353:1899–911.
- Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda K, Nakano M, Kashimura M, Hachisuga T, et al. Intravaginal microbial flora by the 16S rRNA gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol* 2011;205:235.e1–9.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(Suppl. 1):4680–7.
- Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29:297–301.
- Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983;74:14–22.
- Discacciati MG, Simoes JA, Amaral RG, Brozola E, Rabelo-Santos SH, Westin MC, et al. Presence of 20% or more clue cells: an accurate criterion for the diagnosis of bacterial vaginosis in Papanicolaou cervical smears. *Diagn Cytopathol* 2006;34:272–6.
- Hardy RJ, Thompson SG. Detecting and describing heterogeneity in meta-analysis. *Stat Med* 1998;17:841–56.
- Francis SC, Ao TT, Vanobberghen FM, Chilongani J, Hashim R, Andreasen A, et al. Epidemiology of curable sexually transmitted infections among women at increased risk for HIV in northwestern Tanzania: inadequacy of syndromic management. *PLoS One* 2014;9:e101221.
- Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, Yu KF, Andrews WW, Zhang J, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis* 2010;202:1907–15.
- Bradshaw CS, Walker J, Fairley CK, Chen MY, Tabrizi SN, Donovan B, et al. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young Australian women. *PLoS One* 2013;8:e57688.
- Srinivasan S, Hoffman NG, Morgan MT, Matsen FA, Fiedler TL, Hall RW, et al. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis: high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One* 2012;7:e37818.
- Sobel JD. Is there a protective role for vaginal flora? *Curr Infect Dis Rep* 1999;1:379–83.
- Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;48:75–83.
- Voravuthikunchai SP, Bilasoi S, Supamala O. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe* 2006;12:221–6.
- Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Int J Med Microbiol* 2015;305:815–27.
- Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes JA, et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2001;185:375–9.
- Muench DF, Kuch DJ, Wu H, Begum AA, Veit SJ, Pelletier ME, et al. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *J Infect Dis* 2009;199:1369–78.
- Joesoef MR, Hillier SL, Josodiwondo S, Linnan M. Reproducibility of a scoring system for gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:1730–1.
- Zarakolu P, Sahin Hodoglugil NN, Aydin F, Tosun I, Gozalan A, Unal S. Reliability of interpretation of gram-stained vaginal smears by Nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:77–80.
- Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ. Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol* 2010;48:1812–9.
- Albert AY, Chaban B, Wagner EC, Schellenberg JJ, Links MG, van Schalkwyk J, et al. A study of the vaginal microbiome in healthy Canadian women utilizing *cpn60*-based molecular profiling reveals distinct *Gardnerella* subgroup community state types. *PLoS One* 2015;10:e0135620.
- Morris MC, Rogers PA, Kinghorn GR. Is bacterial vaginosis a sexually transmitted infection? *Sex Transm Infect* 2001;77:63–8.
- Boyle DC, Barton SE, Uthayakumar S, Hay PE, Pollock JW, Steer PJ, et al. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int J Gynecol Cancer* 2003;13:159–63.
- Olmsted SS, Meyn LA, Rohan LC, Hillier SL. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic Gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis* 2003;30:257–61.
- Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, Hassan SS, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, et al. The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG* 2011;118:533–49.
- Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4:132ra52.
- Hutchinson KB, Kip KE, Ness RB. Condom use and its association with bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated vaginal microflora. *Epidemiology* 2007;18:702–8.

---

## **A.2 Evaluation de la qualité des études sélectionnées dans la méta-analyse**



TABLE A.1 – Evaluation de la qualité des études sélectionnées pour l'étude de l'association entre microbiote vaginal et infections sexuellement transmissibles, par l'échelle Newcastle-Ottawa, au regard de l'objectif de cette revue systématique.

Ref	Année	Auteur 1	Type d'étude	Type de données	IST	Sélection	Comparabilité	Exposition/Outcome
[67]	2001	Castle PE	Etude cas-témoin prévalente, nichée dans cohorte prospective	A l'inclusion	HPV	***	**	**
[68]	2001	Moscicki AB	Cohorte prospective	Longitudinales	HPV	***		**
[69]	2002	Ness RB	Cohorte prospective	A l'inclusion	CT, NG	**		**
[70]	2002	Wiesenfeld HC	Etude transversale	Transversales	CT	**		**
[57]	2003	Manhart LE	Etude transversale	Transversales	MG	**	**	**
[71]	2003	Mao C	Cohorte prospective	Longitudinales	HPV	**	**	**
[72]	2003	Yen S	Cohorte prospective	A l'inclusion	CT, NG	**	**	**
[73]	2004	Garcia PJ	Etude transversale	Transversales	CT	**	**	**
[74]	2005	Uma S	Etude transversale	Transversales	CT, NG	**	**	**
[75]	2007	Kaul R	Essai contrôlé randomisé prospectif	Longitudinales	CT, NG	**	**	**
[76]	2008	Allsworth JE	Etude transversale	Transversales	HPV	**	**	**
[77]	2009	Kapiga S	Cohorte prospective	Longitudinales	CT, NG	**	**	**
[78]	2009	Nam KH	Etude transversale	Transversales	HPV	**	**	**
[79]	2009	Rahkola P	Etude transversale	Transversales	HPV	**	**	**
[80]	2009	Verteramo R	Etude transversale	Transversales	HPV	**	**	**
[81]	2009	Yoshimura K	Etude transversale	Transversales	CT	**	**	**
[82]	2010	Brotman RB	Cohorte prospective	Longitudinales	CT, NG	**	**	**
[83]	2010	Oakeshott P			MG	**	**	**
[84]	2010	Znazen A	Etude transversale	Transversales	CT	**	**	**
[85]	2011	Caiyan X	Etude transversale	Transversales	HPV	**	**	**
[86]	2011	Marconi C	Etude transversale	Transversales	CT	**	**	**
[87]	2011	Wiley DJ	Essai contrôlé randomisé prospectif	A l'inclusion	HPV	**	**	**
[88]	2012	Oakeshott P	Cohorte prospective	Longitudinales	HPV	**	**	**

Ref	Année	Auteur 1	Type d'étude	Type de données	IST	Sélection	Comparabilité	Exposition/Outcome
[89]	2013	Bradshaw CS	Cohorte prospective	Longitudinales	CT, NG	***		***
[90]	2013	Lazenby GB	Etude transversale	Transversales	HPV	***		***
[91]	2013	Watson-Jones D	Essai contrôlé randomisé prospectif	A l'inclusion	HPV	***	*	***
[92]	2014	Aghaizu A	Cohorte prospective	Longitudinales	CT	***	*	***
[93]	2014	Brotman RB	Cohorte prospective	Longitudinales	HPV	***	**	***
[94]	2014	Francis SC	Cohorte prospective	Longitudinales	CT, NG	***	**	***
[95]	2014	Huppert JS	Etude transversale	Transversales	MG	**		***
[96]	2015	Abbai NS	Essai contrôlé randomisé prospectif	Longitudinales	CT, NG	***	*	**
[97]	2015	Caixeta RC	Etude transversale	Transversales	HPV	**	*	**
[98]	2015	Liu J	Etude transversale	Transversales	HPV	***	*	***
[99]	2015	Marks MA	Cohorte prospective et rétrospective	A l'inclusion	HPV	***	**	**
[100]	2015	Mitra A	Etude transversale	Transversales	HPV	*		**
[101]	2015	Mongelos P	Etude transversale	Transversales	HPV, CT	***		***
[102]	2015	Oh HY	Cohorte prospective	A l'inclusion	HPV	***		***
[103]	2015	Peres AL	Etude transversale	Transversales	HPV	***		**
[104]	2016	Van der Veer C	Etude transversale	Transversales	CT	**	**	**

IST : Infection sexuellement transmissible; HPV : Human Papillomavirus; CT : *Chlamydia trachomatis*; NG : *Neisseria gonorrhoeae*; MG : *Mycoplasma genitalium*.

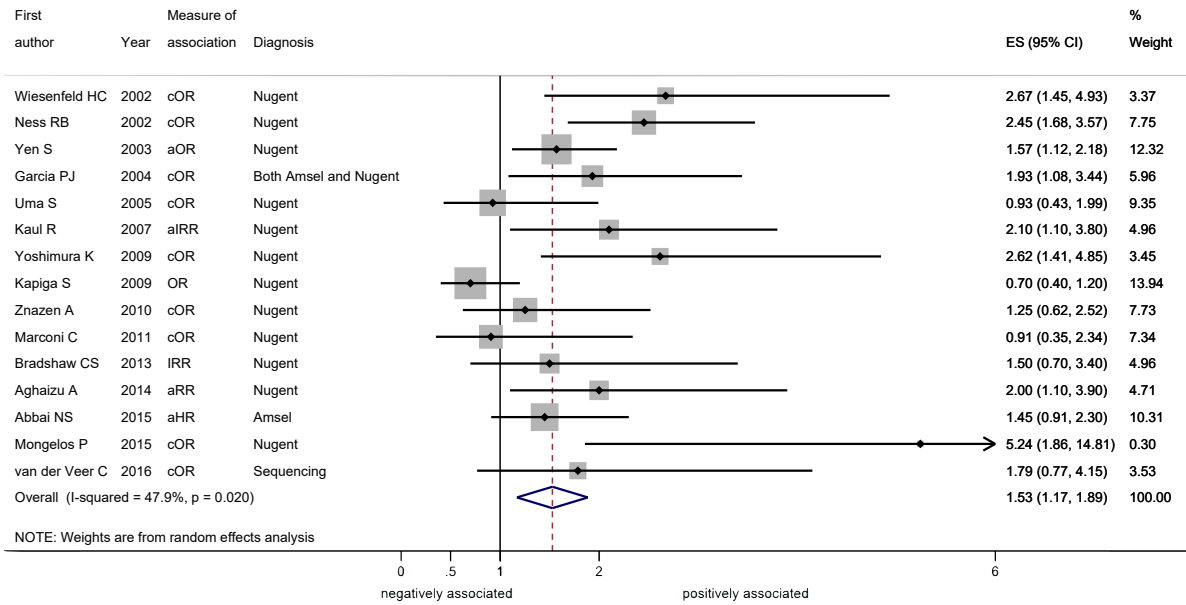
### **A.3 Analyse de sensibilité pour les infections à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae***

Des analyses de sensibilité ont été réalisées pour les infections à *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae* en excluant deux études où les résultats étaient séparés selon les trois catégories du score de Nugent : 0-3, 4-6 et 7-10, en prenant la catégorie 0-3 seule comme référence pour le calcul des mesures d'associations, au lieu des catégories 0-3 et 4-6 ensemble, et pour lesquelles il n'était pas possible de recalculer de nouvelles mesures d'associations (Francis *et al.* (2014), Brotman *et al.* (2010), figure A.1).

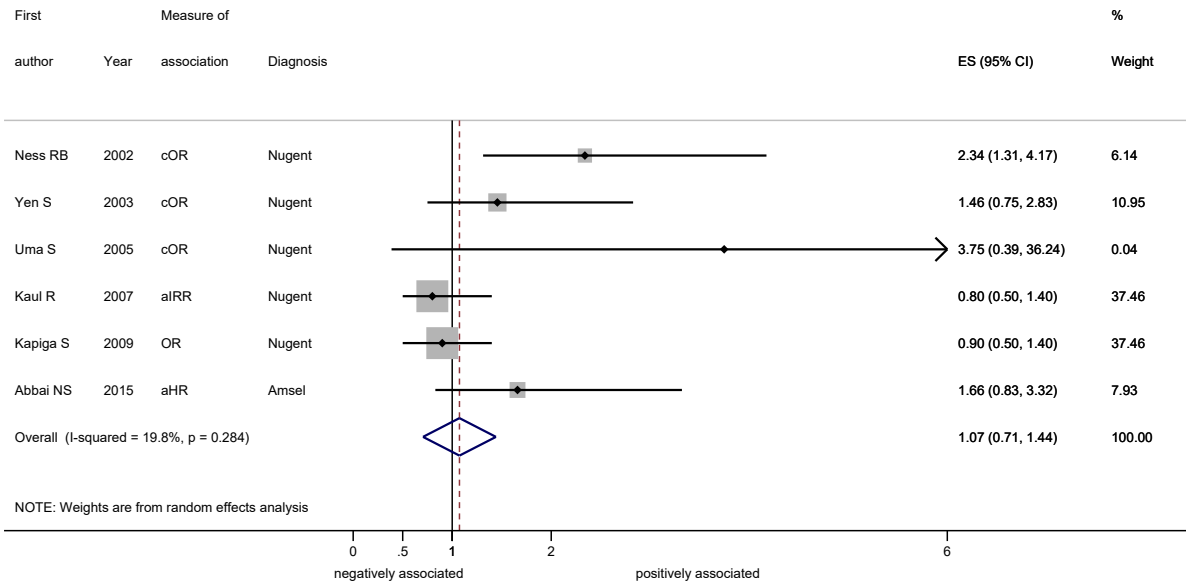
L'exclusion de ces deux études n'a pas modifié les moyennes des mesures d'association pour ces deux infections, ni les mesures d'hétérogénéité ( $I^2$ ).

### **A.4 Analyse de sous-groupe sur les cas incidents et cas prévalents d'infections à *Chlamydia trachomatis* et HPV**

Une analyse de sous-groupe comparant les études ayant travaillé sur des cas incidents d'infection et les études ayant travaillé sur des cas prévalents d'infection, pour les infections par *C. trachomatis* et HPV, a été réalisée afin de voir si ce facteur expliquait l'hétérogénéité observée dans les mesures d'association entre ces infections et un LL-VMB (figure A.2). Cette analyse de sous-groupe ne montre pas d'effet clair de ce facteur et ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité observée entre les études.



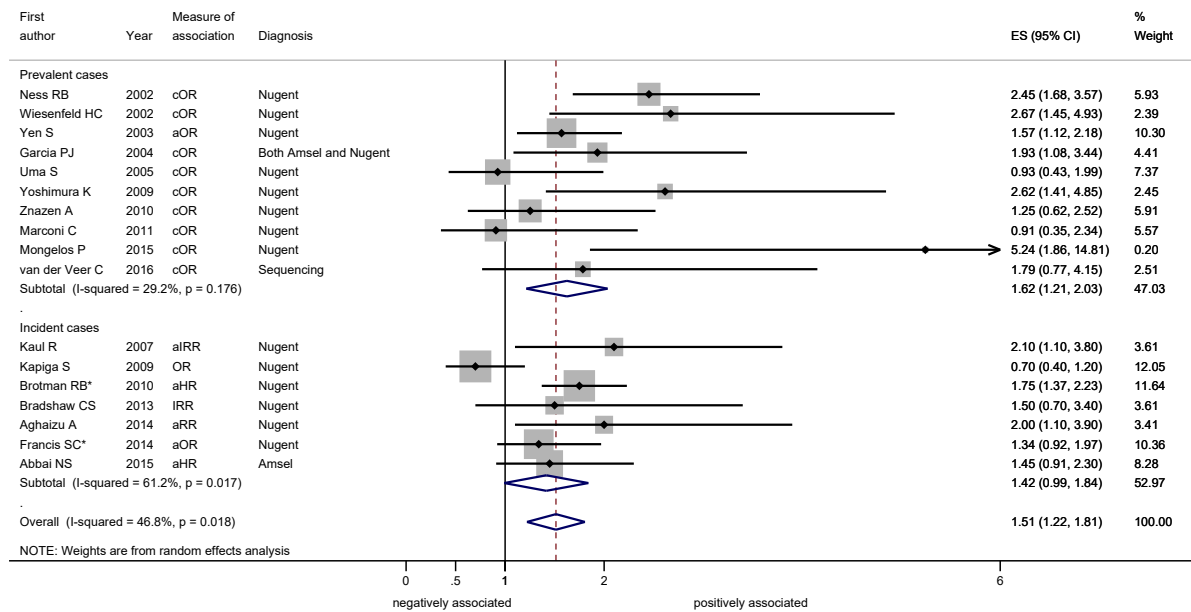
(a) *Chlamydia trachomatis*



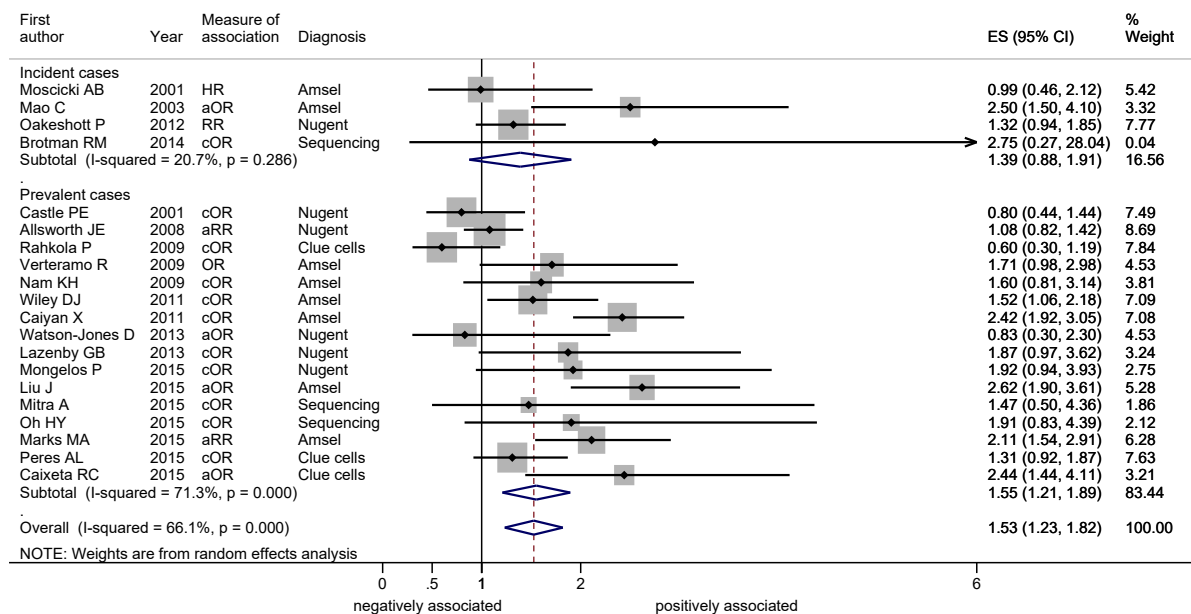
(b) *Neisseria gonorrhoeae*

FIGURE A.1 – Diagrammes en forêt des analyses de sensibilité entre microbiote vaginal déficient en *Lactobacillus* spp. et (a) *Chlamydia trachomatis* et (b) *Neisseria gonorrhoeae*, excluant les études fournissant des estimations d'association prenant la catégorie 0-3 du score de Nugent comme référence au lieu de l'ensemble des individus des catégories 0-3 et 4-6 du score de Nugent.

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.



(a) *Chlamydia trachomatis*



(b) HPV

FIGURE A.2 – Analyse de sous-groupe de l'association entre microbiote vaginal et (a) *Chlamydia trachomatis* et (b) HPV, pour les cas incidents versus prévalents d'infection.

OR : Odds-ratio ; RR : Risque relatif ; IRR : Ratio de taux d'incidence ; HR : Hazard Ratio ; ES : effect size ; CI : Intervalle de confiance. Les mesures ajustées sont indiquées par le préfixe a- devant la mesure d'association. Les OR calculés à partir de données brutes sont indiqués par le préfixe c-.

## Annexe

# B

## Ayant trait à la partie II

### B.1 Article

## SHORT REPORT

# Vaginal microbiota composition and association with prevalent *Chlamydia trachomatis* infection: a cross-sectional study of young women attending a STI clinic in France

Jeanne Tamarelle,<sup>1</sup> Bertille de Barbeyrac,<sup>2</sup> Isabelle Le Hen,<sup>3</sup> Anne Thiébaud,<sup>1</sup> Cécile Bébéar,<sup>2</sup> Jacques Ravel,<sup>4</sup> Elisabeth Delarocque-Astagneau<sup>1</sup>

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/sextrans-2017-053346>).

<sup>1</sup>Biostatistics, Biomathematics, Pharmacoepidemiology and Infectious Diseases (B2PhI), Université Versailles Saint-Quentin-en-Yvelines, INSERM, Institut Pasteur, Université Paris-Saclay, Montigny-le-Bretonneux, France

<sup>2</sup>USC EA 3671 Mycoplasma and chlamydial infections in humans, Université de Bordeaux, French National Reference Center for Bacterial STIs, Bordeaux University Hospital, Bordeaux, France

<sup>3</sup>Maison Départementale de la Santé, Free Center of Information, Screening and Diagnosis of Sexually Transmitted Infections (CeGIDD), Bordeaux, France

<sup>4</sup>Department of Microbiology and Immunology, Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA

## Correspondence to

Jeanne Tamarelle, Biostatistics, Biomathematics, Pharmacoepidemiology, and Infectious Diseases, Institut Pasteur, Montigny-le-Bretonneux 78180, France; [jeanne.tamarelle@gmail.com](mailto:jeanne.tamarelle@gmail.com)

Received 11 July 2017

Revised 9 November 2017

Accepted 10 December 2017

Published Online First

22 January 2018



Check for updates

**To cite:** Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, et al. *Sex Transm Infect* 2018;**94**:616–618.

## ABSTRACT

**Objectives** New molecular techniques have allowed describing groups of bacterial communities in the vagina (community state types (CST)) that could play an important role in *Chlamydia trachomatis* (CT) infection.

