



HAL
open science

Effet de l'hormone stéroïdienne 17 β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus*, marqueur de l'homéostasie vaginale

Maximilien Clabaut

► To cite this version:

Maximilien Clabaut. Effet de l'hormone stéroïdienne 17 β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus*, marqueur de l'homéostasie vaginale. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2021. Français. NNT : 2021NORMR112 . tel-04047039

HAL Id: tel-04047039

<https://theses.hal.science/tel-04047039v1>

Submitted on 27 Mar 2023

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.



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE

Préparée au sein de l'Université de Rouen Normandie

Effet de l'hormone stéroïdienne 17β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus*, marqueur de l'homéostasie vaginale

**Présentée et soutenue par
Maximilien CLABAUT**

Thèse soutenue publiquement le 09/06/2021
devant le jury composé de

M. ALAIN DUFOUR	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Bretagne Sud	Rapporteur du jury
Mme MARIE-FRANCE PILET	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, INRAE, Nantes	Rapporteur du jury
Mme VANESSA LIEVIN-LE-MOAL	MAITRE DE CONFERENCE, COMUE Universités Paris-Saclay	Membre du jury
M. GERARD REDZINIAK	COSMETIC INVENTIONS	Membre du jury
M. MARC FEUILLOLEY	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Rouen Normandie	Directeur de thèse
Mme SYLVIE LAURENCY-CHEVALIER	PROFESSEUR DES UNIVERSITES, Université Rouen Normandie	Co-directeur de thèse

Thèse dirigée par MARC FEUILLOLEY et SYLVIE CHEVALIER-LAURENCY,
LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE SIGNAUX ET MICROENVIRONNEMENT



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



***A ma famille
et mes amis***

Remerciements

Un merci particulier aux membres du jury. Je sais bien que cela n'est pas facile de trouver du temps pendant cette période qui ne rend pas les choses faciles, alors un grand merci à vous tous : **Marie-France Pilet, Vanessa Liévin-Le-Moal, Gérard Redziniak, Alain Dufour, Marc Feuilloley** et **Sylvie Chevalier Laurency**. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse et merci pour votre disponibilité.

Marc, merci de m'avoir accepté dans ton laboratoire depuis le master 1 et de m'avoir fait confiance pour cette thèse. Toutes tes grandes histoires vont me manquer et je te souhaite tout le meilleur pour la suite de tes nouvelles aventures.

Sylvie, je ne te remercierai jamais assez de tout ce que tu as fait pour moi, j'ai adoré travailler avec toi depuis le M1. Tu es celle qui m'a toujours donné l'envie d'avancer et qui m'a toujours poussé vers le haut. Si j'en suis là aujourd'hui, c'est en partie grâce à toi. MILLE MERCI. Et surtout bon courage pour la suite et tes nouvelles responsabilités de directrice du labo.

Merci également à toutes les personnes qui ont rendu possible le projet GYNCEUTICS si intéressant: **Gérard, Madina, Coralie, Lily** et en particulier à **Amandine S** et **Chantal** qui m'ont fait passer une belle semaine au sein de leur labo à Orléans.

Julien Verdon merci à toi pour les manips de MEB et également d'avoir fait partie de mon CSI pour suivre les avancées de ma thèse depuis le début. **Julie Hardouin** pour les manips de protéomique et de ton implication lors de l'analyse des résultats.

Amine, Cécile, Ali et **Pierre-jean** pour votre participation et votre aide sur certains points clés de ma thèse !

Magalie et **Olivier** les techniciens magiciens, ça a toujours été un plaisir de travailler avec vous et de vous savoir toujours disponible au labo pour n'importe quelle question ou aide. Ne changez pas. **Florian**, je ne doute pas que tu auras rapidement tous ces pouvoirs magiques de la dream team tech.

Sans en faire des tonnes dans l'écriture de ces remerciements je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont travaillé avec moi. Et d'avoir eu cette chance incroyable de pouvoir partager des moments avec la totalité de mes collègues. Sans oublier ceux qui sont devenu plus que cela, faisant intégralement partie de ma vie et de ces belles dernières années d'étude.

Je pense à **Annabelle, Yoan, Olivier, Nicole, Anne, Coco, Xavier L, Emeline, Cathy** et **Amandine**

Les post-doc de passage au labo qui m'ont apporté beaucoup **Florie, Sophie, Manon**

Les anciens doctorants **Thomas, Ségo, Valérie, Matthias, Damien, Melyssa,**

Les doctorants avec qui on a commencé et réussi ensemble ! **Cecil** et **Xavier**.

Mais surtout Booby, **Mathilde**, obligé de mettre une ligne simplement pour toi ! On se suit, on s'enjaille, et se monte le crâne, on se plaint, on refait le monde, on n'a pas de chances et on trinque ensemble depuis le M1 et tout cela va me manquer ! (Je garde bien évidemment tous les exemples de nos exploits dans un coin de ma tête) Bon courage pour la dernière ligne droite et n'oublies pas que t'es la meilleure. Bref, on en reparle très vite !

Djou également, merci pour ta bonne humeur, tes rires et tes coups de gueules qui me font rêver. Ne changes pas et fonce pour la dernière ligne droite !!!!

Yvann le biotechnologiste, je te souhaite tout le meilleur et une grande réussite pour la dernière ligne droite de ta thèse ! Courage fréro, je croise les doigts pour un prochain Nature.

Mélessande & Flore, les vamps

Clarisse, Thibault, Audrey, Emilie, Charly

Sans oublier le personnel du campus et en particulier **Cristelle** pour la participation à toutes les formations.

Normadoc et le comité d'organisation des JED

Ma famille et mes amis, Mes grands-parents et en particulier ma grand-mère « mémé **Collette** », Mes parents (**Sylvie** et **Laurent**), Mes frères (**Guillaume, Florentin** et **Tristan**), **Clara, Germain, Guillaume L, Cécile**, et tous ceux que j'aime.

Liste des abréviations.....	10
Liste des figures	14
Liste des tableaux	16
Introduction	18
I. Physiologie vaginale et environnement hormonal	20
1. Généralités.....	20
a. Anatomie et physiologie vaginale	20
b. Muqueuses et épithélium vaginal	22
c. Mucus et sécrétions vaginales.....	22
d. Le système immunitaire de l’environnement vaginal	24
2. Le système endocrinien	28
a. Les hormones stéroïdiennes	28
b. Les œstrogènes.....	30
c. Le cycle menstruel.....	32
d. La ménopause	32
e. Relations entre glycogène, contexte hormonal et microbiote	34
II. Le microbiote vaginal	36
1. Communautés microbiennes caractéristiques de l’environnement vaginal	36
2. Le microbiote vaginal évolue au cours de la vie d’une femme	38
3. Eubiose, microflore lactobacillaire vaginale	42
a. Caractéristiques générales	42
b. Effets protecteurs des lactobacilles.....	44
c. Variations hormonales et lactobacilles	48
d. Dysbioses vaginales	52
e. Déséquilibre du microbiote.....	52
f. Infections vaginales	54
i. Vaginoses bactériennes.....	54
ii. La vaginite aérobie	54
iii. Autres infections vaginales.....	56
g. Approche thérapeutique des infections vaginales et dysbioses	58
III. <i>Lactobacillus crispatus</i>	66
1. Présentation et caractéristiques générales.....	66
a. Présentation générale de la cellule et de sa physiologie	66
b. Membranes, peptidoglycane, couche S et polysaccharides	66

2. Adaptations spécifiques à l'habitat vaginal	76
a. Production d'antimicrobiens	78
i. Production d'acide organique	78
ii. Peroxyde d'hydrogène et formation d'espèces réactives de l'oxygène	80
iii. Bactériocines	86
b. Relation entre glycogène et acide lactique	88
c. Production de biosurfactants	92
d. Propriétés physico-chimiques de surface.....	94
e. Adhérence aux cellules épithéliales et à la muqueuse.....	94
i. Adhésines	96
f. Formation de biofilms	100
i. Biofilms	100
ii. Auto-agrégation et co-agrégation.....	104
g. <i>L. crispatus</i> et immunité vaginale.....	106
IV. Endocrinologie microbienne	108
1. Concept et historique	108
2. Effets des hormones stéroïdiennes chez les bactéries	110
3. Importance de l'endocrinologie microbienne et espoirs thérapeutiques	112
Concepts et objectifs de la thèse	114
I. Le projet GYNCEUTICS	116
II. Objectifs de la thèse	118
Résultats	124
Article 1	126
Draft Genome Sequence of <i>Lactobacillus crispatus</i> CIP 104459, Isolated from a Vaginal Swab	126
Article 2	128
Effect of 17 β -estradiol on a Human Vaginal <i>Lactobacillus crispatus</i> Strain	128
Article 3	140
Draft Genome Sequence of <i>Lactobacillus crispatus</i> Strain V4, Isolated from a Vaginal Swab from a Young Healthy Nonmenopausal Woman	140
Article 4	142
Variability of human vaginal <i>Lactobacillus crispatus</i> response to 17 β -estradiol	142
Discussion générale	214
I. Prélèvement et sélections des souches de <i>L. crispatus</i>	215
II. Séquençage et comparaison génomique des souches CIP 104459 et V4	216