Our aim was to describe the distribution of CST in a population of young women in France.

**Methods** A cross-sectional study was carried out in June 2015 among anonymous young women attending a STI clinic in Bordeaux, France. Participants provided a vaginal sample for CT screening and sociodemographic data. CT was diagnosed using the Aptima-combo 2 transcription-mediated-amplification assay. Vaginal microbiota composition was characterised using 16S rRNA gene amplicon sequencing.

**Results** Microbiota composition and CT status were available for 132 women. CST dominated by *Lactobacillus crispatus* (CST-I), *L. iners* (CST-III) and a diversity of anaerobes (CST-IV) represented 37.1%, 38.6% and 22.0% of the sample, respectively. Twenty-one out of 132 women were CT positive. Proportions of CT-positive women were higher for samples belonging to CST-III (21.6%) and CST-IV (17.2%) than to CST-I (8.2%).

**Conclusions** Five CST were found in 132 young women from a STI clinic in France. These CSTs were not significantly associated with CT but higher proportions of CT-positive women were found in CST-III and CST-IV, consistent with a previous study in the Netherlands. Though our study lacked statistical power and was cross-sectional, it is a necessary first step to understand the structure of the vaginal microbiota in French women with or without infection before performing in-depth longitudinal studies.

## INTRODUCTION

The vaginal microbiota, in particular *Lactobacillus* spp., is thought to play a major role in preventing STIs through mechanisms such as ecological competition, the production of lactic acid and antimicrobials such as bacteriocins.<sup>1,2</sup> Using culture-independent methods, groups of bacterial communities have been described in the vagina (community state types (CST)).<sup>3</sup> Four CSTs are often dominated by *Lactobacillus* spp. (CST-I: *L. crispatus*; CST-II: *L. gasseri*; CST-III: *L. iners*; CST-V: *L. jensenii*) and

one CST has low or no *Lactobacillus* spp. and a wide array of strict and facultative anaerobes (CST-IV). These CSTs are hypothesised to differentially affect the risk to STIs.

Genital infection with *Chlamydia trachomatis* (CT) is the most reported bacterial STI worldwide,<sup>4</sup> in particular among young women. Though mostly asymptomatic, this infection can progress towards pelvic inflammatory disease (PID), which, if left untreated, is associated with tubal factor infertility and ectopic pregnancy.<sup>5</sup> The last estimate of CT positivity in France was 8.3% among women aged 18–24 years in 2012.<sup>6</sup> Throughout the course of CT, many factors are likely to play a role in modulating the risk of infection, persistence and progression towards PID, including the composition and function of the vaginal microbiota.

Here, we sought to characterise the vaginal microbiota in consecutive women attending a STI clinic in Bordeaux, France, and compare our results with previous findings.

## METHODS

### Design and study population

A cross-sectional study was carried out in June 2015 that aimed at characterising the vaginal microbiota composition in young women attending a STI clinic in Bordeaux, France. Participants provided a single self-collected vaginal sample for routine CT screening and sociodemographic data such as age, place of birth and reasons for consultation.

### CT screening and vaginal microbiota characterisation

Vaginal samples were kept in Aptima (Hologic) medium allowing transportation at room temperature. CT screening was carried out at the CT National Reference Centre using the Aptima-combo 2 transcription-mediated-amplification assay. A 200 µl aliquot of the samples was centrifuged and resuspended in 300 µl of MoBio Microbiome Kit (MoBio/Qiagen) lysis buffer and processed according to the manufacturer's recommendation. The DNA was eluted in 100 µl of elution buffer. Vaginal microbiota composition was characterised using 16S rRNA gene amplicon sequencing on an Illumina MiSeq platform (San Diego, California,

USA) using the 300 paired-end protocol. A total of 50 ng of DNA was subject to PCR amplification of the V3–V4 region of the 16S rRNA gene using a dual-indexing approach previously published.<sup>7</sup> Sequence reads were processed and taxonomic assignments were performed on each assembled sequence using PECAN, a novel and rapid taxonomic classifier that affords classification of all sequence reads (ravel-lab.org/pecan).

### CST clustering and statistical analysis

Women were grouped into CSTs using hierarchical clustering. The clustering was implemented in R statistical package ‘stats’ using Ward linkage hierarchical clustering based on Jensen-Shannon divergence metrics. CT-positive women and CT-negative women were compared using Fisher-exact test. Statistical analyses were performed using Stata V.12.0 and R V.3.3.0.

Attendance at the STI clinic is completely anonymous. The samples and data used in this research were collected as part of routine care. Oral consent was obtained from participants, after providing information on this use. The electronic database is hosted with the authorisation of the French National Commission for Computed Data and Individual Freedom.

## RESULTS

### Sociodemographic characteristics

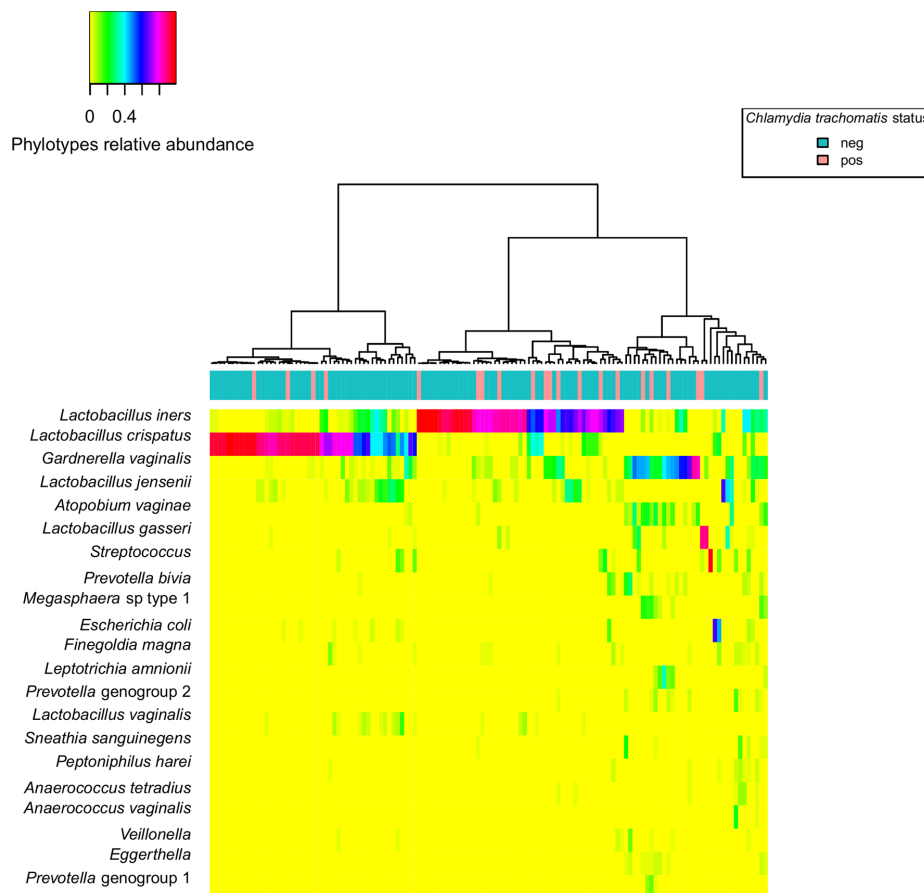
A total of 151 women were recruited in the STI clinic in Bordeaux and provided vaginal samples for CT diagnosis and vaginal microbiota characterisation, of which 132 yielded workable results.

Age was available for 119 women and ranged from 16 to 33 years. Out of 116 women for which the origin was available, 87.9% were born in Metropolitan France, whereas the rest of them were born abroad or in overseas French departments. Main reasons for the visit were ‘at risk intercourse’ (20.5%), ‘problem in condom use’ (19.7%), ‘before stopping condom use’ (19.7%), ‘change of partner’ (13.7%) and ‘symptoms’ (6%).

### Vaginal microbiota composition

CSTs dominated by *L. crispatus* (CST-I), *L. iners* (CST-III) or lacking *Lactobacillus* spp. and comprising a wide array of strict and facultative anaerobes (CST-IV) represented 37.1%, 38.6% and 22.0% of the samples, respectively (figure 1 and online Supplementary table 1). Only a few samples were assigned to CST-II and CST-V. *L. crispatus* was either present in very low or high proportion of the vaginal microbiota, accounting for up to 97% of the microbiota for some women. Similarly, the proportion of *L. iners* in some women reached 98%. Among CST-IV communities, no single bacteria dominated the vaginal microbiota, but both *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* were commonly found.

Within CST-I and CST-III, two subgroups could be highlighted, one for which the *Lactobacillus* spp. was highly dominant (CST-IA and CST-IIIA) and one for which it was dominant but other taxa were present at low abundance (CST-IB and CST-IIIB) (figure 1).



**Figure 1** Heatmap of relative abundance of microbial taxa found in the vaginal bacterial communities of 132 young women from a STI clinic in France, June 2015.



**CT infection**

Twenty-one women (15.9%) out of 132 were CT positive. All CT-positive women were aged 18–24 years. Proportions of CT-positive women were higher in CST-III (21.6%, 11 out of 51) and CST-IV (17.2%, five out of 29) than in CST-I (8.2%, four out of 49). CST-I represented 19.1% in CT-positive women and 40.5% in CT-negative women, while these proportions corresponded to 52.4% and 36.0 for CST-III and 23.8% and 21.6% for CST-IV (online Supplementary table 1).

ORs of being CT positive were 3.09 (95% CI 0.91 to 10.49) for CST-III compared with CST-I and 2.34 (95% CI 0.58 to 9.55) for CST-IV compared with CST-I, though these results were not statistically significant.

**DISCUSSION**

The high proportion of CT-positive women in our study (15.9%) is probably due to the fact that study participants represented a group of relatively high-risk women, compared with the general population. CT positivity was much higher than the last estimate in France, in a web-based study in 2012 where 8.3% of women aged 18–24 years in the general population were found positive for CT.<sup>6</sup> All women infected with CT were aged 18–24 years, which corresponds to the age group most affected by this infection.

The vaginal microbiota of young women was characterised using culture-independent methods for the first time in French women. Five CSTs could be described in these 132 young women attending a STI clinic in France, with the three main CSTs being divided into two subgroups each according to community diversity. CSTs were not significantly associated with *C. trachomatis* status but higher proportions of CT-positive women were found in CST-III and CST-IV than in CST-I.

In a previous study by Ravel *et al.*,<sup>3</sup> the five CSTs were found at a frequency of 26.2%, 6.3%, 34.1%, 27.4% and 5.3% for CST-I, CST-II, CST-III, CST-IV and CST-V, respectively, in healthy CT-negative women from Baltimore and Atlanta in the USA. Similar to our findings in CT-negative women, CST-I, CST-III and CST-IV were the most prevalent vaginal microbiota types found in this population, though our study showed a higher proportion of CST-I in non-infected women. This over-representation of CST-I in non-infected women could be explained with an increased protection to STIs by a community dominated by *L. crispatus* as previously hypothesised by van der Veer *et al.*<sup>8</sup> In their study of a high-risk population for STIs in the Netherlands, proportions of CST-I, CST-III and CST-IV in CT-negative women were 39.0%, 26.8% and 34.2%, respectively. Among CT-positive women, the distribution of CSTs in our study was somewhat similar to that found by van der Veer *et al.* (online Supplementary table 1), except for CST-IV. This CST represented 48.1% of CT-positive women, while in our study it accounted for only 23.8%. Our results in French women are similar to the study of van der Veer *et al.* hypothesising a detrimental role of CST-III and CST-IV. Altogether, these data point to a protective role of CST-I, dominated by *L. crispatus*, and a potential increased risk for CT infection for women with CST-III and CST-IV, which might vary by population. One can speculate that these microbiota types are associated with increased susceptibility; however, it cannot be excluded that

the infection itself results in CST-III and CST-IV vaginal microbiota. Epidemiological studies, using the Nugent score, a Gram stain and microscopy-based evaluation of the microbiota, have shown that high Nugent score is a risk factor for CT, *Neisseria gonorrhoeae* and HIV infection.<sup>2,9</sup>

The cross-sectional study design of the current study and the relatively small sample size are a limitation. Further studies with prospective longitudinal study design would afford determining whether the vaginal microbiota predisposes to CT infection, or whether CT infection modifies the composition of the vaginal microbiota and would allow to account for the dynamics structure of the vaginal microbiota over time previously reported.<sup>10</sup> Finally, analysis of the vaginal microbiota would strongly benefit from information on sexual practices, personal hygiene, gynaecological history or concurrent treatment, in particular oral contraceptive and antibiotic use, information we did not have access to in this study. Nonetheless, this study is a first necessary step to inform the design of larger prospective longitudinal studies.

**Handling editor** Jackie A Cassell

**Acknowledgements** We would like to thank all the participants of this study, the Centre Gratuit d'Information, de Dépistage et de Diagnostic (CeGIDD) of Bordeaux, France, and all the staff who were involved in this study. The National Reference Center for bacterial sexually transmitted infections is gratefully acknowledged.

**Contributors** JT was a major contributor in data analysis, with support from AT, JR and ED-A. JT wrote the manuscript. BdB, ILH, CB and ED-A were major contributors in the conception of the study. BdB and JR were major contributors in biological and bioinformatics analyses. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding** This study was funded by the 2013 Institut National du Cancer, Institut de Recherche en Santé Publique (INCa-IReSP) call for projects 'Recherche Prévention Primaire' (Reference number: A15012LS).

**Competing interests** None declared.

**Ethics approval** CNIL registration number: 1928790.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

© Article author(s) (or their employer(s) unless otherwise stated in the text of the article) 2018. All rights reserved. No commercial use is permitted unless otherwise expressly granted.

**REFERENCES**

- Sobel JD. Is there a protective role for vaginal flora? *Curr Infect Dis Rep* 1999;1:379–83.
- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, *et al.* Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003;36:663–8.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108(Suppl 1):4680–7.
- Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, *et al.* Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS One* 2015;10:e0143304.
- Carey AJ, Beagle KW. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol* 2010;63:576–86.
- Barbeyrac Bde, Rahib D, Diego Sde, de Diego S, *et al.* P3.025 Internet testing for *Chlamydia* in France in 2012. *Sex Transm Infect* 2013;89(Suppl 1):A155–6.
- Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, *et al.* Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:5112–20.
- van der Veer C, Bruisten SM, van der Helm JJ, *et al.* The cervicovaginal microbiota in women notified for *Chlamydia trachomatis* infection: a case-control study at the sexually transmitted infection outpatient clinic in Amsterdam, The Netherlands. *Clin Infect Dis* 2017;64:24–31.
- Taha TE, Hoover DR, Dallabetta GA, *et al.* Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS* 1998;12:1699–706.
- Gajer P, Brotman RM, Bai G, *et al.* Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4:132ra52.

## Annexe

# C

## Ayant trait à la partie III

### C.1 Article

# Nonoptimal Vaginal Microbiota After Azithromycin Treatment for *Chlamydia trachomatis* Infection

Jeanne Tamarelle,<sup>1</sup> Bing Ma,<sup>2,3</sup> Pawel Gajer,<sup>2,3</sup> Mike S. Humphrys,<sup>2</sup> Mishka Terplan,<sup>4,a</sup> Katrina S. Mark,<sup>4</sup> Anne C. M. Thiébaud,<sup>1</sup> Larry J. Forney,<sup>5</sup> Rebecca M. Brotman,<sup>2,6</sup> Elisabeth Delarocque-Astagneau,<sup>1</sup> Patrik M. Bavoil,<sup>7</sup> and Jacques Ravel<sup>2,3,9</sup>

<sup>1</sup>Unité Mixte de Recherche 1181, Université Versailles-Saint-Quentin-en-Yvelines, Institut Pasteur, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Paris, France, <sup>2</sup>Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, <sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, <sup>5</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, <sup>6</sup>Department of Biological Sciences, University of Idaho, Moscow, Idaho, USA, <sup>7</sup>Department of Epidemiology and Public Health, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, USA, and <sup>8</sup>Department of Microbial Pathogenesis, University of Maryland School of Dentistry, Baltimore, Maryland, USA

We characterized the composition and structure of the vaginal microbiota in a cohort of 149 women with genital *Chlamydia trachomatis* infection at baseline who were followed quarterly for 9 months after antibiotic treatment. At time of diagnosis, the vaginal microbiota was dominated by *Lactobacillus iners* or a diverse array of bacterial vaginosis-associated bacteria including *Gardnerella vaginalis*. Interestingly, *L. iners*-dominated communities were most common after azithromycin treatment (1 g monodose), consistent with the observed relative resistance of *L. iners* to azithromycin. *Lactobacillus iners*-dominated communities have been associated with increased risk of *C. trachomatis* infection, suggesting that the impact of antibiotic treatment on the vaginal microbiota could favor reinfections. These results provide support for the dual need to account for the potential perturbing effect(s) of antibiotic treatment on the vaginal microbiota, and to develop strategies to protect and restore optimal vaginal microbiota.

**Keywords.** vaginal microbiome; sexually transmitted infection; *Chlamydia trachomatis*; antibiotics; 16S rRNA gene sequencing; longitudinal.

In the United States, >1.7 million *Chlamydia trachomatis* (CT) genital infections were reported in 2017 (528.8 cases per 100 000), representing a 6.9% increase since 2016 [1]. However, this rate is considered an underestimate, as most CT-positive cases are asymptomatic [2]. CT infection is particularly prevalent in females between the ages of 15 and 24 years, with a reported infection rate 4 times higher than the general population [3]. Without appropriate treatment, approximately 10%–20% of infected women develop pelvic inflammatory disease [4, 5], which is associated with tubal infertility and ectopic pregnancy [6].

The vaginal microbiota provides the first line of defense against sexually transmitted infections (STIs). *Lactobacillus*

spp produce lactic acid and other antimicrobial compounds that maintain a protective environment [7]. The absence of *Lactobacillus* spp, as in the clinical diagnosis of bacterial vaginosis (BV), is associated with increased risk of STIs [8–12]. CT transmission rates after exposure to an infected partner are estimated at between 25% and 40% [13–15], indicating that not all exposures result in successful infection and that other factors, such as the vaginal microbiota, could be important cofactors in susceptibility to infection. Recent large-scale molecular surveys of the vaginal microbiota have revealed 5 broad vaginal bacterial community-state types (CSTs) [16, 17]. Four CSTs are dominated by *Lactobacillus* spp, while a fifth is deficient in *Lactobacillus* but comprised of a diverse set of strict and facultative anaerobes as often seen in BV. It has been hypothesized that different CSTs respond differently to disturbance events such as menstruation and medication [16–20] and display different resilience, that is, the ability to respond to, withstand, and recover from disturbance [21]. We sought to evaluate if the vaginal microbiota returns to a more optimal state following antibiotic treatment for genital CT infection. If the vaginal microbiota is not fully restored in the months and years following CT treatment, it may help to explain observed high rates of CT reinfection [22, 23]. We aimed to characterize the vaginal microbiota composition and structure of a cohort of 149 women with genital CT infection who were followed quarterly for 9 months after azithromycin treatment.

Received 2 July 2019; editorial decision 21 September 2019; accepted 27 September 2019; published online October 1, 2019.

Presented in part: Keystone Symposium, "Role of the Genital Tract Microbiome in Sexual and Reproductive Health (S6)," Cape Town, South Africa, 11–16 December 2018.

<sup>a</sup>Present affiliation: Virginia Commonwealth University, Department of Obstetrics and Gynecology, Richmond, Virginia.

Correspondence: Jacques Ravel, PhD, Institute for Genome Sciences, University of Maryland School of Medicine, 670 W Baltimore St, Baltimore, MD 21201 (jravel@som.umaryland.edu).

The Journal of Infectious Diseases® 2019;XX:1–9

© The Author(s) 2019. Published by Oxford University Press for the Infectious Diseases Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs licence (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com DOI: 10.1093/infdis/jiz499

## METHODS

### Study Design

Adolescents and young adults with positive tests for CT infection were screened at clinic point-of-care centers and community-based outreach sites by clinical staff at the University of Maryland School of Medicine's Adolescent and Young Adult Center. Participants in the Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) research study were invited upon notice of positive CT infection. The study was approved by the institutional review board of the University of Maryland, Baltimore (protocol number HP-00042350). Included in this report are eligible females who were 12–40 years old and self reported a history of sexual activity. The CHARM cohort is described in detail elsewhere [24]. In addition, 99 CT-negative African American women, 19–44 years old, enrolled in the Vaginal Microbiota 400 Women Study (VM400) [17], a cross-sectional study at the University of Maryland School of Medicine, served as controls.

### Study Procedure

At each CHARM enrollment visit (enrollment, 3 months, 6 months, and 9 months), an audio computer-assisted self-interview was administered. Clinicians conducted a physical examination and specimen collection, and provided treatment for CT using azithromycin 1 g orally in a single dose. When women were CT positive at visit 2, 3, or 4, azithromycin treatment was prescribed as needed and women remained in the study. Vaginal specimens for microbiota analysis (ESwabs, Copan) were collected from the mid-vaginal wall prior to antibiotic treatment, stored in 1 mL liquid Amies, and archived at  $-80^{\circ}\text{C}$ . CT was determined by BD ProbeTec on urine specimens.

### Sample Processing, 16S Ribosomal RNA Gene Amplification, and Sequencing

Whole genomic DNA was extracted from 300- $\mu\text{L}$  aliquots of Amies solution as previously reported [17]. High-throughput amplification and sequencing of the V3–V4 hypervariable regions of the 16S ribosomal RNA gene were performed using a validated and improved dual-indexing approach [25]. Further bioinformatic processing followed the DADA2 Workflow for Big Data and *dada2* (version 1.5.2) (<https://benjjneb.github.io/dada2/bigdata.html> [26]) as previously reported [27]. Taxonomy was assigned to each amplicon sequence variant generated by *dada2* using *SpeciateIt* (version 1.0, <http://ravel-lab.org/SpeciateIt>). Read counts for amplicon sequence variants assigned to the same taxonomy were summed for each sample. Data analyses include hierarchical clustering of each community profiles using Euclidian distance and assignment to one of the CSTs described previously [16, 17], and community diversity estimation using the Shannon diversity index [28].

### Statistical Analyses

Analyses were carried out on samples with a total read count of at least 1000, and on phylotypes present in at least 2 samples.

Baseline characteristics between CHARM participants who were lost to follow-up after the first visit and those who did not were compared using Fisher tests. To compare vaginal microbiota composition and structure among different groups, we conducted analyses at the CST and at the phylotype levels. At the phylotype level, we fitted negative binomial regression models for each phylotype present in at least 20% of all samples, using the DESeq2 package in R [29]. At the CST level, we fitted logistic regression models to compare vaginal microbiota of CHARM visit 1 (CT positive) or CHARM visit 2 to those of the VM400 controls. We applied a mixed-effect logistic regression model to compare CHARM visit 1 and visit 2 taking into account intrawoman correlation between samples, using the lme4 package in R. To describe vaginal microbiota at all visits and in the VM400 cohort controls, we used the Shannon diversity index, which accounts for both the number of different taxa and their evenness. Values of the Shannon diversity index were compared across CHARM visits and with the VM400 controls using the Wilcoxon matched-pairs signed-rank test and the Wilcoxon–Mann–Whitney rank-sum test, respectively. For all these analyses, CT-positive samples at visits 2, 3, and 4 were excluded because of the difficulty to distinguish between reinfections and treatment failures (see Results).

## RESULTS

We enrolled 149 women with confirmed CT infection, mostly African American (86%) and 13–33 years old who provided 141 baseline samples (visit 1), prior to treatment with 1 g single-dose azithromycin. Additional samples were collected at each subsequent visit and tested for CT (92, 85, and 77 samples, respectively; [Supplementary Figure 1](#)). CT positivity was 18% ( $n = 17$ ), 14% ( $n = 12$ ), and 18% ( $n = 14$ ), respectively.

Participants' demographic, behavioral, and medical history is summarized in [Supplementary Table 1](#). Women lost to follow-up after visit 1 ( $n = 49$ ) were less likely to have pelvic inflammatory disease at baseline (data not shown); no other baseline characteristics were significantly associated with cohort retention ( $n = 100$ ), including age, race, marital status, education, sexual orientation, number of partners (lifetime and in the last 3 months), smoking status, Nugent score, hormonal contraception, or CST.

For the CHARM cohort, we obtained 7 396 180 high-quality sequences with an average of 18 725 (standard deviation [SD], 18 325) sequences per sample. For the VM400 controls, we generated 3 349 907 sequences with an average of 33 837 (SD, 17 024) sequences per sample. A total of 319 phylotypes was identified in the combined CHARM and VM400 datasets. The relative abundance of each phylotype is illustrated in [Figure 1](#) (data available at [https://github.com/ravel-lab/charm\\_longitudinal](https://github.com/ravel-lab/charm_longitudinal)).

### Vaginal Microbiota Composition Association With Prevalent CT Infection

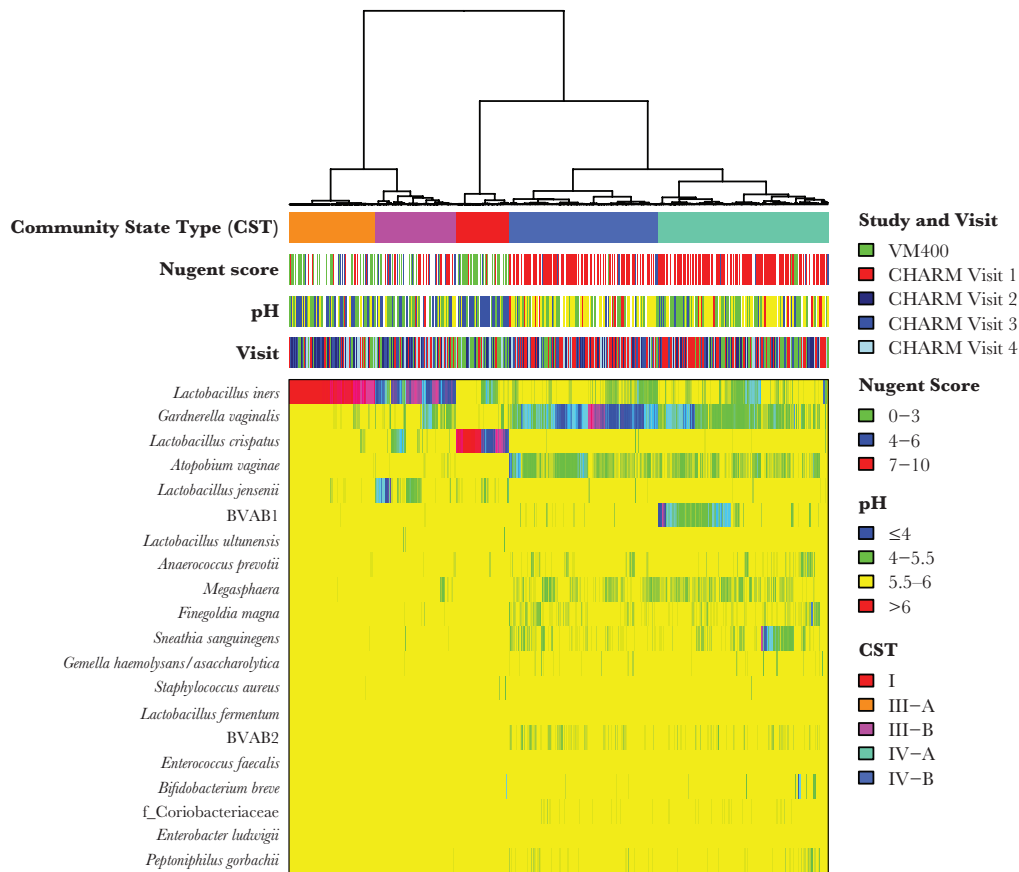
To lower the dimensionality of the dataset, samples were assigned to CSTs. CST I and III are often dominated by *Lactobacillus*

*crispatus* and *Lactobacillus iners*, respectively, whereas CST IV lacks *Lactobacillus* spp and includes a diverse array of facultative and strict anaerobes. Further refinement revealed subtypes CST III-A/B and IV-A/B (Figure 1). Broadly, in CST III-A, *L. iners* is dominating the vaginal community at a relative abundance higher than approximately 80%, whereas in CST III-B, *L. iners* remains the dominant species but at lower abundance while anaerobes are also present. Within CST IV, CST IV-B is represented by a higher abundance of *Gardnerella vaginalis*.

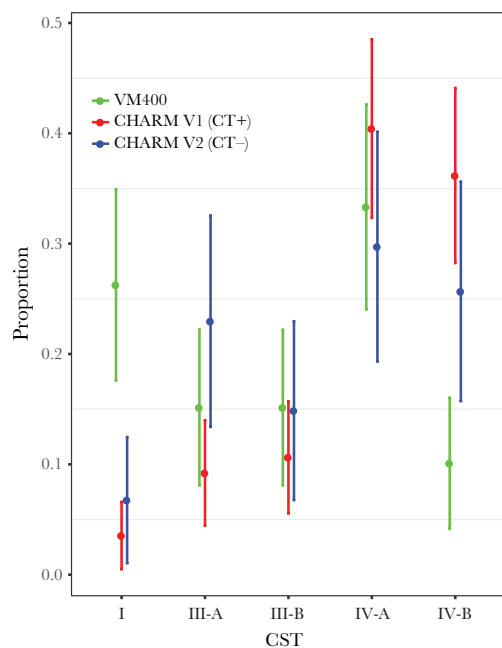
Using a logistic regression model, we found that the frequencies of each CST in CHARM visit 1 and VM400 cohort control samples were significantly different (Supplementary Table 2). We observed that CST III-A, CST III-B, CST IV-A, and CST IV-B were significantly overrepresented in CHARM samples compared to controls (odds ratios [ORs], 4.51 [95% confidence interval {CI}, 1.41–16.42], 5.20 [95% CI, 1.66–18.72], 8.98 [95% CI, 3.38–28.59], and 26.52 [95% CI, 8.84–94.91], respectively;

$P$  values .015, .007, < .001, and < .001, respectively) (Figure 2). The majority of CST IV samples (91%) were confirmed to have Nugent scores >7, which is indicative of BV [31].

We fitted a negative binomial regression model to evaluate specific phylotypes associated with CT infection (visit 1) compared to the control group. We compared the relative abundance of 40 phylotypes present in at least 20% of controls and CHARM visit 1 samples (240 observations). Phylotypes significantly associated with either CHARM visit 1 or VM400 cohort controls are listed in Supplementary Table 3. Overall, 25 phylotypes had relative abundance that significantly differed between the 2 groups (Supplementary Figure 2), among which 11 phylotypes were overrepresented in CT-positive vaginal microbiota, including *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae*, bacterial vaginosis-associated bacterium (BVAB) 2, and *Mobiluncus curtisii*, whereas *Lactobacillus* spp were overrepresented in VM400 CT-negative samples.



**Figure 1.** Heatmap representing the relative abundance of the 20 most abundant phylotypes found in the vaginal microbiota of 395 samples collected every 3 months for 9 months after azithromycin treatment for *Chlamydia trachomatis* by 149 young females in the Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management prospective cohort, Baltimore, Maryland, and 99 samples from 99 women enrolled in the VM400 cross-sectional control study, Baltimore, Maryland [30]. Ward linkage clustering was used to cluster samples based on their Euclidian distance calculated in the “vegan” package in R. The 4 bars on top indicate community state types, according to the previous naming convention [30], Nugent Score, vaginal pH, and visit number. Abbreviations: BVAB, bacterial vaginosis-associated bacteria; CHARM, Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management; CST, community state types.



**Figure 2.** Proportions of community state types (CSTs) in Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) samples from visit 1 (*Chlamydia trachomatis* [CT] positive) and visit 2 (CT negative, 3 months posttreatment) and in VM400 controls.

#### CT Infection and Antibiotic Treatment Footprint on the Vaginal Microbiota

All women from the CHARM study were treated with azithromycin after a CT-positive diagnosis at baseline. Interestingly, 18% ( $n = 17$ ) of women were CT positive at visit 2 (either because of treatment failure, reinfection with the same untreated partner, or reinfection with another partner). The frequency of each CST at visit 2 in CT-negative women ( $n = 74$ ) were compared to that of the VM400 cohort (cleared infection vs noninfected). We observed that CST III-A, CST III-B, CST IV-A, and CST IV-B were again overrepresented in CHARM CT-negative samples (ORs, 5.89 [95% CI, 1.91–21.01], 3.81 [95% CI, 1.16–14.13], 3.47 [95% CI, 1.23–11.47], and 9.88 [95% CI, 3.09–36.88]), respectively;  $P$  values .003, .033, .027, and < .001, respectively) (Supplementary Table 4 and Figure 2). At the phylotype level, among 49 phylotypes present in at least 20% of CHARM visit 2 CT-negative and VM400 control samples (173 observations), 24 were statistically significant with 6 overrepresented in CHARM CT-negative samples compared to controls, including *A. vaginae*, *Gemella haemolysans*, or *Peptoniphilus gorbachii*. However, *G. vaginalis*, BVAB1, BVAB2, and, interestingly, *L. iners*, were not statistically significant but trended toward overrepresentation in CHARM CT-negative samples (Supplementary Table 5 and Supplementary Figure 3).

Additionally, the frequency of CSTs in CHARM visit 2 CT-negative samples was compared to that of CHARM visit 1

(CT-positive). CST III-A was overrepresented in CT-negative samples compared to CT-positive samples (Supplementary Table 6 and Figure 2) (OR, 3.51 [95% CI, 1.45–8.75], using CST IV-B as reference). In addition, among 33 phylotypes present in at least 20% of CHARM visit 1 and visit 2 CT-negative samples (215 observations), only *L. iners* appeared to be significantly overrepresented in CT-negative samples at visit 2 compared to visit 1 samples (negative  $\log_2$  fold change), this after correcting for multiple testing (Supplementary Table 7 and Supplementary Figure 4).

#### Long-Lasting Effect of CT Infection and Azithromycin Treatment on the Vaginal Microbiota

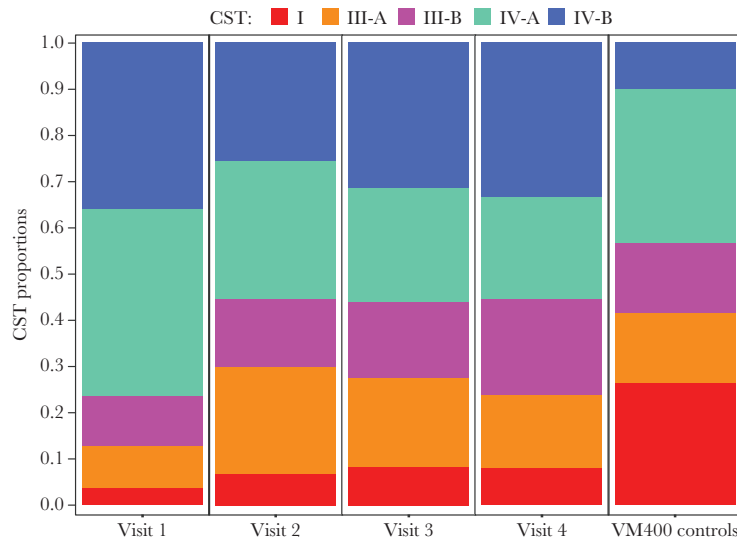
The composition and structure of the vaginal microbiota in CT-negative samples at visit 3 and visit 4 (6 months and 9 months after azithromycin treatment:  $n = 73$  and  $n = 63$ , respectively) were analyzed to evaluate whether CT infection and azithromycin treatment had a long-term effect on the vaginal microbiota. While a major shift in CST was observed between visit 1 and visit 2 (probably due to CT infection and azithromycin treatment as suggested above), the proportions of CST III and CST IV remained stable from visit 2 to visit 4 while women remained CT negative (Figure 3). Interestingly, *L. iners* relative abundance increased greatly after azithromycin treatment (visit 1 to visit 2; Figure 4A) whereas *Sneathia sanguinegens* decreased, but the relative abundance of no phylotype was statistically significantly different between visit 2 and visit 4 (Figure 4B and 4C). Shannon diversity was significantly higher in CHARM visit 1 samples compared to other CHARM samples and VM400 samples, and no difference was found between visits 2, 3, and 4 (Supplementary Table 8 and Supplementary Figure 5).

#### *L. iners* and *G. vaginalis* Strain Resistance to Azithromycin

To evaluate whether the patterns we observed were associated with antibiotic resistance of phylotypes associated with CST IV (*G. vaginalis*) and CST III (*L. iners*), we performed antimicrobial susceptibility tests of 2 front-line antibiotic treatments for CT genital infection, azithromycin and doxycycline, on several strains of these 2 species (Figure 5 and Supplementary Table 9). We observed low resistance to azithromycin (0.094–1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for *L. crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, and *Lactobacillus gasseri*; however, some *L. iners* (5/10) and *G. vaginalis* (1/8) strains were resistant to the highest concentration of azithromycin tested (256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). In contrast, doxycycline sensitivity was similar for all inspected vaginal species (0.016–12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), and no doxycycline resistance was observed.

#### Community-State Types Transition Patterns From One Visit to Another According to CT Infection Status

For each CHARM participant with follow-up samples ( $n = 100$ ), we generated CST transition patterns over the course of the

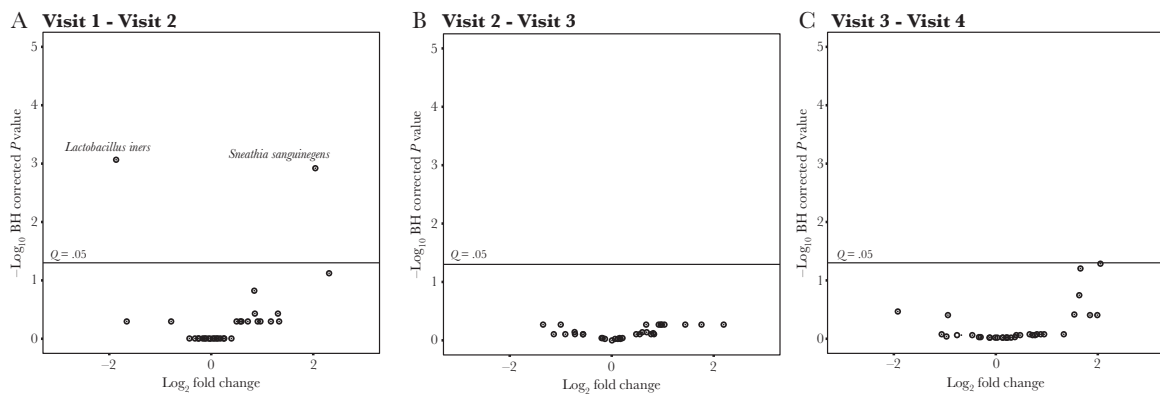


**Figure 3.** Community state type (CST) proportions in Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) samples from visit 1 (*Chlamydia trachomatis* [CT] positive, pretreatment), visit 2 (CT negative only, 3 months posttreatment), visit 3 (CT negative only, 6 months posttreatment), and visit 4 (CT negative only, 9 months posttreatment) and in VM400 controls.

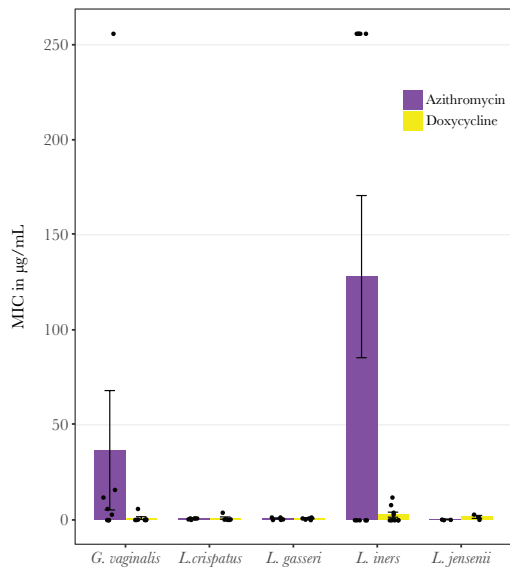
study (Figure 6A). Analysis of individual trajectories confirmed our findings that women commonly transitioned to *L. iners*-dominated CST III-A after azithromycin treatment. However, over time, women who were CST IV-A and CST IV-B before treatment and transitioned to CST III at visit 2 then transitioned back to CST IV or CST III-B, which both contain significant levels of strict and facultative anaerobes. We further stratified these CST transition patterns by restricting the analysis to (1) participants who shifted from CT positive at visit 1, 2, or 3 to CT negative at the following visit (Figure 6B); (2) participants

who remained CT negative for 2 consecutive visits (Figure 6C); and (3) participants who tested CT negative at visit 2 or 3 but CT positive at the following visit (Figure 6D).

Transitions from CT positive to CT negative (Figure 6B) at any time during the study period (after azithromycin treatment) were mostly associated with a transition to CST III-A (+75%), supporting the findings obtained when comparing CHARM visit 1 (CT positive) to CHARM visit 2 (CT negative). These transitions were observed in women who were either CST III-B or CST IV-A/B when CT positive. Surprisingly, CST I was observed after



**Figure 4.** Volcano plots displaying results of negative binomial regression model using the DESeq2 package on R [29], comparing phylotypes differentially expressed between Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) samples: visit 1 (*Chlamydia trachomatis* [CT] positive) to visit 2 (CT negative) (A), visit 2 (CT negative) to visit 3 (CT negative) (B), visit 3 (CT negative) to visit 4 (CT negative) (C), for phylotypes present in at least 20% of samples for each analysis (33, 32, and 34 phylotypes, respectively). The log<sub>2</sub> fold change is plotted against the -log<sub>10</sub> of the *Q* value, which is the *P* value corrected for multiple testing using Benjamini–Hochberg correction (BH). Positive values of the log<sub>2</sub> fold change indicate phylotypes overrepresented in the first visit of the 2 visits considered, whereas negative values indicate phylotypes overrepresented in the second visit.