III.	Effet du 17 β -estradiol sur la physiologie des <i>L. crispatus</i> V4 et CIP 104459	217
1.	Effet du 17 β -estradiol sur la croissance.....	218
2.	Effet du sur la capacité d'adhérence des souches sur cellules épithéliales vaginales.....	219
3.	Effet du 17 β -estradiol sur le phénomène d'auto-agrégation cellulaire.....	219
4.	Effet du 17 β -estradiol sur la capacité à former des biofilms.....	221
5.	Effet du 17 β -estradiol sur la production de biosurfactants	224
6.	Effet du 17 β -estradiol sur les propriétés physico-chimiques de surface.....	225
7.	Effet du 17 β -estradiol sur la fluidité membranaire.....	228
8.	Effet du 17 β -estradiol sur la taille des bactéries	230
9.	Effet du 17 β -estradiol sur le protéome total des deux souches.....	231
IV.	Recherche de récepteur(s) pour le 17 β -estradiol.....	232
	Conclusion et perspectives.....	236
	Matériels et méthodes	242
I.	Matériels et Méthodes.....	243
1.	Obtention et conservation de la souche de <i>L. crispatus</i> CIP104459	243
2.	Collecte et identification d'une nouvelle souche de <i>L. crispatus</i>	243
a.	Ecouvillonnage.....	243
i.	Panels de volontaires	243
ii.	Récupération des germes.....	243
b.	Cultures et isolements.....	244
i.	Mise en culture.....	244
ii.	Aspects macroscopiques	244
c.	Identification par analyse du protéome total par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF couplée au logiciel Biotyper®	244
d.	Sélection des souches.....	245
3.	Séquençage de l'ADNr 16s de <i>L. cristapus</i> V4	245
a.	Extraction.....	245
b.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	245
c.	Séquençage	246
d.	Analyse bioinformatique	246
4.	Séquençage de l'ADN génomique total de <i>L. crispatus</i> CIP 104459 et <i>L. crispatus</i> V4 247	
a.	Vérifications et contrôles de la qualité de l'ADN extrait.....	247
b.	Elaboration de la librairie	247
c.	Séquençage de L'ADN par Illumina Miseq	247

d.	Assemblage.....	247
e.	Annotation.....	247
f.	Analyses phylogénétiques.....	248
5.	Conditions de culture des <i>L. crispatus</i> CIP104459 et V4.....	248
6.	17 β -estradiol et conditions de traitements.....	248
7.	Conditions de culture des cellules VK2/E6E7.....	248
8.	Etude de l'effet du 17 β -estradiol sur <i>L. crispatus</i> CIP 104459 et V4.....	249
a.	Etude de l'effet du 17 β -estradiol sur la croissance.....	249
b.	Etude de la fluidité membranaire par mesure d'anisotropie.....	249
c.	Etude de l'adhésion microbienne aux solvants (Tests MATS).....	250
d.	Étude de la capacité à s'auto-agrégéer par la technique de sédimentation.....	251
e.	Etude de la capacité à s'auto-agrégéer par cytométrie en flux.....	251
f.	Microscopie électronique à balayage.....	252
g.	Analyse de la capacité à produire des biosurfactants.....	253
i.	Observation du tapis bactérien sur gélose MRS.....	253
ii.	Technique de la goutte posée.....	253
iii.	Technique de la goutte pendante.....	253
h.	Etude du potentiel d'adhérence sur les cellules épithéliales vaginales VK2/E6E7.....	253
i.	Etude de la capacité à former des biofilms par la technique de la coloration au cristal violet 254	
j.	Etude de la capacité à former des biofilms par microscopie confocale à balayage laser.....	254
k.	Composition du Milieu simulant les sécrétions du tractus génital (SGTS).....	256
9.	Etude du protéome.....	257
a.	Extraction protéique.....	257
b.	Dosage des protéines.....	257
c.	Analyse par NanoLC-MS/MS.....	257
10.	Recherche du récepteur potentiel du 17 β estradiol chez <i>L. crispatus</i> CIP104459 et V4 258	
11.	Analyses de la liaison du 17 β estradiol par docking moléculaire.....	258
12.	Analyses statistiques.....	259
	Références bibliographiques.....	262
	Annexes.....	290

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNg : Acide DésoxyriboNucléique génomique
ARN : Acide RiboNucléique
ARS : Agence Régionale de Santé
ATP : Adénosine TriPhosphate
BS : Biosurfactants
BSA : Bovine Serum Albumin
CBM : Centre de Biophysique Moléculaire
Couche S : Couche Superficielle
CST : Community State Type
DEPC : Diéthylpyrocarbonate
DO : Densité Optique
DPH : 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EGF : Epidermal Growth Factor
EPS : Exopolysaccharides
ER : Estrogen Receptors
FSH : hormone folliculo-stimulante
FUI : Fonds Unique Interministériel
GADPH : glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GlcNac : N-acétylglucosamine
HMDS : Hexaméthylidisilazane
HSV : Herpes Simplex Virus
IL : Interleukine
IST : Infections Sexuellement Transmissibles
KSFM : Keratinocyte Serum-Free Medium
LAB : Lactic Acid Bacteria
LEA : Lactobacillus epithelial adhesin
LH : hormone lutéinisante

LMSM : Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement

LPS : Lipopolysaccharides

MATS : Microbial Adhesion To Solvant

MIP : Macrophages inflammatory protein

MMP-8 : Matrix MetalloProteinase-8

MOI : Multiplicity Of Infection

MRS : Man, Rogosa, Sharpe

MurNAc : N-acétylmuramique

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NCBI : National Center for Biotechnology Information

NGAL : Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

pH : Potentiel Hydrogène

poly(Gro-P) : poly-glycérophosphate

poly(Rbo-P) : poly-ribitolphosphate

ROS : Reactive Oxygen Species

SGTS : Simulating Genital Tract Secretion

SLPI : Secretory Leukocyte Protease Inhibitor

SRA : Sequence Read Archive

TAE : Tris, Acétate, EDTA

TFA : Acide TrifluoroAcétique

TLR : Toll-Like Receptors

TNF : Tumor Necrosis Factor

TOF : Time Of Flight

USA : United States of America

UV : Ultra Violet

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VPH : Virus du Papillome Humain

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de l'appareil reproductif féminin

Figure 2 : Représentation schématique de la paroi vaginale

Figure 3 : Composants immunologiques de l'environnement vaginal d'après Wessels *et al.*, 2018

Figure 4 : Synthèse des hormones stéroïdiennes

Figure 5 : Représentation des taux d'estradiol et de progestérone en fonction du cycle menstruel

Figure 6 : Représentation schématique de l'environnement vaginal en conditions normale et hypo-estrogénique

Figure 7 : Variations de l'environnement vaginal de la pré-puberté à la ménopause (d'après Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016)

Figure 8 : L'environnement vaginal pendant les états alternatifs d'eubiose et de vaginose bactérienne

Figure 9 : Axe hormones sexuelles – microbiote – immunité et sensibilité au VIH chez les femmes

Figure 10 : Représentation de différents facteurs physiques, mécaniques et physiologiques qui peuvent avoir un impact sur la physiologie des muqueuses génitales

Figure 11 : L'environnement vaginal pendant les états alternatifs d'eubiose et de vaginose bactérienne

Figure 12 : Exigences attendues d'une souche probiotique (Borges *et al.*, 2014)

Figure 13 : Cliché de microscopie électronique à balayage de *L. crispatus* CIP 104459 (Clabaut *et al.*, 2021)

Figure 14 : Représentation schématique de la membrane, de la paroi et de la couche S de *L. crispatus*

Figure 15 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane. Ici la structure type du peptidoglycane de plusieurs lactobacilles (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014).

Figure 16 : Représentation schématique de la structure des acides téichoïques (WTA) et des acides lipotéichoïques (LTA, Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014)

Figure 17 : Observation par microscopie électronique de la couche S chez *L. crispatus* DSM20584.

Figure 18 : : Les moyens de lutte des lactobacilles contre les autres micro-organismes potentiellement pathogènes

Figure 19 : Représentation schématique des différents types de protéines retrouvées chez les bactéries à Gram-positif (Desvaux *et al.*, 2006)

Figure 20 : Représentation des 5 étapes de la formation d'un biofilm sur une surface épithéliale vaginale d'après Hardy *et al.*, 2017

Figure 21 : Exemple de graphique utilisé pour la représentation de l'analyse de cytométrie en flux

Liste des tableaux

Tableau 1 : Bénéfices engendrés par la présence des lactobacilles

Tableau 2 : Représentation de la population lactobacillaire en fonction du contexte hormonal.