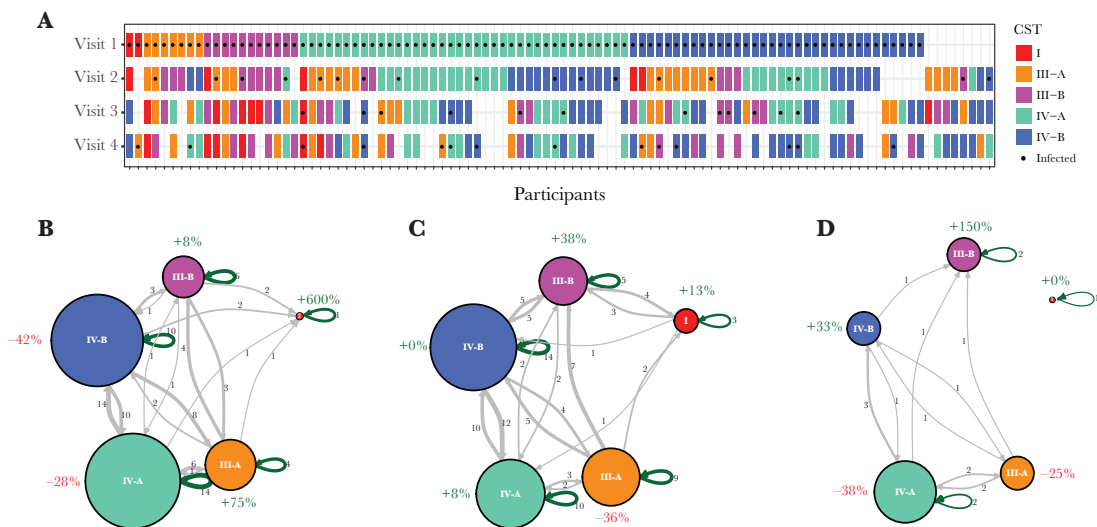
**Figure 5.** Antimicrobial susceptibility test of 5 major vaginal bacterial species for azithromycin and doxycycline. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by broth microdilution protocol [32] with concentrations ranging from 0.016 µg/mL to 256 µg/mL. Number of strains tested: *Gardnerella vaginalis*: 8; *Lactobacillus crispatus*: 6; *Lactobacillus gasseri*: 5; *Lactobacillus iners*: 10; *Lactobacillus jensenii*: 3.

azithromycin treatment, despite the fact that in vitro *L. crispatus* was shown to be sensitive to azithromycin. As expected, in the absence of azithromycin treatment (CT negative at 2 consecutive

visits; Figure 6C), we observed limited CST transitions that did not affect the overall CST proportions (Figure 3). Transitions between CST III-B and CST IV-A were rare, whereas subgroup transitions within CST IV and within CST III were more frequent. We also observed very few transitions between CST I and CST IV-B (n = 1 of 61 transitions overall) or CST IV-A (n = 1 of 61) (Supplementary Figure 6 and Supplementary Table 10). In cases of transitions from CT negative to CT positive, there was an increase of CST III-B (+150%) and CST IV-B (+33%), though numbers were too small to draw any conclusions. As expected, no transition to CST I was observed (Figure 6D).

## DISCUSSION

By evaluating the vaginal microbiota composition and structure at time of CT infection and every 3 months for 9 months after azithromycin treatment, our study identified specific characteristics of the vaginal microbiota associated with CT infection and resolution. Unsurprisingly, the vaginal microbiota of women infected with CT in CHARM encompassed bacterial taxa commonly associated with BV or CST IV, including *G. vaginalis*, *A. vaginae*, or *M. curtisii* [33–37]. It is important to note that studies of the vaginal microbiota during prevalent CT infection do not resolve whether the observed microbiota is causal to the increased risk of CT infection, or if it is a consequence of CT infection. To potentially establish causality, prospective longitudinal studies must be performed and focused on incident cases of infection. Such a study undertaken in the Netherlands has indicated that women presenting an *L. iners*-dominated CST



**Figure 6.** Transitions between community state types (CSTs) from one visit to another in Chlamydia Adolescent/Adult Reproductive Management (CHARM) samples. A, Individual trajectories of women included in the study. B, CST transitions from *Chlamydia trachomatis* (CT)-positive samples pretreatment to CT-negative samples posttreatment at 2 consecutive visits. C, CST transitions among CT-negative samples at 2 consecutive visits. D, CST transitions from CT-negative samples to CT-positive samples at 2 consecutive visits. The number next to a line represents the number of women transitioning from one CST to another. Looped arrows represent the number of women staying in the same CST between 2 visits and are colored green. In B, C, and D, circle size is proportional to total frequency of CSTs.



III were at increased risk of CT infection compared to women with *L. crispatus*-dominated CST I [38]. While *L. iners* often dominates CST III, it can share the ecological niche with other bacterial taxa, such as *G. vaginalis*, *A. vaginae*, and other strict and facultative anaerobes, whose presence could limit the potential benefit of having a *Lactobacillus* spp–dominated vaginal microbiota. When that is the case, CST III is thought to transition more frequently to CST IV, as previously observed in longitudinal studies of the vaginal microbiota [16, 18], particularly following antibiotic treatment for BV [20]. Importantly, it is well established that CST IV is associated with an increased risk for CT infection [12, 39].

The longitudinal study design of CHARM gave us the unique opportunity to observationally study the vaginal microbiota following azithromycin treatment. Interestingly, we found that 3 months after azithromycin treatment for CT infection, most women had vaginal microbiota that were either CST IV or CST III-A. The relative frequency of each CST in CT-negative women at visit 2 was significantly different from that observed in our control CT-negative cohort drawn from the same clinic. Modeling the transitions from visit 1 to visit 2 demonstrated that after azithromycin treatment, *L. iners* relative abundance (and CST III) increases substantially. Because of the observational and interval censored study design, we cannot differentiate azithromycin's direct effects (observed 3 months later) vs the community changes resulting from CT clearance. However, we hypothesize that the observed microbiota could be explained by either the effect of antibiotic exposure or by a return to a preinfection vaginal microbiota or a combination of both. We observed that strains of *L. iners* and *G. vaginalis* displayed a higher level of resistance to azithromycin, and thus could be selected posttreatment, whereas sensitive *Lactobacillus* spp were diminished. Nonetheless, because *L. iners* is a potential risk factor for CT infection [40], this finding is important as it suggests that after antibiotic treatment, a woman's risk of STI is not reduced. This result could contribute significantly to the high rate of reinfections observed in CHARM and in other studies (20–30 cases per 100 person-years [22, 23]). In our cohort, 74.2% of women reported at baseline having been CT positive in the last 3 months. Though this could be due to (re-)exposure to infected partners, it is likely that they received antibiotic treatment, thus maintaining their susceptibility to reinfection. Another study evaluating the effect of metronidazole treatment for BV showed that *L. iners* was often increased after antibiotic treatment, sometimes replacing *G. vaginalis* [20]. Thus metronidazole treatment can also result in nonoptimal vaginal microbiota. More importantly, we provide evidence that a posttreatment vaginal microbiota remains stable for up to 9 months with high relative abundances of *L. iners* and *G. vaginalis*, resulting in persistently increased CT infection risk.

Interestingly, doxycycline, another recommended antibiotic for CT infection, efficiently killed all strains tested in

our minimum inhibitory concentration studies. Though both antibiotics are reported to be 95% effective to treat CT infection, a meta-analysis reported doxycycline as more effective than azithromycin [41]. If, in vivo, azithromycin eliminates *L. crispatus*, *L. jensenii*, and *L. gasseri*, which are considered beneficial [42–47], the treatment would favor the proliferation of *L. iners* or *G. vaginalis*, thus increasing the risk of CT infection. This result is novel since only one previous study reported no effect of azithromycin on 4 strains of *G. vaginalis* and 2 of *L. iners* [48]. This finding supports the use of live biotherapeutic products to restore a protective vaginal microbiota after antibiotic treatment for CT and potentially for other health conditions treated by antibiotics. Unfortunately, very little is known about the effect of frequently used antibiotics on the vaginal microbiota.

Our study presents some limitations. Owing to our inclusion criteria focusing on CT-positive women at baseline, we are unable to determine whether bacterial phylotypes and CSTs overrepresented in CHARM visit 1 CT-positive samples were present before infection. Similarly, we are unable to distinguish between CT clearance or antibiotic treatment as the causal determinant in microbiota composition. However, we found that some strains of *L. iners* and *G. vaginalis* are resistant to azithromycin, which could explain the observed patterns. Unfortunately, the study was not sufficiently powered to detect a statistically significant impact of reinfection at visits 3 or 4. Finally, we used a cohort of 99 healthy African American women from the same geographical area and clinic for recruitment as a control population in our analyses. However, the CHARM cohort is not entirely African American (87.4%), and we cannot exclude that they differ for other characteristics.

This study has potentially important consequences for the management and control of CT infections. It confirms the association between CT infection and not only non-*Lactobacillus* spp microbiota, but also microbiota dominated by *L. iners*. Furthermore, the study shows that high risk for infection may be maintained in part by antibiotic treatment. Our results stress the importance of taking into account the potential perturbing effects of antibiotic treatment on the vaginal microbiota, whether it is for the treatment of CT infections or other indications. Studies of the effect of antibiotic therapy on the composition of the vaginal microbiota are urgently needed. Such studies will provide the necessary guidance in the development of strategies to protect and restore optimal vaginal microbiota composition prior to and after antibiotic treatment.

#### Supplementary Data

Supplementary materials are available at *The Journal of Infectious Diseases* online. Consisting of data provided by the authors to benefit the reader, the posted materials are not copyedited and are the sole responsibility of the authors, so questions or comments should be addressed to the corresponding author.

## Notes

**Acknowledgments.** The authors thank the participants of the CHARM and VM400 studies and the clinical team for their assistance in recruiting participants. The authors also thank Elias McComb for technical help with the antibiograms assays.

**Disclaimer.** The contents of this manuscript are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the National Institutes of Health (NIH), the Institut Pasteur, or the University of Maryland School of Medicine.

**Financial support.** Research reported in this publication was supported by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases of the NIH (award numbers U19AI084044, UH2AI083264, and R21AI130627). J. T. was supported by a fellowship from the Région Ile-de-France.

**Potential conflicts of interest.** J. R. is co-founder of LUCA Biologics, a biotechnology company focusing on translating microbiome research into live biotherapeutics drugs for women's health. All other authors report no potential conflicts of interest.

All authors have submitted the ICMJE Form for Disclosure of Potential Conflicts of Interest. Conflicts that the editors consider relevant to the content of the manuscript have been disclosed.

## References

- Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease surveillance 2017. Atlanta, GA: CDC, 2018.
- Zimmerman HL, Potterat JJ, Dukess RL, et al. Epidemiologic differences between chlamydia and gonorrhea. *Am J Public Health* 1990; 80:1338–42.
- Centers for Disease Control and Prevention. STD rates by age. <https://www.cdc.gov/std/stats18/adolescents.htm>. Accessed 3 July 2019.
- Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, et al. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ* 2010; 340:c1642.
- Price MJ, Ades AE, Welton NJ, Simms I, Macleod J, Horner PJ. Proportion of pelvic inflammatory disease cases caused by *Chlamydia trachomatis*: consistent picture from different methods. *J Infect Dis* 2016; 214:617–24.
- Carey AJ, Beagley KW. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic: effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol* 2010; 63:576–86.
- Ma B, Forney LJ, Ravel J. Vaginal microbiome: rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol* 2012; 66:371–89.
- Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis* 2003; 36:663–8.
- Peters SE, Beck-Sagué CM, Farshy CE, et al. Behaviors associated with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis*: cervical infection among young women attending adolescent clinics. *Clin Pediatr (Phila)* 2000; 39:173–7.
- Martin HL, Richardson BA, Nyange PM, et al. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. *J Infect Dis* 1999; 180:1863–8.
- Cherpes TL, Meyn LA, Krohn MA, Lurie JG, Hillier SL. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2003; 37:319–25.
- Brotman RM, Klebanoff MA, Nansel TR, et al. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis* 2010; 202:1907–15.
- Quinn TC, Gaydos C, Shepherd M, et al. Epidemiologic and microbiologic correlates of *Chlamydia trachomatis* infection in sexual partnerships. *JAMA* 1996; 276:1737–42.
- Lycke E, Löwhagen GB, Hallhagen G, Johannisson G, Ramstedt K. The risk of transmission of genital *Chlamydia trachomatis* infection is less than that of genital *Neisseria gonorrhoeae* infection. *Sex Transm Dis* 1980; 7:6–10.
- Katz BP. Estimating transmission probabilities for chlamydial infection. *Stat Med* 1992; 11:565–77.
- Gajer P, Brotman RM, Bai G, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012; 4:132ra52.
- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(Suppl 1):4680–7.
- Ravel J, Brotman RM, Gajer P, et al. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 2013; 1:29.
- Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond JA, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 2013; 1:12.
- Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 2010; 5:e10197.
- Relman DA. The human microbiome: ecosystem resilience and health. *Nutr Rev* 2012; 70(Suppl 1):S2–9.
- Walker J, Tabrizi SN, Fairley CK, et al. *Chlamydia trachomatis* incidence and re-infection among young women—behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One* 2012; 7:e37778.
- Scott Lamontagne D, Baster K, Emmett L, et al; Chlamydia Recall Study Advisory Group. Incidence and reinfection rates of genital chlamydial infection among women aged 16–24 years attending general practice, family planning

- and genitourinary medicine clinics in England: a prospective cohort study by the Chlamydia Recall Study Advisory Group. *Sex Transm Infect* **2007**; 83:292–303.
24. Mark K, Martinez-Greife S, Bavoil P, Brotman R, Terplan M, Ravel J. Chlamydia in adolescent/adult reproductive management trial study (CHARM): clinical core protocol. *Contemp Clin Trials* **2019**. Available at: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2451865419300936>.
  25. Fadrosch DW, Ma B, Gajer P, et al. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16S rRNA gene sequencing on the Illumina MiSeq platform. *Microbiome* **2014**; 2:6.
  26. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJ, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* **2016**; 13:581–3.
  27. Holm JB, Humphrys MS, Robinson CK, et al. Ultrahigh-throughput multiplexing and sequencing of >500-base-pair amplicon regions on the Illumina HiSeq 2500 Platform. *mSystems* **2019**; 4. doi:10.1128/mSystems.00029-19.
  28. Bent SJ, Forney LJ. The tragedy of the uncommon: understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J* **2008**; 2:689–95.
  29. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**; 15:550.
  30. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**; 108(Suppl 1):4680–7.
  31. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of Gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* **1991**; 29:297–301.
  32. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* **2008**; 3:163–75.
  33. Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med* **2005**; 353:1899–911.
  34. Yen S, Shafer MA, Moncada J, Campbell CJ, Flinn SD, Boyer CB. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol* **2003**; 102:927–33.
  35. Yoshimura K, Yoshimura M, Kobayashi T, Kubo T, Hachisuga T, Kashimura M. Can bacterial vaginosis help to find sexually transmitted diseases, especially chlamydial cervicitis? *Int J STD AIDS* **2009**; 20:108–11.
  36. Ness RB, Hillier SL, Richter HE, et al. Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstet Gynecol* **2002**; 100:765.
  37. Tamarelle J, Thiébaud ACM, de Barbeyrac B, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. The vaginal microbiota and its association with human papillomavirus, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Mycoplasma genitalium* infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* **2019**; 25:35–47.
  38. van Houdt R, Ma B, Bruisten SM, Speksnijder AGCL, Ravel J, de Vries HJC. *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to *Chlamydia trachomatis* infection in Dutch women: a case-control study. *Sex Transm Infect* **2018**; 94:117–23.
  39. Aghaizu A, Reid F, Kerry S, et al. Frequency and risk factors for incident and redetected *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active, young, multi-ethnic women: a community based cohort study. *Sex Transm Infect* **2014**; 90:524–8.
  40. Edwards VL, Smith SB, McComb EJ, et al. The cervicovaginal microbiota-host interaction modulates *Chlamydia trachomatis* infection. *MBio* **2019**; 10. doi:10.1128/mBio.01548-19.
  41. Kong FY, Tabrizi SN, Law M, et al. Azithromycin versus doxycycline for the treatment of genital chlamydia infection: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis* **2014**; 59:193–205.
  42. Kashket ER. Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol* **1987**; 46:233–44.
  43. Russell JB, Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* **1998**; 39:205–34.
  44. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* **2000**; 66:2001–5.
  45. Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev Infect Dis* **1990**; 12:856–72.
  46. Boskey ER, Telsch KM, Whaley KJ, Moench TR, Cone RA. Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun* **1999**; 67:5170–5.
  47. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* **2001**; 16:1809–13.
  48. De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, et al. Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*. *BMC Infect Dis* **2006**; 6:51.

## C.2 Distribution des phylotypes de l'étude CHARM et de l'étude VM400

L'application de modèles de régression binomiale négative comme dans le package *DESeq2* et de régression binomiale négative à excès de zéros pour chaque phylotype suppose une sur-représentation des zéros dans la distribution de chaque phylotype. Le tableau C.1, le tableau C.2 et le tableau C.3 présentent la distribution des phylotypes pour les analyses de la visite 1 versus VM400, de la visite 2 versus VM400 et de la visite 1 versus la visite 2.

TABLE C.1 – Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 99 échantillons VM400 et 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon.

Phylotypes	Nombre de zéros (n)	Proportions de zéros (%)	Nombre maximal de séquences
<i>Lactobacillus gasseri</i>	186	77.5	15840
Genre <i>Lactobacillus</i>	177	73.8	904
<i>Howardella ureilytica</i>	186	77.5	674
<i>Lactobacillus crispatus</i>	136	56.7	15986
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	165	68.8	113
<i>Lactobacillus jensenii</i>	172	71.7	10673
<i>Lactobacillus iners</i>	20	8.3	16000
<i>Dialister succinatiphilus</i>	106	44.2	2296
<i>Prevotella colorans</i>	155	64.6	1408
Famille <i>Clostridiales</i> XI	176	73.3	683
<i>Prevotella amnii</i>	133	55.4	3657
<i>Prevotella bivia</i>	164	68.3	2856
<i>Prevotella buccalis</i>	185	77.1	702
<i>Prevotella timonensis</i>	122	50.8	3252
<i>Dialister micraerophilus</i>	117	48.8	250
Genre <i>Prevotella</i>	115	47.9	3762
<i>Streptococcus anginosus</i>	186	77.5	1038
Genre <i>Bacteroidales</i>	183	76.3	160
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	91	37.9	990
Genre <i>Megasphaera</i>	84	35.0	3187
<i>Mycoplasma hominis</i>	165	68.8	863
Genre <i>Peptoniphilus</i>	174	72.5	419
<i>Sneathia sanguinegens</i>	91	37.9	13424
Phylum <i>Proteobacteria</i>	160	66.7	3165
<i>Anaerococcus prevotii</i>	92	38.3	2700
<i>Fingoldia magna</i>	37	15.4	2479
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	139	57.9	806
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	168	7.0	255
BVAB2	105	43.8	2624
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	89	37.1	1464
<i>Gardnerella vaginalis</i>	31	12.9	14458
BVAB1	152	63.3	13159
<i>Aerococcus christensenii</i>	88	36.7	2245
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	161	67.1	129
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	164	68.3	123
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	136	56.7	2749
<i>Atopobium vaginae</i>	63	26.3	7566
<i>Gemella haemolysans/asaccharolytica</i>	95	39.6	2946
<i>Mobiluncus curtisii</i>	170	70.8	3098
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	172	71.7	2945

Le nombre de séquences par échantillon pour chaque phylotype a d'abord été rapporté au nombre total de séquences de cet échantillon puis multiplié par la médiane du nombre de séquences dans les études VM400 et CHARM.

TABLE C.2 – Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 99 échantillons VM400 et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon.

Phylotypes	Nombre de zéros (n)	Proportions de zéros (%)	Nombre maximal de séquences
<i>Lactobacillus gasseri</i>	126	72.8	15840
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	135	78.0	114
Famille <i>Aerococcaceae</i>	138	79.8	134
Famille <i>Bifidobacteriaceae</i>	130	75.1	132
Famille <i>Clostridiaceae</i> 1	136	78.6	126
Ordre <i>Clostridiales</i>	136	78.6	51
Famille <i>Clostridiales XI</i>	121	69.9	387
<i>Howardella ureilytica</i>	134	77.5	674
<i>Streptococcus anginosus</i>	136	78.6	1038
<i>Staphylococcus hominis</i>	138	79.8	61
<i>Prevotella disiens</i>	137	79.2	2961
<i>Dialister succinatiphilus</i>	91	52.6	2296
<i>Lactobacillus jensenii</i>	113	65.3	10673
<i>Prevotella amnii</i>	122	70.5	3221
<i>Prevotella colorans</i>	118	68.2	1422
<i>Prevotella timonensis</i>	90	52.0	3252
<i>Prevotella buccalis</i>	128	74.0	702
<i>Lactobacillus reuteri</i>	137	79.2	427
Genre <i>Lactobacillus</i>	109	63.0	4902
<i>Sneathia sanguinegens</i>	90	52.0	8533
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	136	78.6	519
Genre <i>Peptoniphilus</i>	130	75.1	135
Genre <i>Megasphaera</i>	81	47.4	3187
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	87	50.3	990
<i>Dialister micraerophilus</i>	80	46.2	250
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	105	60.7	199
<i>Prevotella bivia</i>	107	61.8	2900
Genre <i>Prevotella</i>	100	57.7	4350
<i>Peptoniphilus coxii</i>	137	79.2	800
<i>Mobiluncus curtisii</i>	129	74.6	296
<i>Lactobacillus coleohominis</i>	136	78.6	262
<i>Mycoplasma hominis</i>	120	69.4	863
<i>Lactobacillus iners</i>	13	7.5	16000
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	109	63.0	1044
Phylum <i>Proteobacteria</i>	125	72.3	3314
BVAB1	127	73.4	9667
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	123	71.1	1123
<i>Gardnerella vaginalis</i>	32	18.5	13754
BVAB2	99	57.2	1451
<i>Aerococcus christensenii</i>	73	42.2	1256
<i>Fingoldia magna</i>	40	23.1	7799
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	131	75.7	84

(Suite)			
Phylotypes	Nombre de zéros (n)	Proportions de zéros (%)	Nombre maximal de séquences
<i>Anaerococcus prevotii</i>	70	40.5	4980
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	74	42.8	3493
<i>Gemella haemolysans/asaccharolytica</i>	95	54.9	1488
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	132	76.3	171
<i>Atopobium vaginae</i>	66	57.2	1451
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	132	76.3	1432
<i>Lactobacillus crispatus</i>	91	52.6	15986

Le nombre de séquences par échantillon pour chaque phylotype a d'abord été rapporté au nombre total de séquences de cet échantillon puis multiplié par la médiane du nombre de séquences dans les études VM400 et CHARM.