Tableau 3 : Exemple de différentes souches probiotiques utilisées en cas de vaginose bactérienne (BV), de candidose vulvaire vaginale (VVC) ou d'infection du tractus urinaire (UTI).

Tableau 4 : Exemples de différents carbohydrates ou prébiotiques utilisés pour différentes thérapies vaginales.

Tableau 5 : Les différents traitements de l'inconfort féminin en lien avec leurs avantages et inconvénients.

Tableau 6 : Comparaison des souches V4 et CIP 104459 avec les génomes complets des souches vaginales de *L. crispatus*.

Tableau 7 : Séquences des amorces.

Tableau 8 : Composition du milieu "simulating genital tract secretion" (SGTS).

Tableau 9 : Liste et références des 9 récepteurs humains au 17β -estradiol testés pour la recherche d'homologie avec les protéines de *L. crispatus* CIP104459 et V4.

Introduction

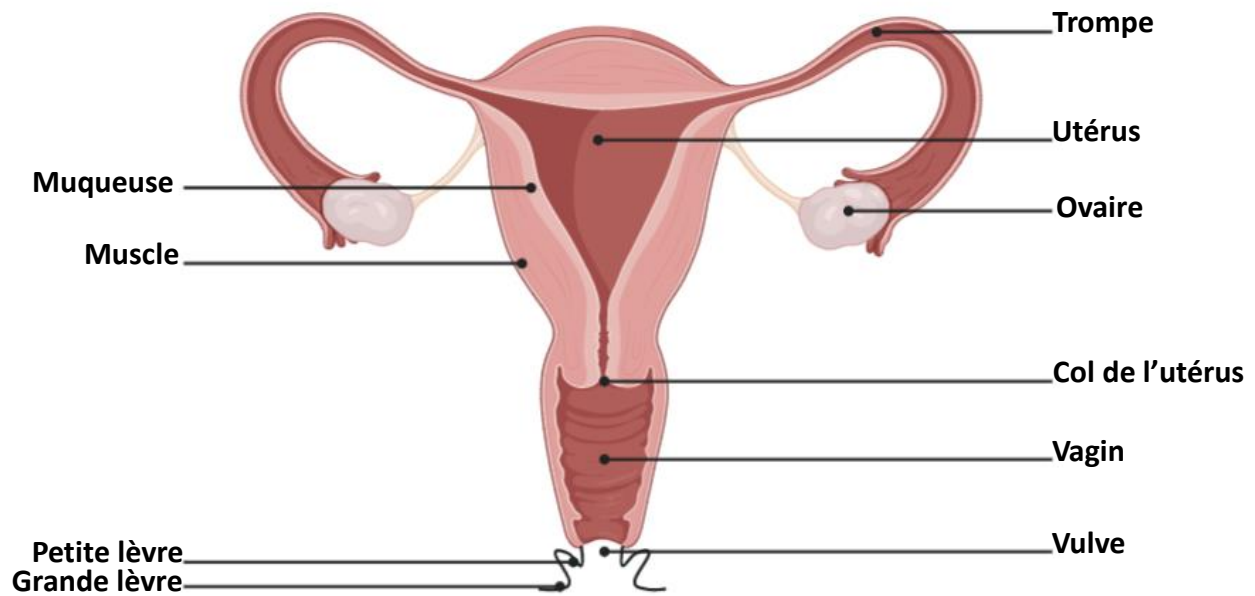


Figure 1: Schéma de l'appareil reproductif féminin

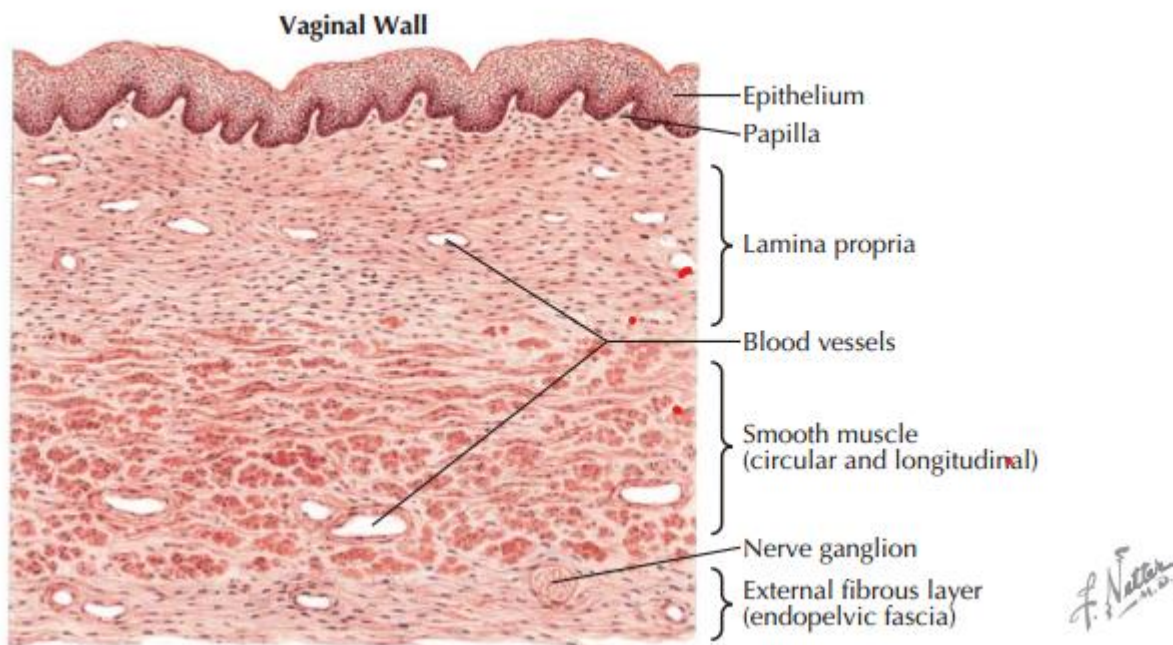


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi vaginale (THE NETTER COLLECTION OF MEDICAL ILLUSTRATIONS: ISBN: 978-1-4377-0595-9 REPRODUCTIVE SYSTEM)

I. Physiologie vaginale et environnement hormonal

1. Généralités

Le vagin est un organe qui joue un rôle vital dans le système reproducteur féminin et le plaisir sexuel. Il est modifié au cours de la vie d'une femme, et remplit une grande diversité de fonctions en réponse aux changements hormonaux qui ont lieu au cours de la puberté, les menstruations, la grossesse ou encore la ménopause.

a. Anatomie et physiologie vaginale

Le vagin est un organe cylindrique de 7 à 10 cm de longueur qui s'étend de la vulve (organe génital externe féminin) au col de l'utérus (Figure 1). Le canal vaginal est positionné entre l'urètre et la vessie en avant et le rectum en arrière. L'ouverture vaginale se trouve dans la partie postérieure du vestibule vulvaire derrière l'ouverture urétrale. Il est entouré de chaque côté par les petites lèvres médiales et les grandes lèvres latérales. A la naissance, une fine membrane perforée, appelée hymen, ferme partiellement l'entrée de l'ouverture vaginale. Le canal vaginal est composé par un adventice fibreux externe, une couche intermédiaire de cellules musculaires lisses et une couche interne de muqueuse. La paroi vaginale se compose de trois couches : une couche glandulaire interne, une *lamina propria* et une *muscularis* formant une couche musculaire (Figure 2). La couche interne est constituée d'un épithélium de cellules squameuses stratifiées de type muqueux qui subit des changements cycliques liés aux hormones (Gold and Shrimanker, 2020).

Cet organe possède de multiples fonctions :

- C'est un canal permettant aux liquides et tissus menstruels de quitter la cavité utérine au cours des menstruations
- C'est un organe de défense de l'espace utérin contre les agents pathogènes
- C'est un organe impliqué dans la reproduction, comme réceptacle à sperme et canal pour l'accouchement
- Il est impliqué dans la réponse à l'excitation féminine et le plaisir