Le modèle de régression binomiale négative à excès de zéros n'a pas convergé pour *Lactobacillus crispatus*. Il est présenté ici séparément.

TABLE C.3 – Distribution des phylotypes présents dans au moins 20% des 141 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs), exprimée par le nombre de zéros, la proportion de zéros par rapport au nombre total d'échantillons et le nombre maximal de séquences dans un échantillon.

Phylotypes	Nombre de zéros (n)	Proportions de zéros (%)	Nombre maximal de séquences
<i>Lactobacillus crispatus</i>	163	75.8	15759
<i>Lactobacillus iners</i>	13	7.4	16000
<i>Anaerococcus prevotii</i>	90	41.9	4980
<i>Prevotella bivia</i>	162	75.8	2900
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	162	75.3	199
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	89	59.5	1044
<i>Fingoldia magna</i>	47	21.9	7799
<i>Mycoplasma hominis</i>	137	63.7	360
Genre <i>Prevotella</i>	113	52.6	4350
<i>Dialister micraerophilus</i>	113	52.6	114
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	138	64.2	171
<i>Prevotella colorans</i>	147	68.4	1422
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	156	72.6	2945
<i>Atopobium vaginae</i>	45	20.9	7611
BVAB2	84	39.1	2624
<i>Gemella haemolysans/asaccharolytica</i>	72	33.5	2946
Phylum <i>Proteobacteria</i>	155	72.1	3314
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	128	59.5	1044
<i>Howardella ureilytica</i>	170	79.1	59
<i>Prevotella timonensis</i>	132	61.4	2895
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	76	35.3	455
<i>Dialister succinatiphilus</i>	101	47.0	652
<i>Aerococcus christensenii</i>	73	34.0	2245
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	134	62.3	129
<i>Gardnerella vaginalis</i>	25	11.6	14458
Genre <i>Megasphaera</i>	64	29.8	2886
<i>Prevotella amnii</i>	117	54.4	3657
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	125	58.1	2749
<i>Lactobacillus jensenii</i>	159	74.0	9927
BVAB1	127	59.1	13159
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	156	72.6	255
<i>Sneathia sanguinegens</i>	71	33.0	13424
<i>Mobiluncus curtisii</i>	155	72.1	3098

Le nombre de séquences par échantillon pour chaque phylotype a d'abord été rapporté au nombre total de séquences de cet échantillon puis multiplié par la médiane du nombre de séquences dans les études VM400 et CHARM.



### C.3 Tests de Student appariés sur l'abondance des phylotypes entre les visites 1 et 2 dans l'étude CHARM

L'utilisation d'un modèle de régression binoiale négative dans le package *DESeq2* ne permet pas de prendre en compte la corrélation entre les échantillons de la visite 1 et ceux de la visite 2. Nous avons donc appliqué des tests de Student appariés sur l'abondance des phylotypes à ces visites (tableau C.4), en ne sélectionnant que les femmes avec un échantillon à chaque visite. Seule *L. iners* est à la limite de la significativité après correction pour tests multiples.

TABLE C.4 – Tests de Student appariés sur 74 échantillons CHARM Visite 1 (CT-positifs) et 74 échantillons CHARM Visite 2 (CT-négatifs).

Phylotypes	Moyenne du nombre de séquences - Visite 1 (n)	Moyenne du nombre de séquences - Visite 2	Différence	P-value	Q-value*
<i>Lactobacillus iners</i>	3176	5678	2502	0.00210	0.06931
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4993	3273	-1719	0.00493	0.08130
<i>Lactobacillus crispatus</i>	221	1112	891	0.02472	0.21713
<i>Atopobium vaginae</i>	1309	1282	-27	0.90327	0.94649
<i>Lactobacillus jensenii</i>	144	481	337	0.04738	0.21885
BVAB1	1176	862	-314	0.34158	0.66306
<i>Anaerococcus prevotii</i>	197	347	151	0.22477	0.46358
Genre <i>Megasphaera</i>	603	427	-176	0.09541	0.26499
<i>Fingoldia magna</i>	380	250	-131	0.05305	0.21885
<i>Sneathia sanguinogens</i>	852	306	-546	0.02632	0.21713
<i>Gemella haemolysans/asaccharolytica</i>	115	104	-12	0.73654	0.94436
BVAB2	275	225	-50	0.45064	0.71960
Famille <i>Coriobacteriaceae</i>	66	56	-10	0.47971	0.71960
<i>Peptoniphilus gorbachii</i>	175	102	-72	0.09636	0.26499
Genre <i>Prevotella</i>	125	132	7	0.91781	0.94649
<i>Aerococcus christensenii</i>	115	95	-20	0.65801	0.90476
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	142	102	-40	0.53949	0.77405
<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	47	51	5	0.78727	0.94649
<i>Mobiluncus curtisii</i>	133	20	-113	0.04933	0.21885
Phylum <i>Proteobacteria</i>	142	128	-15	0.82924	0.94649
<i>Prevotella amnii</i>	181	65	-116	0.07831	0.25842
<i>Prevotella colorans</i>	23	48	25	0.38706	0.70960
<i>Arcanobacterium hippocoleae</i>	17	6	-11	0.05203	0.21885
Famille <i>Ruminococcaceae</i>	112	52	-60	0.21008	0.46217
<i>Dialister succinatiphilus</i>	52	31	-21	0.19367	0.45651
<i>Mycoplasma hominis</i>	25	24	-1	0.90169	0.94649
<i>Prevotella timonensis</i>	165	107	-58	0.43180	0.71960
<i>Actinomyces hongkongensis</i>	13	8	-5	0.12749	0.32363
<i>Dialister micraerophilus</i>	17	17	0	0.96918	0.96918
<i>Prevotella bivia</i>	49	87	38	0.47973	0.71960
<i>Howardella ureilytica</i>	3	3	0	0.91297	0.94649
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	5	6	1	0.74404	0.94436
Famille <i>Erysipelotrichaceae</i>	12	6	-6	0.06034	0.22126

Le nombre de séquences par échantillon pour chaque phylotype a d'abord été rapporté au nombre total de séquences de cet échantillon puis multiplié par la médiane du nombre de séquences dans les études VM400 et CHARM.

\*La Q-value est la P-value corrigée pour les tests multiples par la correction de Benjamini-Hochberg.

## C.4 Test de sensibilité de souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l'azithromycine et la doxycycline

TABLE C.5 – Test de sensibilité antibactérienne sur des souches de cinq espèces bactériennes vaginales pour l'azithromycine et la doxycycline.

Espèce	Souche	Concentration d'azithromycine	Concentration de doxycycline
<i>G. vaginalis</i>	1	12	6
	2	0,125	0,19
	3	16	0,5
	4	3	0,19
	5	0,125	0,25
	6	256	0,38
	7	6	0,19
	8	0,032	0,125
<i>L. crispatus</i>	1	1	0,25
	2	1	0,25
	3	1	0,38
	4	0,25	4
	5	1	0,5
	6	0,5	0,5
<i>L. gasseri</i>	1	1,5	1
	2	1,5	1
	3	0,25	1,5
	4	0,19	0,38
	5	5	0,125
<i>L. iners</i>	1	0,064	8
	2	0,016	12
	3	0,016	0,016
	4	0,023	0,064
	5	256	4
	6	256	3
	7	256	0,016
	8	256	0,032
	9	0,016	0,023
	10	256	0,5
<i>L. jensenii</i>	1	0,38	3
	2	0,25	1,5
	3	0,094	0,25

La Concentration Minimale Inhibitrice (CMI) a été déterminée par un protocole de microdilution en milieu liquide [154] avec des concentrations allant de 0,016 à 256 µg/mL.



## Annexe

# D

## Ayant trait à la partie IV

### D.1 Notification des menstruations dans les deux études

Dans l'étude HMP-UMB, les menstruations rapportées dans les journaux intimes des participantes étaient beaucoup moins régulières que celles rapportées dans l'étude DC, d'où des HR plus faibles dans l'étude HMP-UMB par rapport à l'étude DC (figure D.1 et figure D.2).

### D.2 Analyse non stratifiée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non dominé par des *Lactobacillus*

Dans les deux études, les menstruations étaient associées à un risque accru de transition vers un LL-VMB le jour même (HR 3,18 IC 95% 1,86-5,43 et 2,09 IC 95% 1,51-2,89) ou dans les jours suivants (tableau D.1 et tableau D.2). Dans l'étude DC seule, l'usage du préservatif était également associé à un risque accru de transition vers un LL-VMB avec un hazard ratio de 6,43 (IC 95% 1,80-22,92), même si le nombre d'événements de ce type rapporté est limité.

En termes de transition vers un HL-VMB, les menstruations diminuent la probabilité de revenir à un HL-VMB dans l'étude DC (0,41 IC 95% 0,18-0,95 le jour même). Le fait d'être d'origine hispanique diminue aussi cette probabilité, avec un hazard ratio de 0,15 (IC 95% 0,03-0,74). Enfin, des résultats contradictoires apparaissent dans les deux études sur le port de sous-vêtement string, le string étant associé à une moindre probabilité de transition vers un HL-VMB dans l'étude DC (0,22 IC 95% 0,06-0,84) le jour même) et à une plus forte probabilité dans l'étude HMP (1,72 IC 95% 1,13-2,61 dans les 48h et 1,69 IC 95% 1,09-2,63 dans les 72h).

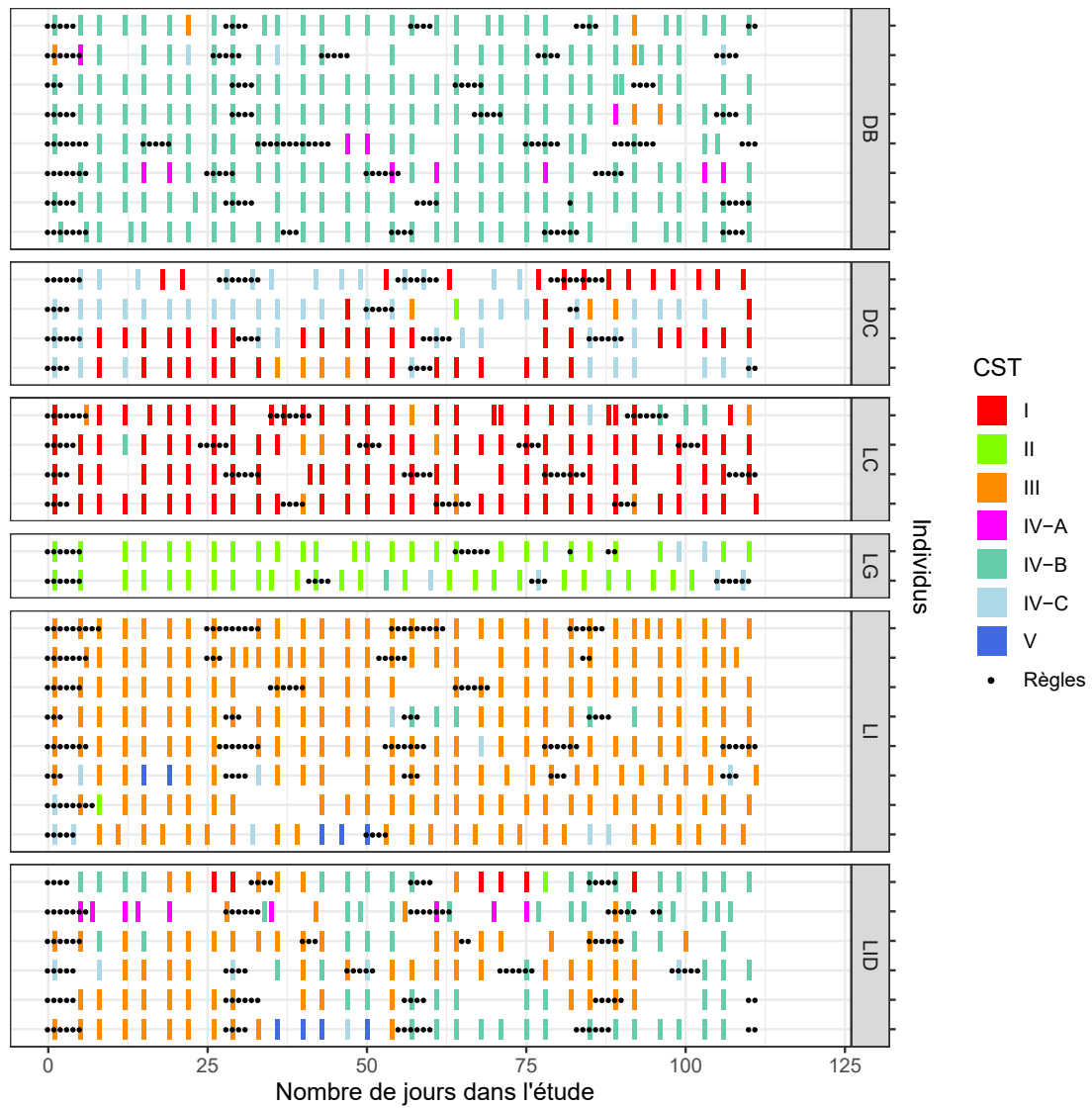


FIGURE D.1 – Dynamique des types d'état communautaire (CST) et notification des menstruations au cours du temps par femme, dans l'étude "Douching Cessation" (DC - N=32).

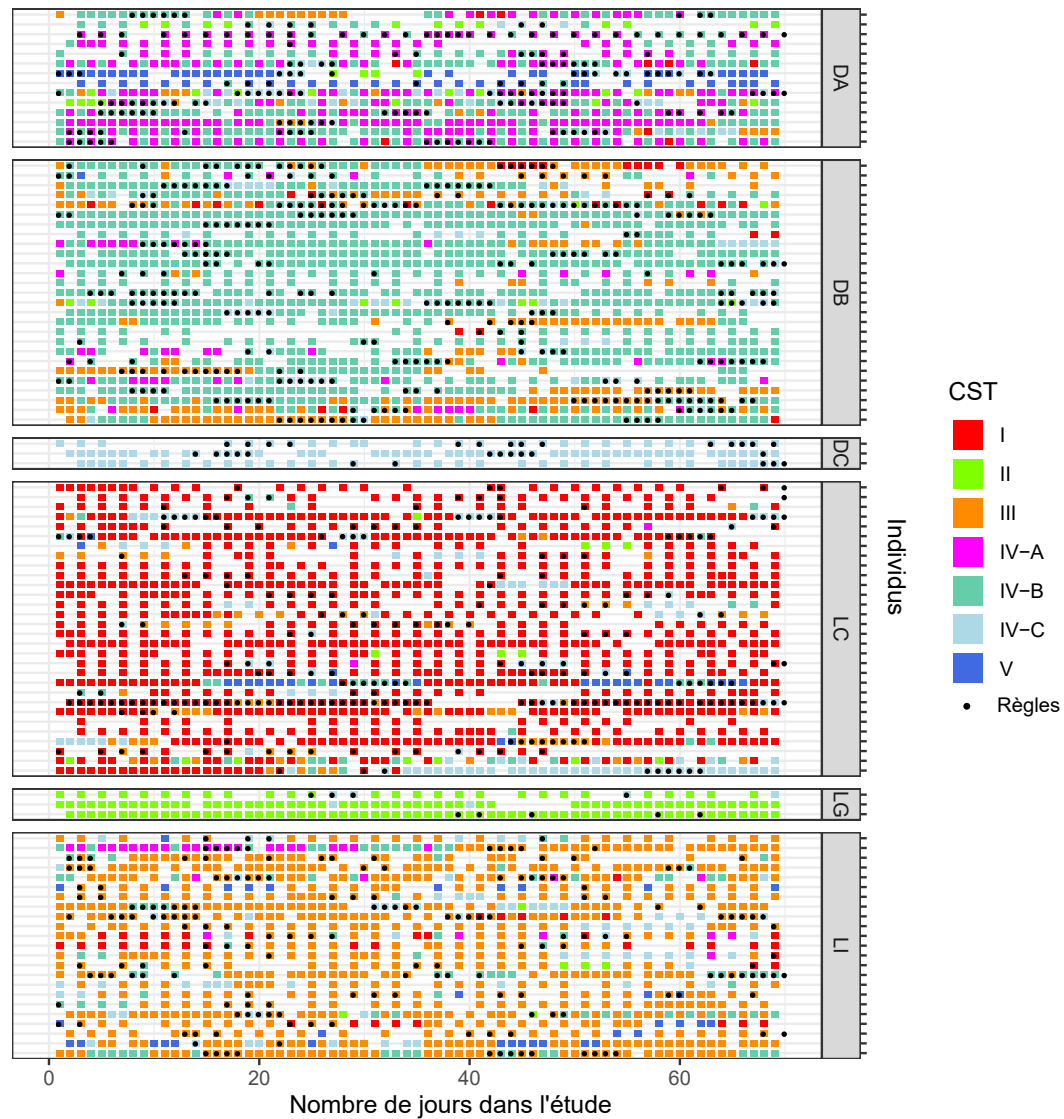


FIGURE D.2 – Dynamique des types d'état communautaire (CST) et notification des menstruations au cours du temps par femme, dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

TABLE D.1 – Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des *Lactobacillus* (LL-VMB) dans l'étude "Douching Cessation" (DC - N=32).

Etude DC Covariables	Incidence LL-VMB			Rémission vers HL-VMB			
	N	HR	IC 95%	N	HR	IC 95%	p-value
Age							
Plus de 40 ans	235/554	1,23	0,47-3,25	143/396	2,97	0,84-10,60	0,09259
30-39 ans	199/554	0,90	0,31-2,64	198/396	1,66	0,41-6,67	0,47821
18-29 ans	120/554	ref	-	55/396	ref	-	-
Race							
Africaine-Américaine	215/554	1,39	0,68-2,83	250/396	0,74	0,38-1,42	0,36452
Hispanique ou autre	56/554	0,71	0,16-3,24	33/396	0,15	0,03-0,73	0,01884
Blanche	283/554	ref	-	113/396	ref	-	-
Contraception							
Hormonale	90/554	1,43	0,63-3,22	89/396	0,76	0,29-1,96	0,56413
DIU	29/554	1,35	0,64-2,84	33/396	1,01	0,54-1,90	0,97296
Non-hormonale	435/554	ref	-	274/396	ref	-	-
Menstruations							
le jour même	107/554	3,18	1,86-5,43	73/396	0,49	0,16-1,50	0,21275
dans les 48h	120/554	2,84	1,64-4,89	87/396	0,41	0,18-0,95	0,03811
dans les 3 derniers jours	154/554	2,87	1,74-4,73	268/396	0,58	0,33-1,03	0,06271
dans les 10 derniers jours	273/554	2,37	1,49-3,78	227/396	0,67	0,41-1,10	0,11310
Douches vaginales							
le jour même	12/553	-	-	10/389	1,44	0,19-11,04	0,72694
dans les 48h	18/550	-	-	20/390	1,49	0,29-7,78	0,63380
dans les 72h	30/535	-	-	26/381	0,94	0,19-4,65	0,93930
Lubrifiant							
le jour même	6/553	-	-	14/389	0,66	0,18-2,36	0,51924
dans les 48h	15/550	2,16	0,58-8,04	24/390	0,35	0,08-1,62	0,17971
dans les 72h	21/534	2,42	0,87-6,71	32/380	0,77	0,19-3,21	0,72317

Etude DC Covariables	Incidence LL-VMB			Rémission vers HL-VMB			
	N	HR	IC 95%	N	HR	IC 95%	p-value
Préservatif							
le jour même	8/553	6,43	1,80-22,92	16/389	0,52	0,15-1,81	0,30161
dans les 48h	15/550	5,71	2,01-16,19	29/390	0,78	0,50-1,21	0,26813
dans les 72h	21/534	2,42	1,14-7,61	36/381	0,58	0,33-1,03	0,06311
Sous-vêtement string							
le jour même	93/553	0,33	0,10-1,16	67/389	0,22	0,06-0,84	0,02714
dans les 48h	100/550	0,43	0,12-1,54	71/390	0,32	0,07-1,34	0,11698
dans les 72h	105/537	0,40	0,11-1,46	74/383	0,29	0,08-1,06	0,06182
Rapports anaux							
le jour même	6/553	-	-	1/389	-	-	-
dans les 48h	8/550	-	-	1/390	-	-	-
dans les 72h	9/533	2,07	0,42-10,11	2/380	-	-	-
Pénétration digitale							
le jour même	31/553	0,40	0,06-2,71	17/389	0,30	0,09-1,00	0,05066
dans les 48h	55/550	1,03	0,39-2,77	25/390	0,41	0,11-1,59	0,19789
dans les 72h	70/533	0,88	0,38-2,02	30/380	0,53	0,17-1,65	0,27238
Rapports oraux							
le jour même	27/553	0,44	0,12-1,56	25/389	0,27	0,05-1,37	0,11320
dans les 48h	51/550	1,12	0,50-2,52	35/390	0,67	0,21-2,13	0,49756
dans les 72h	67/533	1,06	0,55-2,04	42/380	0,92	0,50-1,69	0,78959
Rapports vaginaux non protégés							
le jour même	88/553	1,09	0,58-2,08	55/389	0,92	0,50-1,69	0,78959
dans les 48h	153/550	1,35	0,84-2,17	93/390	1,37	0,78-2,41	0,27158
dans les 72h	185/534	1,33	0,86-2,07	113/381	1,72	0,92-3,23	0,08861
HPV							
le jour même	297/528	1,44	0,77-2,70	274/367	0,99	0,49-2,02	0,98710
au dernier prélèvement	289/510	1,78	0,89-3,57	265/355	0,98	0,49-1,96	0,96296



TABLE D.2 – Analyse univariée des facteurs associés à l'incidence et à la rémission d'un état non-dominé par des *Lactobacillus* (LL-VMB) dans l'étude "Human Microbiome Project" (HMP-UMB - N=100).

Etude HMP-UMB Covariables	Incidence LL-VMB			Rémission vers HL-VMB			
	N	HR	IC 95%	N	HR	IC 95%	p-value
Age							
Plus de 40 ans	1332/2565	1,03	0,47-2,29	218/2213	0,75	0,33-1,71	0,48707
30-39 ans	972/2565	0,66	0,37-1,20	658/2213	0,79	0,44-1,42	0,43642
18-29 ans	261/2565	ref	-	1337/2213	ref	-	-
Race							
Africaine-Américaine	1324/2565	1,14	0,65-2,01	1678/2213	0,61	0,35-1,06	0,08083
Hispanique ou autre	244/2565	1,37	0,59-3,18	85/2213	1,21	0,63-2,34	0,56839
Blanche	997/2565	ref	-	450/2213	ref	-	-
Contraception							
Hormonale	654/2179	0,64	0,33-1,22	173/1940	1,47	0,85-2,54	0,16295
DIU	67/2179	2,19	0,70-6,81	144/1940	1,82	0,54-6,14	0,33634
Non-hormonale	1458/2179	ref	-	1623/1940	ref	-	-
Menstruations							
le jour même	432/2565	2,09	1,51-2,89	510/2213	0,78	0,55-1,10	0,15631
dans les 48h	514/2521	1,89	1,39-2,57	606/2183	0,88	0,65-1,21	0,44317
dans les 3 derniers jours	659/2436	1,79	1,33-2,41	744/2116	1,02	0,76-1,37	0,90150
Douches vaginales							
le jour même	6/2549	0,00	0,00-0,00	21/2174	0,85	0,41-1,73	0,64544
dans les 48h	16/2487	0,77	0,10-5,73	33/2139	0,85	0,40-1,78	0,66009
dans les 72h	21/2455	0,58	0,08-4,34	46/2118	0,85	0,38-1,93	0,70155
Lubrifiant							
le jour même	29/2525	1,91	0,77-4,77	39/2150	0,52	0,18-1,53	0,23503
dans les 48h	56/2467	1,63	0,82-3,23	72/2121	0,96	0,50-1,84	0,89316
dans les 72h	73/2434	1,25	0,68-2,29	101/2095	0,99	0,53-1,87	0,98047

Etude HMP-UMB Covariables	Incidence LL-VMB			Rémission vers HL-VMB			
	N	HR	IC 95%	N	HR	IC 95%	p-value
Préservatif							
le jour même	71/2551	0,90	0,36-2,21	76/2177	0,58	0,30-1,13	0,11049
dans les 48h	131/2490	1,03	0,54-1,98	135/2143	0,95	0,60-1,51	0,82964
dans les 72h	178/2457	1,21	0,65-2,27	188/2120	0,94	0,58-1,53	0,80004
Sous-vêtement string							
le jour même	358/2546	1,04	0,55-1,96	177/2170	1,59	0,99-2,54	0,05329
dans les 48h	428/2486	1,07	0,61-1,88	236/2135	1,72	1,13-2,61	0,01076
dans les 72h	488/2453	1,06	0,61-1,84	270/2114	1,69	1,09-2,63	0,02012
Rapports anaux							
le jour même	20/2552	0,48	0,08-2,78	21/2174	2,08	0,43-10,02	0,36089
dans les 48h	32/2490	1,17	0,51-2,69	38/2140	1,44	0,38-5,52	0,59286
dans les 72h	42/2456	1,82	0,86-3,85	52/2118	1,01	0,28-3,65	0,98389
Pénétration digitale							
le jour même	125/2550	0,88	0,46-1,67	111/2173	1,09	0,62-1,92	0,76089
dans les 48h	201/2487	0,87	0,49-1,53	203/2139	1,07	0,72-1,58	0,74605
dans les 72h	280/2365	0,88	0,53-1,44	276/2117	1,12	0,77-1,63	0,55790
Rapports oraux							
le jour même	99/2551	0,89	0,41-1,94	86/2176	0,90	0,44-1,84	0,78214
dans les 48h	165/2488	0,73	0,38-1,38	150/2141	1,02	0,60-1,75	0,93341
dans les 72h	224/2456	0,80	0,45-1,43	211/2120	0,98	0,63-1,52	0,93577
Rapports vaginaux non protégés							
le jour même	200/2551	0,99	0,59-1,66	192/2173	0,93	0,60-1,46	0,76197
dans les 48h	332/2489	1,02	0,66-1,59	328/2140	0,91	0,63-1,33	0,63645
dans les 72h	440/2458	1,00	0,68-1,47	442/2115	0,89	0,61-1,29	0,52986
Antibiotiques							
le jour même	4/2565	4,45	1,38-14,35	12/2213	1,08	0,13-9,28	0,94609
depuis le début de l'étude	224/2565	0,80	0,48-1,34	166/2213	0,74	0,42-1,31	0,30251



## Bibliographie

- [1] Syrjänen K, Hakama M, Saarikoski S, Väyrynen M, Yliskoski M, Syrjänen S, Kataja V, Castrén O. Prevalence, incidence, and estimated life-time risk of cervical human papillomavirus infections in a non-selected finnish female population. *Sex Transm Dis*, Jan-Mar 1990, 17(1): 15–19.
- [2] Newman L, Rowley J, Vander Hoorn S, Wijesooriya N S, Unemo M, Low N, Stevens G, Gottlieb S, Kiarie J, Temmerman M. Global estimates of the prevalence and incidence of four curable sexually transmitted infections in 2012 based on systematic review and global reporting. *PLoS One*, 2015, 10(12).
- [3] McGowin C L, Anderson-Smiths C. *Mycoplasma genitalium* : an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog*, May 2011, 7(5).
- [4] Low N, Smid Joost H. Changes in *Chlamydia* prevalence over time : how to observe the unobserved. *The Lancet Public Health*, 2018, 3(6): e260 – e261.
- [5] European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia*. in : ECDC. annual epidemiological report for 2014. Stockholm : ECDC, 2016.
- [6] European Centre for Disease Prevention and Control. *Chlamydia*. in : ECDC. annual epidemiological report for 2017. Stockholm : ECDC, 2019.
- [7] Goulet V, de Barbeyrac B, Raheison S, Prudhomme M, Semaille C, Warszawski J, CSF group. Prevalence of *Chlamydia trachomatis* : results from the first national population-based survey in france. *Sex Transm Infect*, Aug 2010, 86(4): 263–270.
- [8] Torrone E, Papp J, Weinstock H, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of *Chlamydia trachomatis* genital infection among persons aged 14–39 years—united states, 2007–2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, Sep 2014, 63(38): 834–838.
- [9] Weinstock H, Berman S, Cates W. Sexually transmitted diseases among american youth : incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*, Jan-Feb 2004, 36(1): 6–10.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted disease surveillance 2017. Technical report, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, United States, July 2018.

- [11] Tu W, Ghosh P, Katz B P. A stochastic model for assessing *Chlamydia trachomatis* transmission risk using longitudinal observational data. *J R Stat Soc Ser A Stat Soc*, Oct 2011, 174(4): 975–989.
- [12] Enns E A, Kao S Y, Kozhimannil K B, Kahn J, Farris J, Kulasingam S L. Using multiple outcomes of sexual behavior to provide insights into *Chlamydia* transmission and the effectiveness of prevention interventions in adolescents. *Sex Transm Dis*, 10 2017, 44(10): 619–626.
- [13] Geisler W M. Duration of untreated, uncomplicated *Chlamydia trachomatis* genital infection and factors associated with *Chlamydia* resolution : a review of human studies. *J Infect Dis*, Jun 2010, 201 Suppl 2: 104–113.
- [14] Walker J, Tabrizi S N, Fairley C K, Chen M Y, Bradshaw C S, Twin J, Taylor N, Donovan B, Kaldor J M, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden F, Gunn J, Pirodda M, Gurrin L, Harindra V, Garland S M, Hocking J S. *Chlamydia trachomatis* incidence and re-infection among young women - behavioural and microbiological characteristics. *PLoS One*, 2012, 7(5).
- [15] Scott Lamontagne D, Baster K, Emmett L, Nichols T, Randall S, McLean L, Meredith P, Harindra V, Tobin J M, Underhill G S, Graham Hewitt W, Hopwood J, Gleave T, Ghosh A K, Mallinson H, Davies A R, Hughes G, Fenton K A, Chlamydia Recall Study Advisory Group. Incidence and reinfection rates of genital chlamydial infection among women aged 16–24 years attending general practice, family planning and genitourinary medicine clinics in England : a prospective cohort study by the chlamydia recall study advisory group. *Sex Transm Infect*, Jul 2007, 83(4): 292–303.
- [16] Geisler W M, Lensing S Y, Press C G, Hook E W. Spontaneous resolution of genital *Chlamydia trachomatis* infection in women and protection from reinfection. *J Infect Dis*, Jun 2013, 207(12): 1850–1856.
- [17] Batteiger B E, Tu W, Ofner S, Van Der Pol B, Stothard D R, Orr D P, Katz B P, Fortenberry J D. Repeated *Chlamydia trachomatis* genital infections in adolescent women. *J Infect Dis*, Jan 2010, 201(1): 42–51.
- [18] Detels R, Green A M, Klausner J D, Katzenstein D, Gaydos C, Handsfield H, Pequegnat W, Mayer K, Hartwell T D, Quinn T C. The incidence and correlates of symptomatic and asymptomatic *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections in selected populations in five countries. *Sex Transm Dis*, Jun 2011, 38(6): 503–509.
- [19] Wiesenfeld H C, Sweet R L, Ness R B, Krohn M A, Amortegui A J, Hillier S L. Comparison of acute and subclinical pelvic inflammatory disease. *Sex Transm Dis*, Jul 2005, 32(7): 400–405.
- [20] Oakeshott P, Kerry S, Aghaizu A, Atherton H, Hay S, Taylor-Robinson D, Simms I, Hay P. Randomised controlled trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease : the popi (prevention of pelvic infection) trial. *BMJ*, Apr 2010, 340.
- [21] Herzog S A, Althaus C L, Heijne J C, Oakeshott P, Kerry S, Hay P, Low N. Timing of progression from *Chlamydia trachomatis* infection to pelvic inflammatory disease : a mathematical modelling study. *BMC Infect Dis*, Aug 2012, 12: 187–187.
- [22] Burnett A M, Anderson C P, Zwank M D. Laboratory-confirmed gonorrhoea and/or *chlamydia* rates in clinically diagnosed pelvic inflammatory disease and cervicitis. *Am J Emerg Med*, Sep 2012, 30(7): 1114–1117.

- [23] Price M J, Ades A E, Welton N J, Simms I, Macleod J, Horner P J. Proportion of pelvic inflammatory disease cases caused by *Chlamydia trachomatis* : Consistent picture from different methods. *J Infect Dis*, 08 2016, 214(4): 617–624.
- [24] Bouyer J, Coste J, Shojaei T, Pouly J L, Fernandez H, Gerbaud L, Job-Spira N. Risk factors for ectopic pregnancy : a comprehensive analysis based on a large case-control, population-based study in france. *Am J Epidemiol*, Feb 2003, 157(3): 185–194.
- [25] Kihlstrom E, Lindgren R, Rydén G. Antibodies to *Chlamydia trachomatis* in women with infertility, pelvic inflammatory disease and ectopic pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, May-Jun 1990, 35(2-3): 199–204.
- [26] Price M J, Ades A E, Welton N J, Macleod J, Turner K, Simms I, Horner P J. How much tubal factor infertility is caused by *Chlamydia*? estimates based on serological evidence corrected for sensitivity and specificity. *Sex Transm Dis*, Aug 2012, 39(8): 608–613.
- [27] Kosseim M, Brunham R C. Fallopian tube obstruction as a sequela to *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis*, Jul 2014, 59(2): 193–205.
- [28] Land J A, Van Bergen J E, Morré S A, Postma M J. Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection in women and the cost-effectiveness of screening. *Hum Reprod Update*, Mar-Apr 2010, 16(2): 189–204.
- [29] Kavanagh K, Wallace L A, Robertson C, Wilson P, Scoular A. Estimation of the risk of tubal factor infertility associated with genital chlamydial infection in women : a statistical modelling study. *Int J Epidemiol*, Apr 2013, 42(2): 493–503.
- [30] Workowski K A. Centers for disease control and prevention sexually transmitted diseases treatment guidelines. *Clin Infect Dis*, Dec 2015, 61 Suppl 8: 759–762.
- [31] Kong F Y, Tabrizi S N, Law M, Vodstrcil L A, Chen M, Fairley C K, Guy R, Bradshaw C, Hocking J S. Azithromycin versus doxycycline for the treatment of genital *Chlamydia* infection : a meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Infect Dis*, Jul 2014, 59(2): 193–205.
- [32] Haute Autorité de Santé. R evaluation de la stratégie de dépistage des infections   *Chlamydia trachomatis*, 2018.
- [33] Krebs C J. *The ecological world view*. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, 2008.
- [34] Costello E K, Lauber C L, Hamady M, Fierer N, Gordon J I, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, Dec 2009, 326(5960): 1694–1697.
- [35] Ding T, Schloss P D. Dynamics and associations of microbial community types across the human body. *Nature*, May 2014, 509(7500): 357–360.
- [36] Chatterjee A, Duerkop B A. Beyond bacteria : Bacteriophage-eukaryotic host interactions reveal emerging paradigms of health and disease. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1394–1394.
- [37] Amsel R, Totten P A, Spiegel C A, Chen K C, Eschenbach D, Holmes K K. Nonspecific vaginitis. diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*, Jan 1983, 74(1): 14–22.
- [38] Nelson T M, Borgogna J L, Brotman R M, Ravel J, Walk S T, Yeoman C J. Vaginal biogenic amines : biomarkers of bacterial vaginosis or precursors to vaginal dysbiosis? *Front Physiol*, 2015, 6: 253–253.

- [39] Nugent R P, Krohn M A, Hillier S L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*, Feb 1991, 29(2): 297–301.
- [40] Fredricks D N, Fiedler T L, Marrazzo J M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*, Nov 2005, 353(18): 1899–1911.
- [41] Yoshimura K, Morotomi N, Fukuda K, Nakano M, Kashimura M, Hachisuga T, Taniguchi H. Intravaginal microbial flora by the 16s rrna gene sequencing. *Am J Obstet Gynecol*, Sep 2011, 205(3): 1–9.
- [42] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider G M, Koenig S S, 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. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Mar 2011, 108 Suppl 1: 4680–4687.
- [43] Schellenberg J, Links M G, Hill J E, Dumonceaux T J, Peters G A, Tyler S, Ball T B, Severini A, Plummer F A. Pyrosequencing of the chaperonin-60 universal target as a tool for determining microbial community composition. *Appl Environ Microbiol*, May 2009, 75(9): 2889–2898.
- [44] McMurdie P J, Holmes S. Waste not, want not : why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Comput Biol*, Apr 2014, 10(4).
- [45] Love M I, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for rna-seq data with deseq2. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550–550.
- [46] Paulson J N, Stine O C, Bravo H C, Pop M. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat Methods*, Dec 2013, 10(12): 1200–1202.
- [47] Morgan X C, Huttenhower C. Chapter 12 : Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(12): e1002808.
- [48] McKinnon L R, Achilles S L, Bradshaw C S, Burgener A, Crucitti T, Fredricks D N, Jaspan H B, Kaul R, Kaushic C, Klatt N, Kwon D S, Marrazzo J M, Masson L, McClelland R S, Ravel J, van de Wijgert J H H M, Vodstrcil L A, Tachedjian G. The evolving facets of bacterial vaginosis : Implications for hiv transmission. *AIDS Res Hum Retroviruses*, Mar 2019, 35(3): 219–228.
- [49] Gray R T, Beagley K W, Timms P, Wilson D P. Modeling the impact of potential vaccines on epidemics of sexually transmitted *Chlamydia trachomatis* infection. *J Infect Dis*, Jun 2009, 199(11): 1680–1688.
- [50] Sheikh S, Biundo E, Courcier S, Damm O, Launay O, Maes E, Marcos C, Matthews S, Meijer C, Poscia A, Postma M, Saka O, Szucs T, Begg N. A report on the status of vaccination in europe. *Vaccine*, 08 2018, 36(33): 4979–4992.
- [51] Borgdorff H, Tsvitshivadze E, Verhelst R, Marzorati M, Jurriaans S, Ndayisaba G F, Schuren F H, van de Wijgert J H. *Lactobacillus*-dominated cervicovaginal microbiota associated with reduced hiv/sti prevalence and genital hiv viral load in african women. *ISME J*, Sep 2014, 8(9): 1781–1793.
- [52] Gosmann C, Anahtar M N, Handley S A, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman B A, Padavattan N, Desai C, Droit L, Moodley A, Dong M, Chen Y, Ismail N, Ndung'u T, Ghebremichael M S, Wesemann D R, Mitchell C, Dong K L, Huttenhower C, Walker B D, Virgin H W, Kwon D S. *Lactobacillus*-deficient cervicovaginal bacterial communities are associated with increased hiv acquisition in young south african women. *Immunity*, 01 2017, 46(1): 29–37.

- [53] Carey A J, Beagley K W. *Chlamydia trachomatis*, a hidden epidemic : effects on female reproduction and options for treatment. *Am J Reprod Immunol*, Jun 2010, 63(6): 576–586.
- [54] Donders G G, Moerman P, De Wet G H, Hoofstede P, Goubau P. The association between *Chlamydia cervicitis*, chorioamnionitis and neonatal complications. *Arch Gynecol Obstet*, 1991, 249(2): 79–85.
- [55] Blas M M, Canchihuaman F A, Alva I E, Hawes S E. Pregnancy outcomes in women infected with *Chlamydia trachomatis* : a population-based cohort study in Washington state. *Sex Transm Infect*, Jul 2007, 83(4): 314–318.
- [56] Kovács L, Nagy E, Berik I, Mészáros G, Deák J, Nyári T. The frequency and the role of *Chlamydia trachomatis* infection in premature labor. *Int J Gynaecol Obstet*, Jul 1998, 62(1): 47–54.
- [57] Manhart L E, Critchlow C W, Holmes K K, Dutro S M, Eschenbach D A, Stevens C E, Totten P A. Mucopurulent cervicitis and *Mycoplasma genitalium*. *J Infect Dis*, Feb 2003, 187(4): 650–657.
- [58] Simms I, Eastick K, Mallinson H, Thomas K, Gokhale R, Hay P, Herring A, Rogers P A. Associations between *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis* and pelvic inflammatory disease. *J Clin Pathol*, Aug 2003, 56(8): 616–618.
- [59] Svenstrup H F, Fedder J, Kristoffersen S E, Trolle B, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium*, *Chlamydia trachomatis*, and tubal factor infertility - a prospective study. *Fertil Steril*, Sep 2008, 90(3): 513–520.
- [60] Bosch F X, Manos M M, Muñoz N, Sherman M, Jansen A M, Peto J, Schiffman M H, Moreno V, Kurman R, Shah K V. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer : a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst*, Jun 1995, 87(11): 796–802.
- [61] Walboomers J M, Jacobs M V, Manos M M, Bosch F X, Kummer J A, Shah K V, Snijders P J, Peto J, Meijer C J, Muñoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, Sep 1999, 189(1): 12–19.
- [62] Tommasino M. The human papillomavirus family and its role in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol*, Jun 2014, 26: 13–21.
- [63] de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*, 08 2017, 141(4): 664–670.
- [64] Veldhuijzen N J, Snijders P J, Reiss P, Meijer C J, van de Wijkert J H. Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. *Lancet Infect Dis*, Dec 2010, 10(12): 862–874.
- [65] Discacciati M G, Simoes J A, Amaral R G, Brolazo E, Rabelo-Santos S H, Westin M C, Montemor E B. Presence of 20 diagnosis of bacterial vaginosis in papanicolaou cervical smears. *Diagn Cytopathol*, Apr 2006, 34(4): 272–276.
- [66] Hardy R J, Thompson S G. Detecting and describing heterogeneity in meta-analysis. *Stat Med*, Apr 1998, 17(8): 841–856.
- [67] Castle P E, Hillier S L, Rabe L K, Hildesheim A, Herrero R, Bratti M C, Sherman M E, Burk R D, Rodriguez A C, Alfaro M, Hutchinson M L, Morales J, Schiffman M. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, Oct 2001, 10(10): 1021–1027.