b. Muqueuses et épithélium vaginal

Le tractus génital inférieur est tapissé d'un épithélium pavimenteux stratifié non kératinisé qui se trouve au-dessus d'une *lamina propria* et d'une sous-muqueuse vascularisée. La prolifération et la maturation de la surface épithéliale sont sous le contrôle d'hormones, avec une épaisseur maximale observée lors des pics de circulation des œstrogènes (Patton *et al.*, 2000). L'épithélium vaginal squameux stratifié peut atteindre une surface de 360 cm². L'épithélium et les muqueuses représentent un portail important pour l'invasion par des agents environnementaux externes. La muqueuse interne présente de nombreux plis transversaux du tractus vaginal et constitue la première ligne de défense contre les bactéries pathogènes et les virus (Blaskewicz *et al.*, 2011). La couche apicale de l'épithélium vaginal est composée de cellules "mortes" sans noyaux, d'acides désoxyribonucléiques (ADN) et d'acides ribonucléiques (ARN) fonctionnels. Une caractéristique des couches apicales de l'épithélium vaginal est leur perméabilité aux micro-organismes ainsi qu'aux médiateurs cellulaires et moléculaires de la défense immunitaire. Cette couche de cellules peu attachées crée un microenvironnement important dans la stimulation de la flore vaginale endogène tout en dissuadant les espèces microbiennes envahissantes. La muqueuse vaginale saine des femmes en âge de procréer est constituée d'un épithélium squameux stratifié en multicouches qui repose sur une *lamina propria* (Figure 2). L'épithélium subit une différenciation et contient plusieurs couches parmi lesquelles la couche basale (ou *stratum* basal), la couche superbasale, et une couche superficielle de cellules aplaties et cornées appelée le « *stratum corneum* » (Anderson *et al.*, 2014). Sous l'épaisse couche moyenne de la *lamina propria* se trouve la *muscularis*, composée de fibres musculaires lisses. La couche fibreuse environnante, riche en collagène et en élastine, fournit un soutien structurel au vagin et permet son expansion au cours des rapports sexuels et de l'accouchement. Les cellules vaginales réagissent aux œstrogènes et contiennent des récepteurs pour l'estradiol qui produit une réponse cruciale dans le maintien des parois vaginales. Comme la plupart des muqueuses, l'épithélium vaginal assure des fonctions de protection, de sécrétion et d'absorption (Siddique, 2003).

c. Mucus et sécrétions vaginales

La muqueuse vaginale contient une concentration importante de glandes sécrétrices qui assurent la lubrification et la protection face aux diverses agressions exogènes. Il se forme un fluide dans le lumen appelé sécrétion vaginale. Celle-ci se forme à partir de transsudat de l'épithélium, de sécrétions de glandes vestibulaires et endocervicales, et d'exsudats de l'utérus. Elle est essentiellement composée de sels, de protéines, de glucides (sous forme de glycogène),

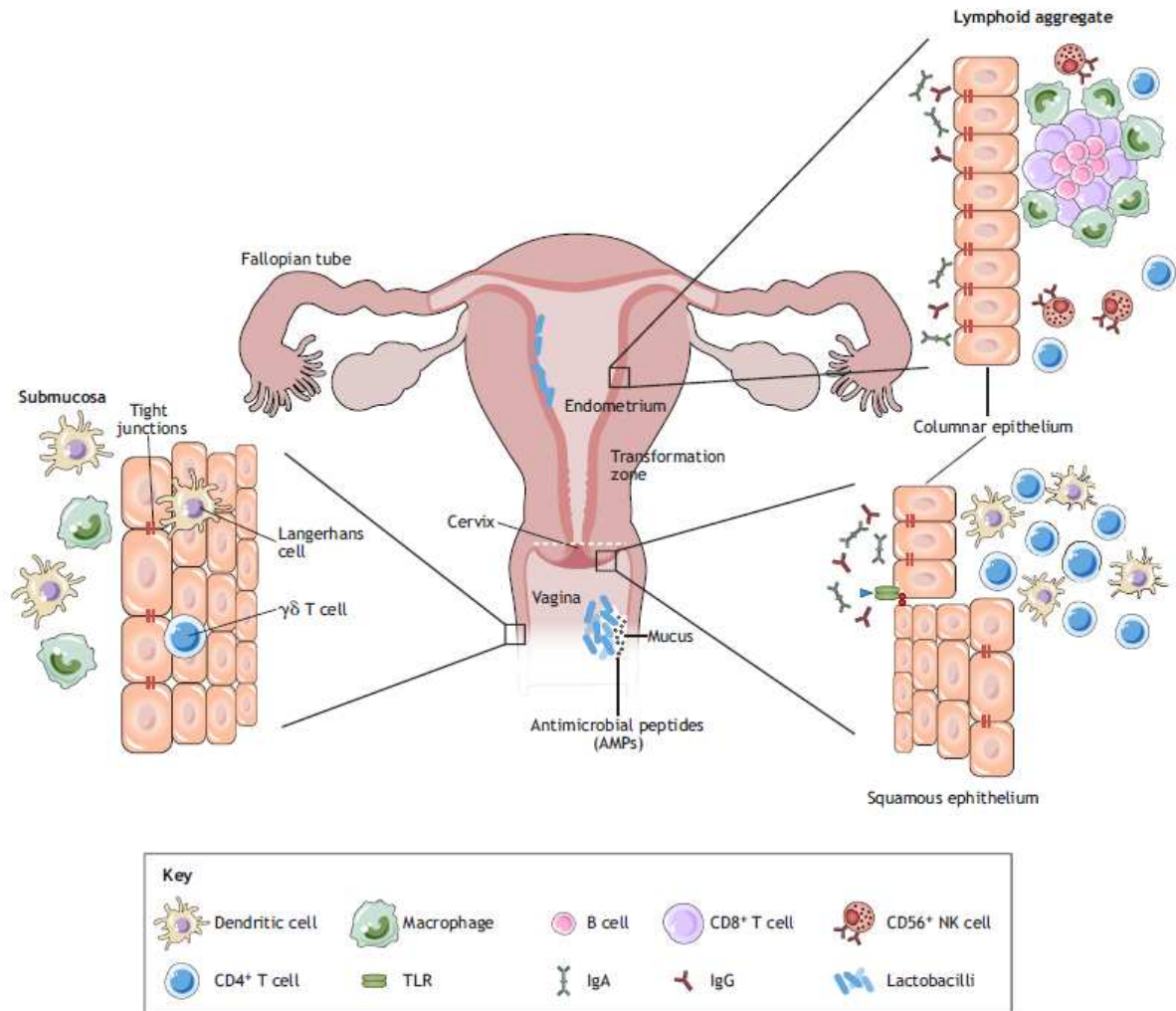


Figure 3 : Composants immunologiques de l'environnement vaginal d'après Wessels et al., 2018

ainsi que d'urée (Owen and Katz, 1999). On y retrouve également des acides organiques comme l'acide lactique, dont la concentration varie essentiellement en fonction de la population microbienne colonisant cet environnement.

Le mucus est un gel viscoélastique complexe produit à la surface de l'épithélium, qui agit comme première ligne de défense contre les agents nocifs de l'environnement. Il hydrate la muqueuse de l'appareil génital, lubrifie le tractus pendant les rapports sexuels, et régule la migration des spermatozoïdes vers l'utérus et l'ovule en fonction de la phase du cycle menstruel. L'épithélium endocervical (endocol de l'utérus) est la principale source de mucus sécrété dans le tractus. Le mucus endocervical migre le long du canal jusqu'à la cavité vaginale, où il se mélange avec de nombreux composés sécrétés par l'hôte, les débris cellulaires et la microflore vaginale pour former le mucus vaginal. Celui-ci représente une niche écologique importante qui abrite la flore vaginale et joue un rôle essentiel dans le maintien de la muqueuse (Lacroix *et al.*, 2020). Le mucus vaginal comprend les fluides endométriaux contenant des cellules épithéliales exfoliées, des acides nucléiques, des lipides et des acides gras, des électrolytes tels que le chlorure de sodium et de potassium, et de nombreuses protéines impliquées dans la réponse immunitaire. L'eau est le principal composant du mucus (>95% en poids), et les mucines représentent plus de 80% de la fraction organique du mucus (Thornton *et al.*, 2008). Les mucines sont gélifiantes, N-glycosylées et fortement O-glycosylées. Ces protéines se polymérisent par des ponts disulfures à travers leurs régions amino- et carboxy-terminales pour former des longs polymères qui sont ensuite sécrétés dans la lumière vaginale par les glandes sécrétrices présentes sous la muqueuse. Une fois sécrétées, les mucines forment un réseau hétérogène de protéines et sont les principales responsables des propriétés viscoélastiques du mucus.

d. Le système immunitaire de l'environnement vaginal

L'implantation durable des microorganismes pathogènes dans l'environnement vaginal est limitée par la flore vaginale qui sera décrite ultérieurement dans ce manuscrit, ainsi que par des composants locaux des systèmes immunitaires innés et acquis. Le système immunitaire inné est le plus primitif et conservé. Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, acronyme pour Pathogen-Associated Molecular Pattern) sont des molécules associées aux pathogènes (bactéries, virus, champignons, parasites) reconnus par le système immunitaire inné (Figure 3). Les composants de l'immunité innée opérationnels dans l'environnement vaginal sont des facteurs solubles (lectine liant le mannose, complément, défensines, inhibiteurs de protéases des leucocytes sécréteurs (SLPI), oxyde nitrique), des composants associés à la membrane

(récepteurs de type Toll, TLR), ainsi que les cellules phagocytaires. La reconnaissance d'un PAMP déclenche une cascade d'événements menant à la libération de cytokines pro-inflammatoires et l'activation du système immunitaire acquis (recrutement des lymphocytes T et B) (Figure 3). Une fois activés, ces lymphocytes génèrent une immunité à médiation cellulaire et à médiation humorale (anticorps) spécifique à l'antigène. L'immunité innée est immédiate dès la reconnaissance d'un pathogène alors que plusieurs jours sont nécessaires pour que l'immunité acquise devienne fonctionnelle (Quayle, 2002).

Les cellules épithéliales qui tapissent le vagin constituent le point de contact initial entre microorganismes et tractus génital de l'hôte, et expriment des TLRs. Onze TLRs ont été identifiés à ce jour, chacun avec une spécificité distincte (Underhill and Ozinsky, 2002). Les TLR1 et TLR2 reconnaissent les lipoprotéines et le peptidoglycane localisés en surface des bactéries à Gram-positif. Les cellules épithéliales vaginales libèrent également des défensines qui possèdent un puissant pouvoir antimicrobien à activité non spécifique. Ces peptides cationiques se lient rapidement à la surface anionique des bactéries entraînant des perturbations de la membrane bactérienne pouvant entraîner la lyse cellulaire (Hancock, 2001). Les cellules épithéliales vaginales produisent également un inhibiteur de protéases sécrété par les neutrophiles, le SLPI, capable d'inhiber la croissance des bactéries à Gram-négatif (*Escherichia coli*) et à Gram-positif (*Staphylococcus aureus*) (Majchrzak-Gorecka *et al.*, 2016). Cette action serait également principalement liée à la nature cationique du domaine N-terminal du SLPI, qui pourrait interagir avec les lipides bactériens anioniques, entraînant une perturbation membranaire des bactéries (Majchrzak-Gorecka *et al.*, 2016).

Dans le mucus vaginal on trouve également des immunoglobulines capables de reconnaître et de se lier à des antigènes spécifiques des microorganismes avant d'induire leur destruction par opsonisation. Ces anticorps proviennent en partie de transsudation à partir de la circulation systémique. Des lymphocytes B sont toutefois aussi naturellement présents dans l'appareil reproducteur féminin et produisent des anticorps de type IgG et IgA *in situ*. Ils sont présents principalement dans l'endocol mais aussi dans le vagin (Mestecky and Russell, 2000) (Figure 3). L'élaboration d'anticorps dans la partie inférieure du tractus génital féminin fournit un mécanisme rapide de défense contre les microorganismes pathogènes sans qu'il ne soit nécessaire d'attendre la génération d'une réponse immunitaire humorale.

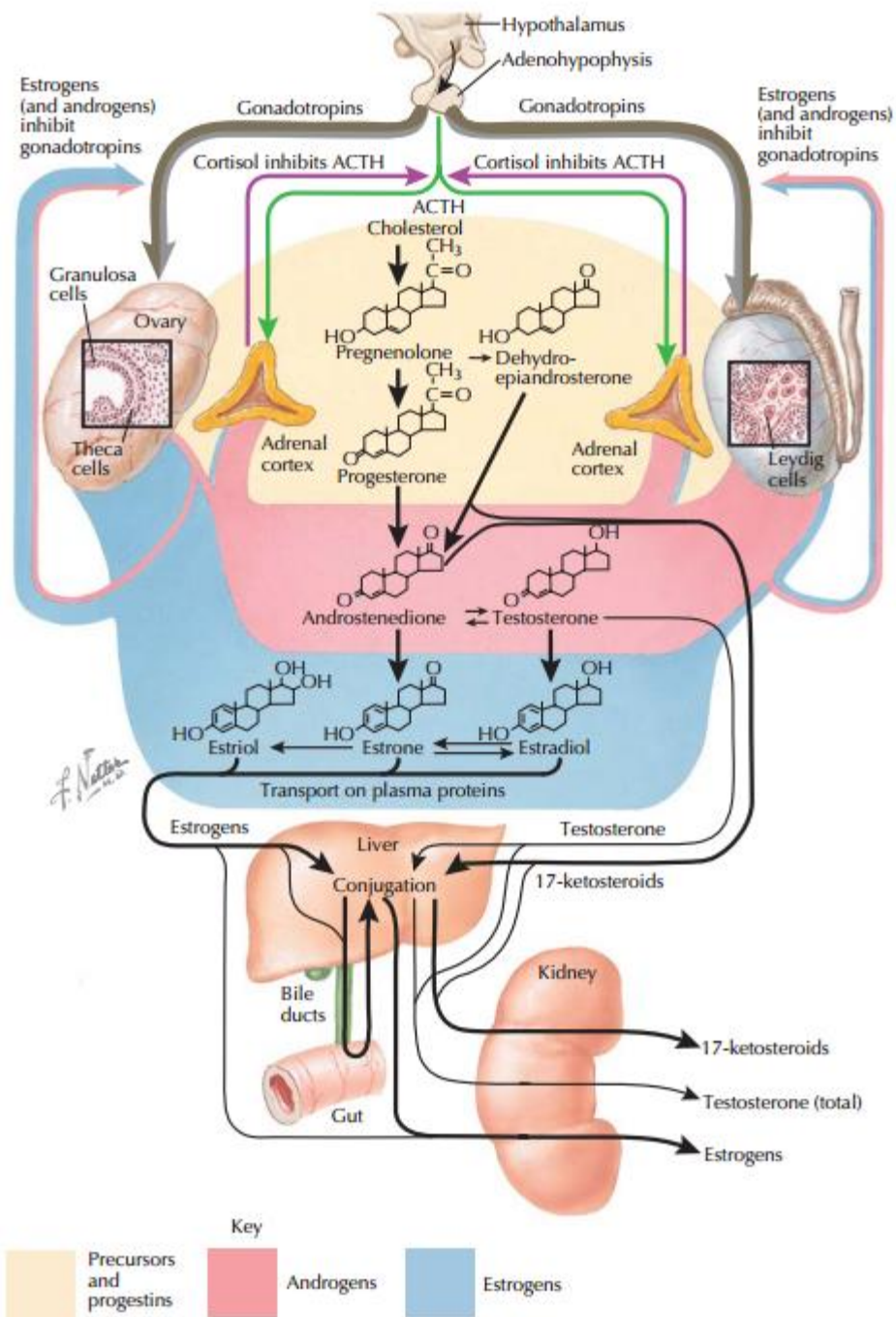


Figure 4 : Synthèse des hormones stéroïdiennes
 (THE NETTER COLLECTION OF MEDICAL ILLUSTRATIONS: ISBN: 978-1-4377-0595-9
 REPRODUCTIVE SYSTEM)

2. Le système endocrinien

a. Les hormones stéroïdiennes

Les hormones sexuelles d'origine gonadique sont des stéroïdes dérivant du cholestérol. On distingue :

- Les androgènes dérivés du noyau androstane, dont la molécule type est la testostérone
- Les progestogènes dérivés du noyau pregnane, dont la molécule type est la progestérone
- Les œstrogènes dérivés du noyau estrane, dont la molécule type est l'estradiol

Leur sécrétion est régulée par des hormones polypeptidiques d'origine hypophysaire. Les stéroïdes sont synthétisés par les gonades (testicules, ovaires), la corticosurrénale, le placenta et par le système nerveux central (neurostéroïdes) (Figure 4).

Du point de vue chimique, les stéroïdes dérivent du cholestérol suite au clivage de sa chaîne latérale qui donne naissance à la pregnénolone (Figure 4). La pregnénolone est convertie en progestérone par les cellules lutéales ou par les cellules de la périphérie du follicule ovarien (cellules de la thèque et de la granulosa) en androstènedione (Figure 4). Dans l'ovaire, cette molécule peut conduire à la formation d'estrone puis d'estradiol ou à celle de testostérone. Cette dernière n'est pas libérée mais convertie à son tour en estradiol sous l'effet d'une aromatasase. De la progestérone et de la testostérone sont aussi produites par la corticosurrénale au cours de la synthèse de cortisol et d'aldostérone ; toutefois leur libération reste marginale. La synthèse du 17 β -estradiol peut aussi s'accompagner de celle d'un autre œstrogène, l'estrone, et l'estradiol lui-même peut être converti en un dérivé moins actif, l'estriol. Les œstrogènes et leurs métabolites sont finalement excrétés par le rein, la plupart du temps sous forme de 17-cétostéroïdes (Smith *et al.*, 2011) (Figure 4). Selon l'étape du cycle menstruel, les follicules ovariens produisent les deux principales hormones stéroïdiennes que sont l'estradiol et la progestérone. L'ovulation est liée à un pic d'estradiol sous contrôle de deux hormones hypophysaires, l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone de stimulation folliculaire (FSH). Après expulsion de l'ovocyte, les cellules folliculaires restantes se différencient en cellules lutéales qui produisent de la progestérone. Si l'ovocyte est fécondé et qu'une gestation commence, les productions de progestérone et dans une moindre mesure d'estradiol restent élevées. A défaut, le taux de ces stéroïdes revient progressivement au niveau basal du début de cycle. Après la ménopause et l'arrêt de l'ovulation, la production de ces stéroïdes diminue fortement (Figure 5).