- [68] Moscicki A B, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*, Jun 2001, 285(23): 2995–3002.
- [69] Ness R B, Hillier S L, Richter H E, Soper D E, Stamm C, McGregor J, Bass D C, Sweet R L, Rice P. Douching in relation to bacterial vaginosis, lactobacilli, and facultative bacteria in the vagina. *Obstet Gynecol*, Oct 2002, 100(4): 765–765.
- [70] Wiesenfeld H C, Hillier S L, Krohn M A, Landers D V, Sweet R L. Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection. *Clin Infect Dis*, Mar 2003, 36(5): 663–668.
- [71] Mao C, Hughes J P, Kiviat N, Kuypers J, Lee S K, Adam D E, Koutsky L A. Clinical findings among young women with genital human papillomavirus infection. *Am J Obstet Gynecol*, Mar 2003, 188(3): 677–684.
- [72] Yen S, Shafer M A, Moncada J, Campbell C J, Flinn S D, Boyer C B. Bacterial vaginosis in sexually experienced and non-sexually experienced young women entering the military. *Obstet Gynecol*, Nov 2003, 102(5 Pt 1): 927–933.
- [73] García P J, Chavez S, Feringa B, Chiappe M, Li W, Jansen K U, Cárcamo C, Holmes K K. Reproductive tract infections in rural women from the highlands, jungle, and coastal regions of peru. *Bull World Health Organ*, Jul 2004, 82(7): 483–492.
- [74] Uma S, Balakrishnan P, Murugavel K G, Srikrishnan A K, Kumarasamy N, Cecelia J A, Anand S, Mayer K H, Celentano D, Thyagarajan S P, Solomon S. Bacterial vaginosis in female sex workers in chennai, india. *Sex Health*, 2005, 2(4): 261–262.
- [75] Kaul R, Nagelkerke N J, Kimani J, Ngugi E, Bwayo J J, Macdonald K S, Rebbaprgada A, Fonck K, Temmerman M, Ronald A R, Moses S, Kibera HIV Study Group. Prevalent herpes simplex virus type 2 infection is associated with altered vaginal flora and an increased susceptibility to multiple sexually transmitted infections. *J Infect Dis*, Dec 2007, 196(11): 1692–1697.
- [76] Allsworth J E, Lewis V A, Peipert J F. Viral sexually transmitted infections and bacterial vaginosis : 2001-2004 national health and nutrition examination survey data. *Sex Transm Dis*, Sep 2008, 35(9): 791–796.
- [77] Kapiga S, Kelly C, Weiss S, Daley T, Peterson L, Leburg C, Ramjee G. Risk factors for incidence of sexually transmitted infections among women in south africa, tanzania, and zambia : results from hptn 055 study. *Sex Transm Dis*, Apr 2009, 36(4): 199–206.
- [78] Nam K H, Kim Y T, Kim S R, Kim S W, Kim J W, Lee M K, Nam E J, Jung Y W. Association between bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. *J Gynecol Oncol*, Mar 2009, 20(1): 39–43.
- [79] Rahkola P, Mikkola T S, Ylikorkala O, Vaisanen-Tommiska M. Association between high risk papillomavirus dna and nitric oxide release in the human uterine cervix. *Gynecol Oncol*, Aug 2009, 114(2): 323–326.
- [80] Verteramo R, Pierangeli A, Mancini E, Calzolari E, Bucci M, Osborn J, Nicosia R, Chiarini F, Antonelli G, Degener A M. Human papillomaviruses and genital co-infections in gynaecological outpatients. *BMC Infect Dis*, Feb 2009, 9: 16–16.
- [81] Yoshimura K, Yoshimura M, Kobayashi T, Kubo T, Hachisuga T, Kashimura M. Can bacterial vaginosis help to find sexually transmitted diseases, especially chlamydial cervicitis? *Int J STD AIDS*, Feb 2009, 20(2): 108–111.

- [82] Brotman R M, Klebanoff M A, Nansel T R, Yu K F, Andrews W W, Zhang J, Schwebke J R. Bacterial vaginosis assessed by gram stain and diminished colonization resistance to incident gonococcal, chlamydial, and trichomonal genital infection. *J Infect Dis*, Dec 2010, 202(12): 1907–1915.
- [83] Oakeshott P, Aghaizu A, Hay P, Reid F, Kerry S, Atherton H, Simms I, Taylor-Robinson D, Dohn B, Jensen J S. Is *Mycoplasma genitalium* in women the 'new chlamydia'? a community-based prospective cohort study. *Clin Infect Dis*, Nov 2010, 51(10): 1160–1166.
- [84] Znazen A, Frikha-Gargouri O, Berrajah L, Bellalouna S, Hakim H, Gueddana N, Hammami A. Sexually transmitted infections among female sex workers in tunisia : high prevalence of *Chlamydia trachomatis*. *Sex Transm Infect*, Dec 2010, 86(7): 500–505.
- [85] Caiyan X, Weiyuan Z, Minghui W, Songwen Z. Prevalence and risk factors of lower genital tract infections among women in beijing, china. *J Obstet Gynaecol Res*, Jan 2012, 38(1): 310–315.
- [86] Marconi C, Donders G G, Martin L F, Ramos B R, Duarte M T, Parada C M, Tristão A R, Silva M G. Chlamydial infection in a high risk population : association with vaginal flora patterns. *Arch Gynecol Obstet*, Apr 2012, 285(4): 1013–1018.
- [87] Wiley D J, Masongsong E V, Lu S, Heather L S, Salem B, Giuliano A R, Ault K A, Haupt R M, Brown D R. Behavioral and sociodemographic risk factors for serological and dna evidence of hpv6, 11, 16, 18 infections. *Cancer Epidemiol*, Jun 2012, 36(3): 183–189.
- [88] Oakeshott P, Aghaizu A, Reid F, Howell-Jones R, Hay P E, Sadiq S T, Lacey C J, Beddows S, Soldan K. Frequency and risk factors for prevalent, incident, and persistent genital carcinogenic human papillomavirus infection in sexually active women : community based cohort study. *BMJ*, Jun 2012, 344.
- [89] Bradshaw C S, Walker J, Fairley C K, Chen M Y, Tabrizi S N, Donovan B, Kaldor J M, McNamee K, Urban E, Walker S, Currie M, Birden H, Bowden F, Garland S, Pirodda M, Gurrin L, Hocking J S. Prevalent and incident bacterial vaginosis are associated with sexual and contraceptive behaviours in young australian women. *PLoS One*, 2013, 8(3).
- [90] Lazenby G B, Taylor P T, Badman B S, McHaki E, Korte J E, Soper D E, Young Pierce J. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clin Ther*, Jan 2014, 36(1): 38–45.
- [91] Watson-Jones D, Baisley K, Brown J, Kavishe B, Andreasen A, Changalucha J, Mayaud P, Kapiga S, Gumodoka B, Hayes R J, de Sanjosé S. High prevalence and incidence of human papillomavirus in a cohort of healthy young african female subjects. *Sex Transm Infect*, Aug 2013, 89(5): 358–365.
- [92] Aghaizu A, Reid F, Kerry S, Hay P E, Mallinson H, Jensen J S, Kerry S, Kerry S, Oakeshott P. Frequency and risk factors for incident and redetected *Chlamydia trachomatis* infection in sexually active, young, multi-ethnic women : a community based cohort study. *Sex Transm Infect*, Nov 2014, 90(7): 524–528.
- [93] Brotman R M, Shardell M D, Gajer P, Tracy J K, Zenilman J M, Ravel J, Gravitt P E. Interplay between the temporal dynamics of the vaginal microbiota and human papillomavirus detection. *J Infect Dis*, Dec 2014, 210(11): 1723–1733.
- [94] Francis S C, Ao T T, Vanobberghen F M, Chilongani J, Hashim R, Andreasen A, Watson-Jones D, Changalucha J, Kapiga S, Hayes R J. Epidemiology of curable sexually

- transmitted infections among women at increased risk for hiv in northwestern tanzania : inadequacy of syndromic management. *PLoS One*, 2014, 9(7).
- [95] Huppert J S, Bates J R, Weber A F, Quinn N, Gaydos C A. Abnormal vaginal ph and *Mycoplasma genitalium* infection. *J Pediatr Adolesc Gynecol*, Feb 2013, 26(1): 36–39.
- [96] Abbai N S, Reddy T, Ramjee G. Prevalent bacterial vaginosis infection - a risk factor for incident sexually transmitted infections in women in durban, south africa. *Int J STD AIDS*, 12 2016, 27(14): 1283–1288.
- [97] Caixeta R C, Ribeiro A A, Segatti K D, Saddi V A, Figueiredo Alves R R, dos Santos Carneiro M A, Rabelo-Santos S H. Association between the human papillomavirus, bacterial vaginosis and cervicitis and the detection of abnormalities in cervical smears from teenage girls and young women. *Diagn Cytopathol*, Oct 2015, 43(10): 780–785.
- [98] Liu J, Liu W, Liu Y, Zhou X, Zhang Z, Sun Z. Prevalence of microorganisms co-infections in human papillomaviruses infected women in northern china. *Arch Gynecol Obstet*, Mar 2016, 293(3): 595–602.
- [99] Marks M A, Gupta S, Liaw K L, Tadesse A, Kim E, Phongnarisorn C, Wootipoom V, Yuenyao P, Vipupinyo C, Rugpao S, Sriplienchan S, Gravitt P E, Celentano D D. Prevalence and correlates of hpv among women attending family-planning clinics in thailand. *BMC Infect Dis*, Mar 2015, 15: 159–159.
- [100] Mitra A, MacIntyre D A, Lee Y S, Smith A, Marchesi J R, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaïdis E, Li J V, Holmes E, Nicholson J K, Bennett P R, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*, Nov 2015, 5: 16865–16865.
- [101] Mongelos P, Mendoza L P, Rodriguez-Riveros I, Castro A, Gimenez G, Araujo P, Paez M, Castro W, Basiletti J, González J, Echagüe G, Diaz V, Laspina F, Ever S, Marecos R, Deluca G, Picconi M A. Distribution of human papillomavirus (hpv) genotypes and bacterial vaginosis presence in cervical samples from paraguayan indigenous. *Int J Infect Dis*, Oct 2015, 39: 44–49.
- [102] Oh H Y, Kim B S, Seo S S, Kong J S, Lee J K, Park S Y, Hong K M, Kim H K, Kim M K. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in korea. *Clin Microbiol Infect*, Jul 2015, 21(7): 1–9.
- [103] Peres A L, Camarotti J R, Cartaxo M, Alencar N, Stocco R C, Beak W, Pontes-Filho N T, Araújo R F, Lima-Filho J L, Martins D B. Molecular analysis and conventional cytology : association between hpv and bacterial vaginosis in the cervical abnormalities of a brazilian population. *Genet Mol Res*, Aug 2015, 14(3): 9497–9505.
- [104] van der Veer C, Bruisten S M, van der Helm J J, de Vries H J, van Houdt R. The cervicovaginal microbiota in women notified for *Chlamydia trachomatis* infection : a case-control study at the sexually transmitted infection outpatient clinic in amsterdam, the netherlands. *Clin Infect Dis*, Jan 2017, 64(1): 24–31.
- [105] Srinivasan S, Hoffman N G, Morgan M T, Matsen F A, Fiedler T L, Hall R W, Ross F J, McCoy C O, Bumgarner R, Marrazzo J M, Fredricks D N. Bacterial communities in women with bacterial vaginosis : high resolution phylogenetic analyses reveal relationships of microbiota to clinical criteria. *PLoS One*, 2012, 7(6).
- [106] Sobel J D. Is there a protective role for vaginal flora ? *Curr Infect Dis Rep*, Oct 1999, 1(4): 379–383.

- [107] Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, Oct 2006, 48(1): 75–83.
- [108] Voravuthikunchai S P, Bilasoi S, Supamala O. Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal lactobacilli. *Anaerobe*, Oct-Dec 2006, 12(5-6): 221–226.
- [109] Rizzo A, Fiorentino M, Buommino E, Donnarumma G, Losacco A, Bevilacqua N. *Lactobacillus crispatus* mediates anti-inflammatory cytokine interleukin-10 induction in response to *Chlamydia trachomatis* infection in vitro. *Int J Med Microbiol*, Dec 2015, 305(8): 815–827.
- [110] Aroutcheva A, Gariti D, Simon M, Shott S, Faro J, Simoes J A, Gurguis A, Faro S. Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*, Aug 2001, 185(2): 375–379.
- [111] Muench D F, Kuch D J, Wu H, Begum A A, Veit S J, Pelletier M E, Soler-García A A, Jerse A E. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli inhibit gonococci in vitro but not during experimental genital tract infection. *J Infect Dis*, May 2009, 199(9): 1369–1378.
- [112] Joesoef M R, Hillier S L, Josodiwondo S, Linnan M. Reproducibility of a scoring system for gram stain diagnosis of bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*, Aug 1991, 29(8): 1730–1731.
- [113] Zarakolu P, Sahin Hodoglugil N N, Aydin F, Tosun I, Gozalan A, Unal S. Reliability of interpretation of gram-stained vaginal smears by nugent's scoring system for diagnosis of bacterial vaginosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, Feb 2004, 48(2): 77–80.
- [114] Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin D H, Ferris M J. Quantitative pcr assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis. *J Clin Microbiol*, May 2010, 48(5): 1812–1819.
- [115] Albert A Y, 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. A study of the vaginal microbiome in healthy canadian women utilizing cpn60-based molecular profiling reveals distinct *Gardnerella* subgroup community state types. *PLoS One*, 2015, 10(8).
- [116] Morris M C, Rogers P A, Kinghorn G R. Is bacterial vaginosis a sexually transmitted infection? *Sex Transm Infect*, Feb 2001, 77(1): 63–68.
- [117] Boyle D C, Barton S E, Uthayakumar S, Hay P E, Pollock J W, Steer P J, Smith J R. Is bacterial vaginosis associated with cervical intraepithelial neoplasia? *Int J Gynecol Cancer*, Mar-Apr 2003, 13(2): 159–163.
- [118] Olmsted S S, Meyn L A, Rohan L C, Hillier S L. Glycosidase and proteinase activity of anaerobic gram-negative bacteria isolated from women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*, Mar 2003, 30(3): 257–261.
- [119] Lamont R F, Sobel J D, Akins R A, Hassan S S, Chaiworapongsa T, Kusanovic J P, Romero R. The vaginal microbiome : new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG*, Apr 2011, 118(5): 533–549.
- [120] Gajer P, Brotman R M, Bai G, Sakamoto J, Schütte U M, Zhong X, Koenig S S, Fu L, Ma Z S, Zhou X, Abdo Z, Forney L J, Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*, May 2012, 4(132): 132–132.
- [121] Hutchinson K B, Kip K E, Ness R B. Condom use and its association with bacterial vaginosis and bacterial vaginosis-associated vaginal microflora. *Epidemiology*, Nov 2007, 18(6): 702–708.

- [122] Gottlieb S L, Stoner B P, Zaidi A A, Buckel C, Tran M, Leichter J S, Berman S M, Markowitz L E. A prospective study of the psychosocial impact of a positive *Chlamydia trachomatis* laboratory test. *Sex Transm Dis*, Nov 2011, 38(11): 1004–1011.
- [123] Brunham R C, Rey-Ladino J. Immunology of *Chlamydia* infection : implications for a *Chlamydia trachomatis* vaccine. *Nat Rev Immunol*, Feb 2005, 5(2): 149–161.
- [124] Smith K J, Cook R L, Roberts M S. Time from sexually transmitted infection acquisition to pelvic inflammatory disease development : influence on the cost-effectiveness of different screening intervals. *Value Health*, Sep-Oct 2007, 10(5): 358–366.
- [125] Zimmerman H L, Potterat J J, Dukes R L, Muth J B, Zimmerman H P, Fogle J S, Pratts C I. Epidemiologic differences between chlamydia and gonorrhea. *Am J Public Health*, Nov 1990, 80(11): 1338–1342.
- [126] Stamm W E. *Chlamydia* screening : expanding the scope. *Ann Intern Med*, Oct 2004, 141(7): 570–572.
- [127] Tamarelle J, de Barbeyrac B, Le Hen I, Thiébaud A, Bébéar C, Ravel J, Delarocque-Astagneau E. Vaginal microbiota composition and association with prevalent *Chlamydia trachomatis* infection : a cross-sectional study of young women attending a sti clinic in france. *Sex Transm Infect*, 12 2018, 94(8): 616–618.
- [128] Fadrosch D W, Ma B, Gajer P, Sengamalay N, Ott S, Brotman R M, Ravel J. An improved dual-indexing approach for multiplexed 16s rna gene sequencing on the illumina miseq platform. *Microbiome*, Feb 2014, 2(1): 6–6.
- [129] Kozich J J, Westcott S L, Baxter N T, Highlander S K, Schloss P D. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the miseq illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol*, Sep 2013, 79(17): 5112–5120.
- [130] Holm J B, Gajer P, Ravel J. Pecan : A fast, novel 16s rna gene sequence non- clustering based taxonomic assignment tool, 2016.
- [131] R Core Team. *R : A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2016.
- [132] Lin J. Divergence measures based on the shannon entropy. *IEEE Transactions on Information theory*, 1991, 37(1): 145–151.
- [133] Mark K, Brotman R M, Martinez-Greiwe S, Terplan M, Bavoil P, Ravel J. *Chlamydia* in adolescent/adult reproductive management trial study (charm) : Clinical core protocol. *Contemp Clin Trials Commun*, Jul 2019, 15: 100414.
- [134] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, Han A W, Johnson A J, Holmes S P. Dada2 : High-resolution sample inference from illumina amplicon data. *Nat Methods*, 07 2016, 13(7): 581–583.
- [135] Holm J B, Humphrys M S, Robinson C K, Settles M L, Ott S, Fu L, Yang H, Gajer P, He X, McComb E, Gravitt P E, Ghanem K G, Brotman R M, Ravel J. Ultrahigh-throughput multiplexing and sequencing of >500-base-pair amplicon regions on the illumina hiseq 2500 platform. *mSystems*, Jan-Feb 2019, 4(1).
- [136] de Barbeyrac B, Rahib D, de Diego S, Le Roy C, Bébéar C, Lydié N. Internet testing for *Chlamydia trachomatis* in france in 2012. *Sex Transm Infect*, Jul 2013, 89(Suppl 1): A155–A156.

- [137] Lydié N, de Barbeyrac B, Bluzat L, Le Roy C, Kersaudy-Rahib D. Chlamyweb study i : rationale, design and acceptability of an internet-based *Chlamydia* testing intervention. *Sex Transm Infect*, 05 2017, 93(3): 179–187.
- [138] van Wees D A, den Daas C, Kretzschmar M E E, Heijne J C M. Double trouble : modelling the impact of low risk perception and high-risk sexual behaviour on *Chlamydia* transmission. *J R Soc Interface*, Apr 2018, 15(141).
- [139] Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora : a review. *Obstet Gynecol Surv*, Jul 2010, 65(7): 462–473.
- [140] Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallén A, Fredlund H, Jensen J S, Engstrand L, Unemo M. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age - sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*, 2013, 8(4).
- [141] Taha T E, Hoover D R, Dallabetta G A, Kumwenda N I, Mtimavalye L A, Yang L P, Liomba G N, Broadhead R L, Chipangwi J D, Miotti P G. Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora : association with increased acquisition of hiv. *AIDS*, Sep 1998, 12(13): 1699–1706.
- [142] van Houdt R, Ma B, Bruisten S M, Speksnijder A G C L, Ravel J, de Vries H J C. *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota is associated with increased susceptibility to *Chlamydia trachomatis* infection in dutch women : a case-control study. *Sex Transm Infect*, 03 2018, 94(2): 117–123.
- [143] Ravel J, Brotman R M, Gajer P, Ma B, Nandy M, Fadrosh D W, Sakamoto J, Koenig S S, Fu L, Zhou X, Hickey R J, Schwebke J R, Forney L J. Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome*, Dec 2013, 1(1): 29–29.
- [144] Srinivasan S, Liu C, Mitchell C M, Fiedler T L, Thomas K K, Agnew K J, Marrazzo J M, Fredricks D N. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One*, Apr 2010, 5(4): e10197.
- [145] Brotman R M, Ravel J, Cone R A, Zenilman J M. Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by gram stain analysis. *Sex Transm Infect*, Aug 2010, 86(4): 297–302.
- [146] Tamarelle J, Thiébaud A C M, Sabin B, Bébéar C, Judlin P, Fauconnier A, Rahib D, Méau-de-Roufai L, Ravel J, Morré S A, de Barbeyrac B, E Delarocque-Astagneau, i-Predict study group. Early screening for *Chlamydia trachomatis* in young women for primary prevention of pelvic inflammatory disease (i-predict) : study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, Nov 2017, 18(1): 534.
- [147] Ma B, Forney L J, Ravel J. Vaginal microbiome : rethinking health and disease. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66: 371–389.
- [148] Macklaim J M, Cohen C R, Donders G, Gloor G B, Hill J E, Parham G P, Ravel J, Spear G, van de Wijgert J, Reid G. Exploring a road map to counter misconceptions about the cervicovaginal microbiome and disease. *Reprod Sci*, Nov 2012, 19(11): 1154–1162.
- [149] Relman D A. The human microbiome : ecosystem resilience and health. *Nutr Rev*, Aug 2012, 70 Suppl 1: 2–9.
- [150] Lau C Y, Qureshi A K. Azithromycin versus doxycycline for genital chlamydial infections : a meta-analysis of randomized clinical trials. *Sex Transm Dis*, Sep 2002, 29(9): 497–502.