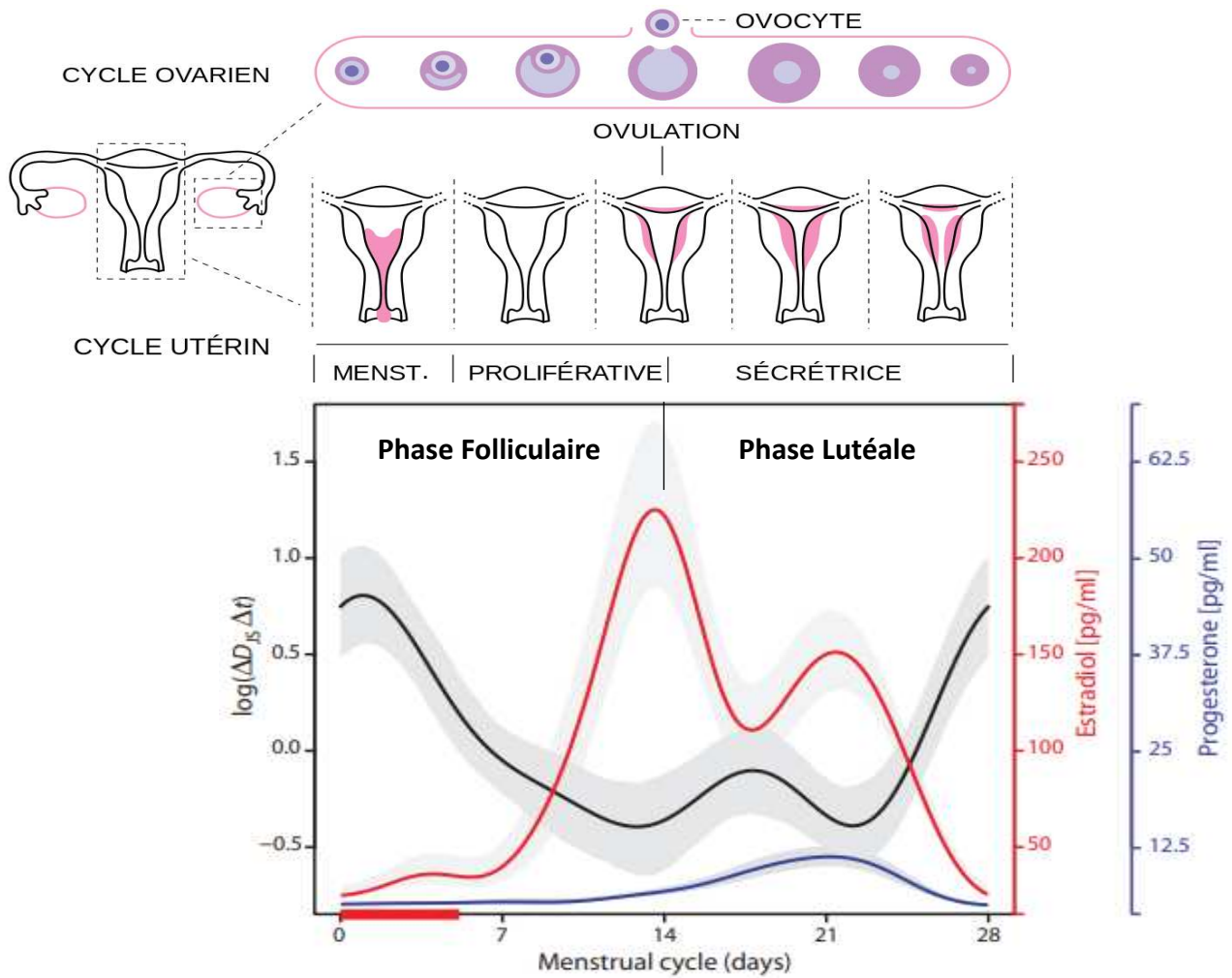


Figure 5 : Représentation des taux d'estradiol et de progestérone en fonction du cycle menstruel

b. Les œstrogènes

Les œstrogènes jouent un rôle important dans le fonctionnement des voies génitales inférieures tout au long de la vie adulte, des récepteurs pour les œstrogènes et la progestérone sont présents dans le vagin, l'urètre, la vessie et les muscles du plancher pelvien. La lubrification constante de l'épithélium offre au tissu vaginal une humidité et une plasticité. La qualité de cette lubrification est essentiellement sous le contrôle de facteurs endocriniens, notamment des œstrogènes et de la progestérone. Une baisse importante du taux d'œstrogènes est observée avec l'âge et la ménopause, mais des fluctuations peuvent aussi se produire au cours de la grossesse ou de l'allaitement, ou encore de façon transitoire pendant les menstruations (Farage and Maibach, 2011) (Figure 5).

Les effets sur les cellules eucaryotes du 17 β -estradiol sont médiés par des facteurs de transcription activés par des ligands, appelés ER pour « estrogen receptor ». Ces récepteurs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils partagent une structure hautement conservée et des mécanismes communs affectant la transcription des gènes. Les ER des mammifères sont codés par deux gènes : alpha et bêta (ER α et ER β) qui fonctionnent à la fois comme transducteurs de signaux et comme facteurs de transcription pour moduler l'expression des gènes cibles. Les récepteurs ER α et ER β sont deux protéines structurées en cinq régions communes à tous les récepteurs nucléaires, qui participent à la formation des domaines fonctionnels. Les différentes régions correspondent au domaine N-terminal qui possède des fonctions de transactivation, le domaine de liaison à l'ADN, le domaine de dimérisation, le signal de localisation nucléaire et le domaine de liaison du ligand. Ces glycoprotéines partagent des caractéristiques communes avec les récepteurs des androgènes et de la progestérone ; les changements majoritaires se trouvent dans la région de liaison au ligand (Tanenbaum *et al.*, 1998). Il a été montré que les ER sont présents dans l'ensemble des voies urinaires inférieures et sont exprimés dans l'épithélium pavimenteux de l'urètre proximal et distal, le vagin et de la vessie. Les ER- α et ER- β ont été trouvés dans les parois vaginales des femmes pré-ménopausées, mais les ER- β sont absents des parois vaginales des femmes post-ménopausées (Wira *et al.*, 2015).

En présence d'œstrogènes, le mucus est mince et aqueux avec une faible viscosité, ce qui facilite le mouvement des spermatozoïdes dans la partie supérieure du tractus. Il est présent pendant la phase proliférative et augmente à l'ovulation. En revanche, le mucus est épais et visqueux après l'ovulation et pendant la phase sécrétoire et entrave les échanges entre le tractus sexuel féminin inférieur et le tractus supérieur (Lacroix *et al.*, 2020).

c. Le cycle menstruel

L'axe hypothalamo-hypophysaire régule la sécrétion cyclique d'estradiol et de progestérone par l'ovaire pendant le cycle menstruel chez les femmes en âge de procréer. En réponse à ces hormones, des changements se produisent et favorisent l'implantation de l'ovocyte fécondé dans l'utérus, menant à la grossesse. Le cycle menstruel est divisé en quatre étapes : la phase menstruelle, la phase proliférative (ou phase folliculaire), le mi-cycle (pendant lequel il y a l'ovulation), et la phase sécrétrice (ou phase lutéale) (Figure 5). La durée d'un cycle menstruel est variable chez les femmes (21-35 jours), avec 28 jours en moyenne. Au début du cycle menstruel (jour 0), l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) stimule les cellules de la thèque et de la granulosa au niveau des follicules ovariens qui synthétisent le 17β -estradiol. La production de FSH favorise l'expression des récepteurs pour l'hormone lutéinisante (LH), et les deux hormones agissent en synergie en induisant une augmentation massive de la concentration d'estradiol circulant. Une décharge de gonadotrophines hypophysaires (GnRh) d'origine hypothalamique induit alors un pic de production de LH et dans une moindre mesure de FSH. Ce pic de LH entraîne la rupture du follicule mûr et l'expulsion de l'ovocyte. Parallèlement, dans l'ovaire, sous l'effet de la LH les cellules folliculaires restantes se différencient en cellules lutéales productrices de progestérone et forment le « corps jaune ». En absence de fécondation, le corps jaune se dégrade au cours de la lutéolyse, ce qui entraîne une diminution de la concentration d'estradiol et de progestérone, et une régression de l'endomètre et l'apparition des règles (Wira *et al.*, 2015).

d. La ménopause

La ménopause est définie comme l'arrêt permanent des menstruations qui résulte de la perte de l'activité folliculaire ovarienne. Cliniquement, elle correspond à une aménorrhée de douze mois consécutifs chez les femmes de 40 à 50 ans, pour laquelle aucune autre cause pathologique ou physiologique évidente ne peut être trouvée. Chez la plupart des femmes, la ménopause est précédée d'une période appelée pré-ménopause, d'une durée moyenne d'environ 4 ans au cours de laquelle les caractéristiques endocriniennes, biologiques et cliniques de l'évolution de la fonction ovarienne évoluent (Chahal and Drake, 2007). L'état postménopausique se caractérise par des taux de FSH et de LH élevés, un faible taux d'estradiol et de progestérone et des taux de testostérone rémanents. Le principal œstrogène circulant durant cette période est l'estrone, qui provient principalement de la conversion de l'androstènedione sécrétée par les glandes surrénales, par l'intermédiaire de l'aromatase située principalement dans les tissus adipeux (Smith *et al.*, 2011). La ménopause est donc caractérisée par une réduction

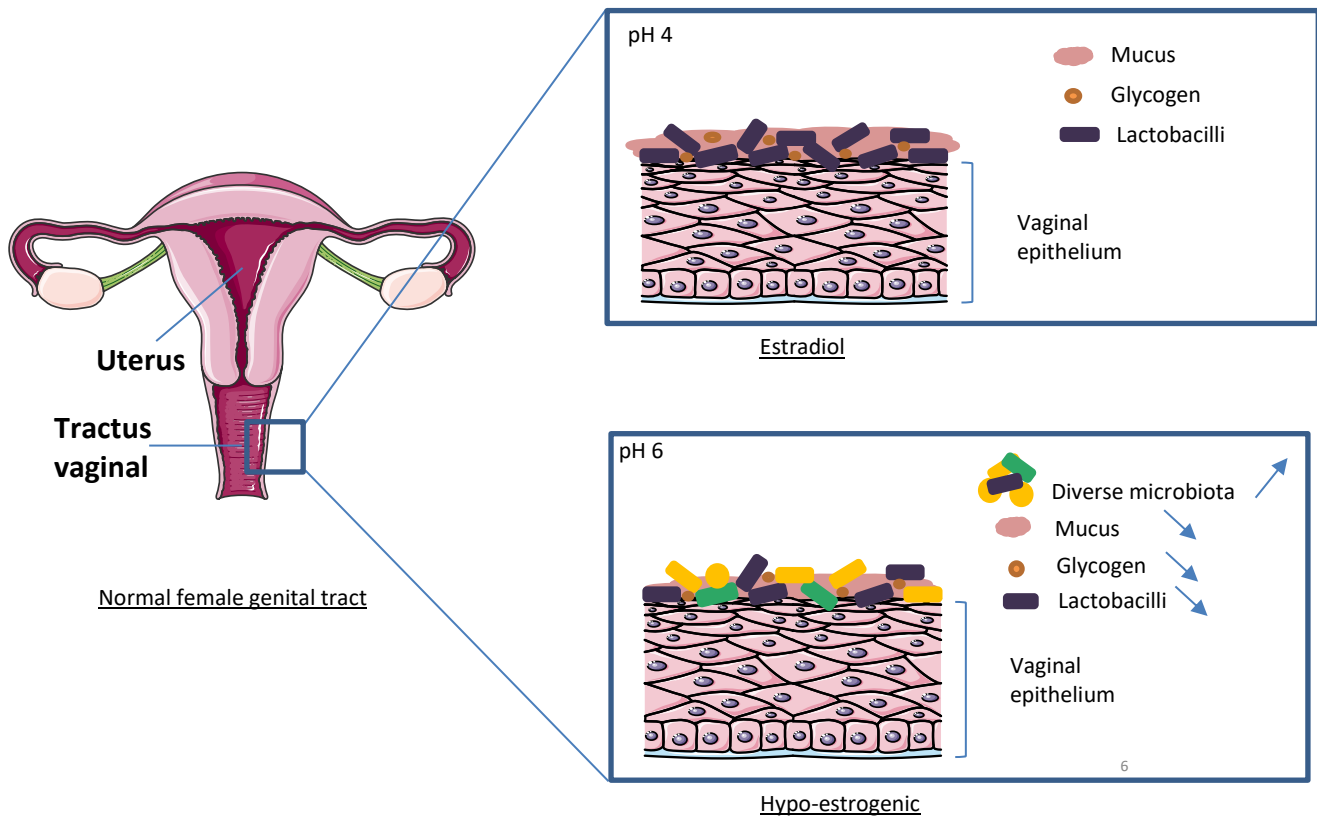


Figure 6 : Représentation schématique de l'environnement vaginal en conditions normale et hypo-estrogénique

marquée de la production d'œstrogènes, car le principal site de synthèse passe des ovaires aux tissus périphériques. Alors que chez les femmes pré-ménopausées les taux de production d'estradiol et d'estrone sont de l'ordre de 400 µg/24 h et 180 µg/24 h, ils diminuent après la ménopause pour atteindre respectivement 6 µg/24 h et 40 µg/24 h (Purohit and Reed, 2002).

e. Relations entre glycogène, contexte hormonal et microbiote

Le glycogène est un polysaccharide à base de glucose. La relation entre le glycogène et les œstrogènes est complexe ; une étude montre qu'il n'y a pas de corrélation directe entre le taux d'estradiol circulant en périphérie et dans les voies vaginales et la quantité de glycogène libre (Mirmonsef *et al.*, 2014, 2016). Cette absence de corrélation pourrait être due au fait que les concentrations d'estradiol fluctuent rapidement au cours des menstruations et en fonction de plusieurs facteurs comportementaux et d'hygiène de vie. La disponibilité du glycogène dans le mucus vaginal est potentiellement une des raisons de sa colonisation par des microorganismes capables de le métaboliser. Le glycogène pourrait être utilisé de manière différentielle en fonction de la composition du microbiote (Mirmonsef *et al.*, 2014). Une enzyme, l' α -amylase, qui clive le glycogène en amylose et glucose a été isolée dans les sécrétions vaginales de la partie basse du tractus génital (Spear *et al.*, 2015). Un taux élevé de glycogène libre a été associé à la présence de lactobacilles au sein de ce microbiote (Mirmonsef *et al.*, 2014).

Le changement le plus spectaculaire est observé au moment de la puberté, lorsque les niveaux d'œstrogènes et de glycogène augmentent. Cette augmentation favorise la croissance des bactéries telles que les espèces de *Lactobacillus*, qui produisent de l'acide lactique par fermentation. Les taux de glycogène plus élevés sont généralement maintenus tout au long des années de fertilité de la femme, puis diminuent à la ménopause (Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016). Des taux d'œstrogène et de glycogène plus élevés favorisent également une augmentation de l'épaisseur de l'épithélium squameux stratifié du vagin et de la couche de mucus protectrice (Figure 6). Biologiquement, à chaque fois que l'on observe une chute du taux d'œstrogènes cela induit une perte d'élasticité des tissus, une atrophie des grandes et petites lèvres au niveau vulvaire, et un relâchement musculaire au niveau vaginal. Outre les effets psychologiques sur la confiance en soi et les problèmes de libido, cette perte d'élasticité des tissus a également des conséquences sur la quantité et la qualité des sécrétions vaginales. De plus, une diminution de la division des cellules basales entraîne à terme une desquamation des épithéliums. Cette desquamation a pour conséquence la diminution de la production de glycogène

par les cellules (Figure 6). Le glycogène est métabolisé en acide lactique par l'action des lactobacilles. En absence de cette métabolisation, on observe une augmentation du pH vaginal via la diminution de la production d'acides organiques, passant d'un pH acide aux alentours de 4 à un pH neutre se rapprochant de 7 (Figure 6).

II. Le microbiote vaginal

Les progrès liés aux nouvelles technologies de séquençage de l'ADN basés sur l'analyse du gène codant l'ARNr 16s ou encore les méthodes de microscopie ont contribué à l'évolution de méthodes moléculaires à haute résolution indépendantes des approches culturelles. Elles révèlent toute la complexité et la diversité de la microflore vaginale. Elles permettent également d'appréhender la nature et la dynamique de l'évolution entre différentes communautés microbiennes sur de courtes échelles temporelles (Allsworth and Peipert, 2007; Ravel *et al.*, 2011).