- [151] Horner P J. Azithromycin antimicrobial resistance and genital *Chlamydia trachomatis* infection : duration of therapy may be the key to improving efficacy. *Sex Transm Infect*, Apr 2012, 88(3): 154–156.
- [152] Vickers D M, Osgood N D. The arrested immunity hypothesis in an immunoepidemiological model of *Chlamydia* transmission. *Theor Popul Biol*, May 2014, 93: 52–62.
- [153] Bent S J, Forney L J. The tragedy of the uncommon : understanding limitations in the analysis of microbial diversity. *ISME J*, Jul 2008, 2(7): 689–695.
- [154] Wiegand I, Hilpert K, Hancock R E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (mic) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 163–175.
- [155] Oksanen J, Blanchet F G, Kindt R, Legendre P, O'hara RB, Simpson G L, Solymos P, Stevens M H H, Wagner H. Vegan : community ecology package. r package version 1.17-4. <http://cran.r-project.org>. Acesso em, 2010, 23: 2010.
- [156] van de Wijgert J H, Morrison C S, Brown J, Kwok C, Van Der Pol B, Chipato T, Byamugisha J K, Padian N, Salata R A. Disentangling contributions of reproductive tract infections to hiv acquisition in african women. *Sex Transm Dis*, Jun 2009, 36(6): 357–364.
- [157] Low N, Chersich M F, Schmidlin K, Egger M, Francis S C, van de Wijgert J H, Hayes R J, Baeten J M, Brown J, Delany-Moretlwe S, Kaul R, McGrath N, Morrison C, Myer L, Temmerman M, van der Straten A, Watson-Jones D, Zwahlen M, Hilber A M. Intra-vaginal practices, bacterial vaginosis, and hiv infection in women : individual participant data meta-analysis. *PLoS Med*, Feb 2011, 8(2).
- [158] Petrova M I, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in hiv transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev*, Sep 2013, 37(5): 762–792.
- [159] Chernes T L, Melan M A, Kant J A, Cosentino L A, Meyn L A, Hillier S L. Genital tract shedding of herpes simplex virus type 2 in women : effects of hormonal contraception, bacterial vaginosis, and vaginal group b *Streptococcus* colonization. *Clin Infect Dis*, May 2005, 40(10): 1422–1428.
- [160] Lee J E, Lee S, Lee H, Song YM, Lee K, Han M J, Sung J, Ko G. Association of the vaginal microbiota with human papillomavirus infection in a korean twin cohort. *PLoS one*, 2013, 8(5): e63514.
- [161] Dareng E O, Ma B, Famooto A O, Adebamowo S N, Offiong R A, Olaniyan O, Dakum P S, Wheeler C M, Fadrosch D, Yang H, Gajer P, Brotman R M, Ravel J, Adebamowo C A. Prevalent high-risk hpv infection and vaginal microbiota in nigerian women. *Epidemiol Infect*, 01 2016, 144(1): 123–137.
- [162] Haahr T, Humaidan P, Elbaek H O, Alsbjerg B, Laursen R J, Rygaard K, Johansen T B, Andersen P S, Ng K L, Jensen J S. Vaginal microbiota and ivf outcomes : development of a simple diagnostic tool to predict patients at risk of a poor reproductive outcome. *J Infect Dis*, Dec 2018.
- [163] Shannon B, Yi T J, Perusini S, Gajer P, Ma B, Humphrys M S, Thomas-Pavanel J, Chieza L, Janakiram P, Saunders M, Tharao W, Huibner S, Shahabi K, Ravel J, Rebapragada A, Kaul R. Association of hpv infection and clearance with cervicovaginal immunology and the vaginal microbiota. *Mucosal Immunol*, 09 2017, 10(5): 1310–1319.

- [164] Fethers K A, Fairley C K, Hocking J S, Gurrin L C, Bradshaw C S. Sexual risk factors and bacterial vaginosis : a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*, Dec 2008, 47(11): 1426–1435.
- [165] Turner A N, Reese P C, Fields K S, Anderson J, Ervin M, Davis J A, Fichorova R N, Roberts M W, Klebanoff M A, Jackson R D. A blinded, randomized controlled trial of high-dose vitamin d supplementation to reduce recurrence of bacterial vaginosis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 2014, 211(5): 479.e1–.e13.
- [166] Xiao B B, Zhang D, Chen R, Shi H R, Xin X R, Wang H L, Pang Y C, Zhu S N, Yao C, Liao Q P. [sucrose gel for treatment of bacterial vaginosis : a randomized, double-blind, multi-center, parallel-group, phase iii clinical trial]. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, Dec 2015, 47(6): 925–932.
- [167] Schwebke J R, Morgan F G, Koltun W, Nyirjesy P. A phase-3, double-blind, placebo-controlled study of the effectiveness and safety of single oral doses of secnidazole 2 g for the treatment of women with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol*, 12 2017, 217(6): 678.e1–e9.
- [168] Hakimi S, Farhan F, Farshbaf-Khalili A, Dehghan P, Javadzadeh Y, Abbasalizadeh S, Khalvati B. The effect of prebiotic vaginal gel with adjuvant oral metronidazole tablets on treatment and recurrence of bacterial vaginosis : a triple-blind randomized controlled study. *Arch Gynecol Obstet*, 01 2018, 297(1): 109–116.
- [169] Pendharkar S, Brandsborg E, Hammarström L, Marcotte H, Larsson P G. Vaginal colonisation by probiotic lactobacilli and clinical outcome in women conventionally treated for bacterial vaginosis and yeast infection. *BMC infect dis*, Jul 2015, 15: 255.
- [170] Aguin T J, Akins R A, Sobel J D. High-dose vaginal metronidazole for recurrent bacterial vaginosis—a pilot study. *J Low Genit Tract Dis*, Apr 2014, 18(2): 156–161.
- [171] Bradshaw C S, Morton A N, Hocking J, Garland S M, Morris M B, Moss L M, Horvath L B, Kuzevska I, Fairley C K. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. *J Infect Dis*, Jun 2006, 193(11): 1478–1486.
- [172] Schwebke J R, Richey C M, Weiss H L. Correlation of behaviors with microbiological changes in vaginal flora. *J Infect Dis*, Nov 1999, 180(5): 1632–1636.
- [173] Hay P E, Ugwumadu A, Chowns J. Sex, thrush and bacterial vaginosis. *Int J STD AIDS*, Oct 1997, 8(10): 603–608.
- [174] Keane F E, Ison C A, Taylor-Robinson D. A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Int J STD AIDS*, Aug 1997, 8(8): 489–494.
- [175] Priestley C J, Jones B M, Dhar J, Goodwin L. What is normal vaginal flora? *Genitourin Med*, Feb 1997, 73(1): 23–28.
- [176] Schwebke J R, Morgan S C, Weiss H L. The use of sequential self-obtained vaginal smears for detecting changes in the vaginal flora. *Sex Transm Dis*, Apr 1997, 24(4): 236–239.
- [177] Brotman R M, Ghanem K G, Klebanoff M A, Taha T E, Scharfstein D O, Zenilman J M. The effect of vaginal douching cessation on bacterial vaginosis : a pilot study. *Am J Obstet Gynecol*, Jun 2008, 198(6): 1–7.
- [178] Workowski K A, Berman S, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep*, Dec 2010, 59(RR-12): 1–110.



- [179] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, Cole J R. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rna sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*, Aug 2007, 73(16): 5261–5267.
- [180] Abbai N S, Nyirenda M, Naidoo S, Ramjee G. Prevalent herpes simplex virus-2 increases the risk of incident bacterial vaginosis in women from south africa. *AIDS Behav*, Jul 2018, 22(7): 2172–2180.
- [181] Baeten J M, Hassan W M, Chohan V, Richardson B A, Mandaliya K, Ndinya-Achola J O, Jaoko W, McClelland R S. Prospective study of correlates of vaginal *Lactobacillus* colonisation among high-risk hiv-1 seronegative women. *Sex Transm Infect*, Sep 2009, 85(5): 348–353.
- [182] Francis S C, Looker C, Vandepitte J, Bukenya J, Mayanja Y, Nakubulwa S, Hughes P, Hayes R J, Weiss H A, Grosskurth H. Bacterial vaginosis among women at high risk for hiv in uganda : high rate of recurrent diagnosis despite treatment. *Sex Transm Infect*, Mar 2016, 92(2): 142–148.
- [183] Holzman C, Leventhal J M, Qiu H, Jones N M, Wang J, BV Study Group. Factors linked to bacterial vaginosis in non-pregnant women. *Am J Public Health*, Oct 2001, 91(10): 1664–1670.
- [184] McClelland R S, Richardson B A, Graham S M, Masese L N, Gitau R, Lavreys L, Mandaliya K, Jaoko W, Baeten J M, Ndinya-Achola J O. A prospective study of risk factors for bacterial vaginosis in hiv-1-seronegative african women. *Sex Transm Dis*, Jun 2008, 35(6): 617–623.
- [185] Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect*, Feb 2004, 80(1): 58–62.
- [186] Vodstrcil L A, Walker S M, Hocking J S, Law M, Forcey D S, Fehler G, Bilardi J E, Chen M Y, Fethers K A, Fairley C K, Bradshaw C S. Incident bacterial vaginosis (bv) in women who have sex with women is associated with behaviors that suggest sexual transmission of bv. *Clin Infect Dis*, Apr 2015, 60(7): 1042–1053.
- [187] Taha T E, Kumwenda N I, Kafulafula G, Makanani B, Nkhoma C, Chen S, Tsui A, Hoover D R. Intermittent intravaginal antibiotic treatment of bacterial vaginosis in hiv-uninfected and -infected women : a randomized clinical trial. *PLoS Clin Trials*, Feb 2007, 2(2).
- [188] Witkin S S, Mendes-Soares H, Linhares I M, Jayaram A, Ledger W J, Forney L J. Influence of vaginal bacteria and d-and l-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer : implications for protection against upper genital tract infections. *MBio*, 2013, 4(4): e00460–13.
- [189] Edwards V L, Smith S B, McComb E J, Tamarelle J, Ma B, Humphrys M S, Gajer P, Gwilliam K, Schaefer A M, Lai S K, Terplan M, Mark K S, Brotman R M, Forney L J, Bavoil P M, Ravel J. The cervicovaginal microbiota-host interaction modulates *Chlamydia trachomatis* infection. *MBio*, Aug 2019, 10(4).
- [190] Santiago G L, Tency I, Verstraelen H, Verhelst R, Trog M, Temmerman M, Vancoillie L, Decat E, Cools P, Vanechoutte M. Longitudinal qpcr study of the dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (sialidase positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the vagina. *PLoS One*, 2012, 7(9).
- [191] Zhou X, Brown C J, Abdo Z, Davis C C, Hansmann M A, Joyce P, Foster J A, Forney L J. Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy caucasian and black women. *ISME J*, Jun 2007, 1(2): 121–133.

- [192] Fettweis J M, Brooks J P, Serrano M G, Sheth N U, Girerd P H, Edwards D J, Strauss J F, Consortium The Vaginal Microbiome, Jefferson K K, Buck G A. Differences in vaginal microbiome in african american women versus women of european ancestry. *Microbiology*, Oct 2014, 160(Pt 10): 2272–2282.
- [193] Schwebke J R, Desmond R. Risk factors for bacterial vaginosis in women at high risk for sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis*, Nov 2005, 32(11): 654–658.
- [194] Yotebieng M, Turner A N, Hoke T H, Van Damme K, Rasolofomanana J R, Behets F. Effect of consistent condom use on 6-month prevalence of bacterial vaginosis varies by baseline bv status. *Trop Med Int Health*, Apr 2009, 14(4): 480–486.
- [195] Madden T, Grentzer J M, Secura G M, Allsworth J E, Peipert J F. Risk of bacterial vaginosis in users of the intrauterine device : a longitudinal study. *Sex Transm Dis*, Mar 2012, 39(3): 217–222.
- [196] Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw C S, Cone R A. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Res Microbiol*, Nov 2017, 168(9-10): 782–792.
- [197] Fettweis J M, Serrano M G, Brooks J P, Edwards D J, Girerd P H, Parikh H I, Huang B, Arodz T J, Edupuganti L, Glascock A L, Xu J, Jimenez N R, Vivadelli S C, Fong S S, Sheth N U, Jean S, Lee V, Bokhari Y A, Lara A M, Mistry S D, Duckworth R A, Bradley S P, Koparde V N, Orenda X V, Milton S H, Rozycki S K, Matveyev A V, Wright M L, Huzurbazar S V, Jackson E M, Smirnova E, Korlach J, Tsai Y C, Dickinson M R, Brooks J L, Drake J I, Chaffin D O, Sexton A L, Gravett M G, Rubens C E, Wijesooriya N R, Hendricks-Muñoz K D, Jefferson K K, Strauss J F, Buck G A. The vaginal microbiome and preterm birth. *Nat Med*, 06 2019, 25(6): 1012–1021.
- [198] Hay P E, Lamont R F, Taylor-Robinson D, Morgan D J, Ison C, Pearson J. Abnormal bacterial colonisation of the genital tract and subsequent preterm delivery and late miscarriage. *BMJ*, Jan 1994, 308(6924): 295–298.
- [199] Singer M, Borg M, Ouburg S, Morré S A. The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment-a meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, Apr 2019, 48(4): 223–229.
- [200] Haahr T, Jensen J S, Thomsen L, Duus L, Rygaard K, Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes : a prospective study in ivf patients. *Hum Reprod*, Apr 2016, 31(4): 795–803.
- [201] van den Munckhof E H A, van Sitter R L, Boers K E, Lamont R F, Te Witt R, le Cessie S, Knetsch C W, van Doorn L J, Quint W G V, Molijn A, Leverstein-van Hall M A. Comparison of amsel criteria, nugent score, culture and two ce-ivd marked quantitative real-time pcrs with microbiota analysis for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, May 2019, 38(5): 959–966.
- [202] Morré S A, Karimi O, Ouburg S. *Chlamydia trachomatis* : identification of susceptibility markers for ocular and sexually transmitted infection by immunogenetics. *FEMS Immunol Med Microbiol*, Mar 2009, 55(2): 140–153.





**Titre :** Composition et dynamique du microbiote vaginal : facteurs associés et rôle dans l'infection par *Chlamydia trachomatis*

**Mots clés :** microbiome, *Chlamydia trachomatis*, infection sexuellement transmissible, vaginal, séquençage

**Résumé :** *Chlamydia trachomatis* (CT) est une bactérie sexuellement transmissible responsable d'infections génitales hautes pouvant conduire à une infertilité tubaire ou à des grossesses extra-utérines. C'est l'infection sexuellement transmissible la plus fréquente dans le monde, y compris en France. Les données épidémiologiques indiquent que l'incidence de cette infection est en augmentation malgré les mesures de contrôle mises en place, ce qui motive la révision des recommandations actuelles de dépistage de l'infection à CT. Le microbiote vaginal pourrait jouer un rôle majeur dans la prévention des IST via la compétition écologique et la production de métabolites, dont l'acide lactique. Le microbiote vaginal correspond à un équilibre dynamique fragile et susceptible d'être modifié par un ensemble d'expositions, parmi lesquelles les pratiques sexuelles et d'hygiène intime, l'exposition aux antibiotiques mais aussi la présence de pathogènes. L'objectif général de cette thèse est d'étudier ce triangle d'associations entre expositions, microbiote vaginal et infection par CT, à travers l'étude de la composition et de la dynamique du microbiote vaginal. Nous avons cherché à répondre aux questions suivantes : existe-t-il des marqueurs de l'infection par CT au niveau du microbiote vaginal ? La composition et la structure du microbiote vaginal sont-elles modifiées par l'infection par CT et la prise d'antibiotiques ? Quels sont les expositions associées à des perturbations du microbiote vaginal ? Pour répondre à ces questions, une première étape a consisté à réaliser un état de l'art et d'estimer l'association entre microbiote vaginal et infection par CT dans la littérature, ainsi que pour trois autres IST d'importance clinique, et à évaluer le rôle de plusieurs facteurs dans l'hétérogénéité des mesures d'association observées. Dans un second temps, nous avons estimé cette association en s'appuyant sur la caractérisation moléculaire du microbiote vaginal, dans deux études en France et aux Etats-Unis. Nous

avons montré qu'il y avait une surreprésentation des communautés bactériennes dominées par *Lactobacillus iners* (CST III) et de celles dépourvues de *Lactobacillus* spp. (CST IV) chez les femmes infectées par CT. En étudiant l'évolution du microbiote vaginal dans l'étude américaine, après traitement par azithromycine et clairance de CT, nous avons montré que le microbiote vaginal ne parvenait pas à évoluer vers un état optimal. Ce résultat laisse supposer qu'il persiste après traitement un risque vis-à-vis des réinfections. Enfin, dans deux études longitudinales à échantillonnage fréquent aux Etats-Unis, nous avons étudié les expositions associées à l'incidence et à la clairance d'un CST IV. Nous avons montré que lorsque le microbiote vaginal n'était pas dominé par *L. iners*, les facteurs associés à l'incidence d'un CST IV et à sa clairance étaient essentiellement les menstruations, tandis que chez les femmes dont le microbiote vaginal est dominé par *L. iners*, les menstruations mais aussi l'usage de lubrifiant, les douches vaginales, l'origine ethnique, l'âge et les rapports sexuels non protégés étaient associés à l'incidence d'un CST IV ou à sa clairance. Ainsi, ce travail de thèse a permis d'une part de confirmer l'association entre microbiote vaginal dépourvu de *Lactobacillus* et infection par CT en population en s'appuyant sur le séquençage génomique, et d'autre part de distinguer l'espèce *L. iners* des autres espèces de *Lactobacillus* et d'évaluer le risque associé au CST III. En permettant une meilleure compréhension de l'histoire naturelle de CT et des dynamiques du microbiote vaginal, nous espérons proposer des pistes pour améliorer les stratégies de contrôle de l'infection par CT et d'autres IST. Le potentiel innovant du projet réside dans l'usage de méthodes moléculaires nous permettant d'affiner notre approche de la santé en intégrant la prédisposition individuelle aux infections sexuellement transmissibles, ouvrant ainsi la voie vers la médecine personnalisée.

**Title :** Composition and dynamics of the vaginal microbiota: associated factors and role in *Chlamydia trachomatis* infection

**Keywords :** microbiome, *Chlamydia trachomatis*, sexually transmitted infection, vaginal, sequencing

**Abstract :** *Chlamydia trachomatis* (CT) is a sexually transmitted bacteria responsible for cervicitis, urethritis, and pelvic inflammatory diseases leading to subsequent tubal infertility and ectopic pregnancies. It is the most frequent sexually transmitted bacteria worldwide, including in France. Epidemiological data indicate that the incidence rate is increasing despite the implementation of control measures, which motivates the revision of current screening strategies. The vaginal microbiota could play a major role in preventing sexually transmitted infections through ecological competition and metabolites, such as lactic acid production. The vaginal microbiota corresponds to a fine-tuned equilibrium likely to be modified by exposures such as sexual practices, hygiene practices, antibiotics but also presence of pathogens. The overall objective of this thesis is to study the association in this triangle composed of external exposures, vaginal microbiota and CT infection, through the study of the vaginal microbiota composition and dynamics. We aimed at answering these questions: are there biomarkers of CT infection in the vaginal microbiota? Are the vaginal microbiota composition and structure modified by CT infection and antibiotic consumption? What are the exposures associated with perturbations of the vaginal microbiota? To answer these questions, the first step consisted of a state of the art to estimate the association between vaginal microbiota and CT infection in the literature, as well as three other clinically relevant sexually transmitted infections, and to evaluate the role of several factors in the observed heterogeneity between studies. In a second step, we estimated this association using molecular characterization of the vaginal microbiota in two studies

in France and in the United States. We showed that *Lactobacillus iners*-dominated communities (CST III) and *Lactobacillus*-depleted communities (CST IV) were over-represented among CT-positive women. By studying the vaginal microbiota after azithromycin treatment and CT clearance in the American study, we showed that the vaginal microbiota did not evolve towards an optimal state, suggesting that women may stay at risk of CT reinfections. Finally, in two longitudinal studies using frequent sampling in the United States, we studied exposures associated with incidence and clearance of a CST IV. We showed that when the vaginal microbiota was not dominated by *L. iners*, menses was the main factor associated with incidence and clearance of a CST IV, while for women whose vaginal microbiota is dominated by *L. iners*, menses but also lubricant use, douching, ethnic origins, age and condomless vaginal sex were associated with CST IV incidence and/or clearance. Therefore, this thesis allowed on the one hand to confirm the association between *Lactobacillus*-depleted vaginal microbiota and CT infection using genome sequencing, and on the other hand to single out *L. iners* from other *Lactobacillus* spp. and to evaluate the risk associated with CST III. By enabling a better understanding of the natural history of CT and of the vaginal microbiota dynamics, we hope to contribute to improving strategies for the control of CT infection and other STIs. The innovative potential of the project lies in the use of molecular methods, which allows refining of our approach of health management by integrating individual predisposition to sexually transmitted infections, thus paving the way for personalized medicine.