1. Communautés microbiennes caractéristiques de l'environnement vaginal

La flore commensale du vagin est représentée principalement par des bactéries du genre *Lactobacillus*. Ce genre comprend plus de 130 espèces productrices d'acide lactique qui vivent dans des environnements variés, parmi lesquelles plus de 20 ont été détectées dans le vagin. Seules une ou deux espèces à la fois sont retrouvées prédominantes dans le vagin, dont les plus courantes appartiennent aux espèces *iners*, *crispatus*, *jensenii* ou encore *gasseri* (Huang *et al.*, 2014). D'autres genres bactériens peu abondants peuvent être retrouvés dans l'environnement vaginal sain, tels que *Anaerococcus*, *Atopobium*, *Corynebacterium*, *Fingoldia*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Mobiluncus*, *Peptoniphilus*, *Prevotella*, *Sneathia* ou encore *Streptococcus* (Ravel *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2014). Il est important de noter que comme *Lactobacillus*, les genres *Megasphaera*, *Streptococcus* et *Atopobium* et dans une moindre mesure tous les autres genres bactériens cités, produisent de l'acide lactique. Ces données suggèrent que la production d'acide lactique est conservée au sein du microbiote vaginal malgré les variations de sa composition et a une fonction importante. Cependant, certaines de ces bactéries peuvent présenter un certain niveau de pathogénicité. C'est en particulier le cas des espèces du genre *Prevotella*, qui sont des bactéries anaérobies à Gram-négatif de l'embranchement des *Bacteroidetes*, dont l'abondance peut atteindre 45% de la composition totale du microbiote vaginal (Ravel *et al.*, 2011). *Prevotella bivia* habite le tractus génital inférieur et possède la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales

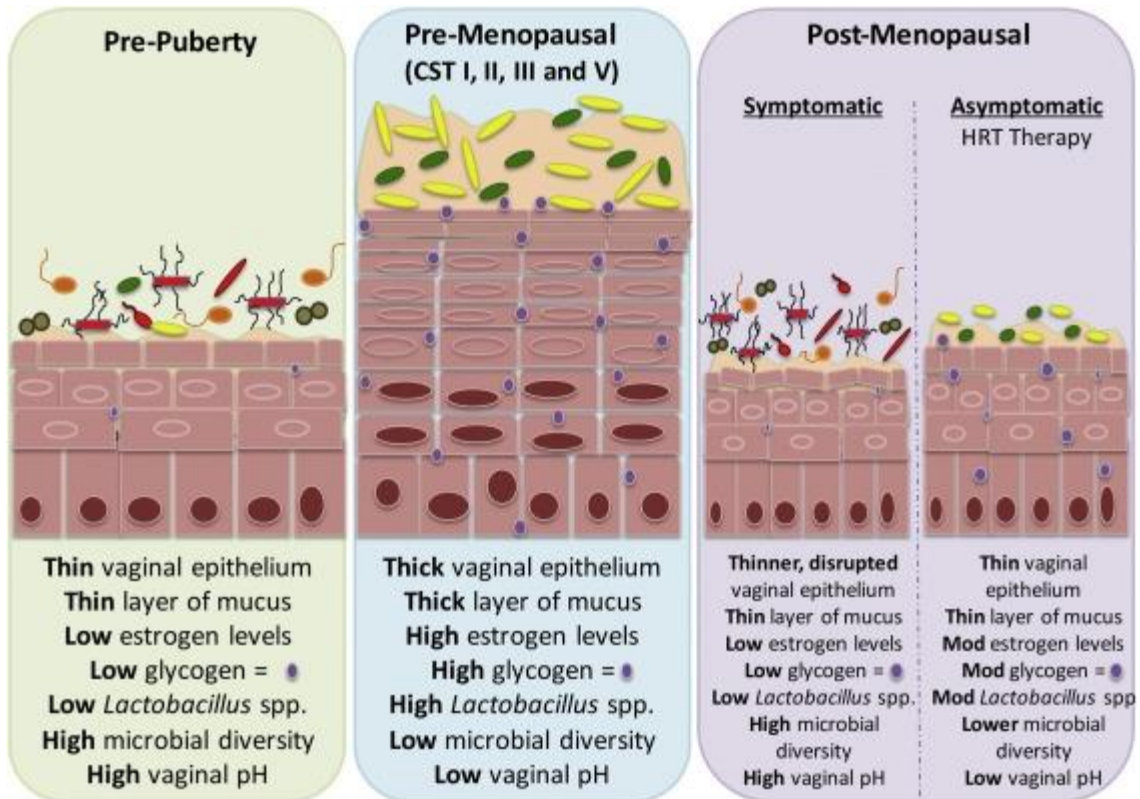


Figure 7 : Variations de l'environnement vaginal de la pré-puberté à la ménopause
(d'après Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016)

du col de l'utérus (Larsen, 2017). Comme toute bactérie à Gram-négatif, *P. bivia* présente dans sa membrane externe du lipopolysaccharide (LPS) qui possède une activité endotoxique et antigénique. Certaines espèces de *Prevotella* produisent des LPS qui ont une capacité d'induction de la réponse plaquettaire supérieure à celle des LPS d'*Escherichia coli* ou de *Salmonella typhimurium* (Endo *et al.*, 1997). L'exposition à une faible dose de ces LPS peut conduire à une réponse inflammatoire et entraîner et/ou aggraver des infections vaginales (Aroutcheva *et al.*, 2008). Les bactéries du genre *Prevotella* peuvent avoir des effets négatifs sur l'homéostasie vaginale, en favorisant la croissance de pathogènes tels que *Gardnerella vaginalis* (Pybus and Onderdonk, 1997, 1998). *G. vaginalis* est une bactérie anaérobie facultative à Gram-positif, qui appartient à la famille des *Bifidobacteriaceae*. Elle est responsable d'infections vaginales, en produisant différents facteurs de virulence, tels que la vaginolysine, une cytolysine dépendante du cholestérol, qui contribue à l'adhérence initiale de *G. vaginalis* aux cellules épithéliales de l'hôte (Patterson *et al.*, 2010), ou encore la sialidase, qui possède une activité mucinase (Schwebke *et al.*, 2014), qui perturbe l'intégrité de la barrière épithéliale des muqueuses (McGregor *et al.*, 1994). De plus, *G. vaginalis* peut produire des bactériocines actives *in vitro* contre les lactobacilles (Teixeira *et al.*, 2010). Le genre *Mobiluncus*, représente un groupe de bactéries anaérobies, mobiles, à Gram-négatif qui sont fortement associées aux infections vaginales. Le genre *Atopobium* appartient à la famille des *Coriobacteriaceae*, dont l'espèce *vaginae* est la plus fréquemment rencontrée dans l'environnement vaginal (Lamont *et al.*, 2011). Il s'agit de coques à Gram-positif, non mobiles et non sporulées. Elles produisent de l'acide lactique et sont strictement anaérobies. Bien que *A. vaginae* et *G. vaginalis*, aient été détectés dans les flores vaginales normales (8% à 25%), on les retrouve plus souvent chez les patientes atteintes d'infections bactériennes vaginales (50 à 96%) (Mendling *et al.*, 2019).

2. Le microbiote vaginal évolue au cours de la vie d'une femme

La puberté est un stade de développement important où les changements hormonaux sont à l'origine des changements physiques et physiologiques qui conduisent à la ménarche (période des premières menstruations). Avant la puberté (partie gauche de la Figure 7) les femmes produisent peu d'œstrogènes, ce qui se traduit par de faibles taux de glycogène, une grande diversité microbienne avec une faible abondance en lactobacilles et un pH vaginal élevé (Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016). Après la puberté, le niveau d'œstrogènes augmente et stimule la production de glycogène au niveau de l'épithélium vaginal, ce qui favorise la colonisation par des bactéries qui métabolisent le glycogène, et produisent de l'acide lactique, réduisant ainsi

le pH vaginal (Farage and Maibach, 2006). L'évolution du microbiote vaginal au cours de la puberté a cependant été peu caractérisée. Une étude prospective a été réalisée sur 31 jeunes filles âgées de 10 à 12 ans, au cours de laquelle des prélèvements vaginaux ont été effectués tous les trimestres pendant une période pouvant aller jusqu'à trois ans (Hickey *et al.*, 2015). La composition de la communauté bactérienne a été analysée par séquençage des gènes codant les ARNr 16s, et a montré que les bactéries du genre *Lactobacillus* étaient dominantes chez la plupart des jeunes filles, et que *G. vaginalis* était détecté chez 1/3 des sujets, avant l'apparition des règles. Ces résultats suggèrent que le microbiote vaginal des filles avant l'apparition des premières règles commence à ressembler à celui des adultes (Hickey *et al.*, 2015).

Après la puberté, à l'état pré-ménopausique (partie centrale de la Figure 7), les femmes produisent des niveaux élevés d'œstrogènes et de glycogène. A ce stade, les espèces du genre *Lactobacillus* prédominent dans le microbiote vaginal. De récentes études basées sur le séquençage à haut débit de l'ARNr 16s visant à examiner la composition et l'abondance des espèces bactériennes vaginales chez les femmes en âge de procréer, ont montré qu'il existe au moins cinq grands types de microbiotes vaginaux appelés types d'état communautaire (CST, types of community state) (Zhou *et al.*, 2007; Ravel *et al.*, 2011; Gajer *et al.*, 2012). Quatre d'entre eux sont dominés par les espèces *L. crispatus* (CST-I), *L. iners* (CST-III), *L. gasseri* (CST-II) ou *L. jensenii* (CST-V). Le dernier (CST-IV) est composé d'une population formée de bactéries anaérobies strictes et facultatives appartenant aux genres *Gardnerella*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, *Prevotella* et à d'autres taxons de l'ordre des *Clostridiales* (Fredricks and Marrazzo, 2005; Ravel *et al.*, 2011; Gajer *et al.*, 2012).

Après la ménopause (partie droite de la Figure 7), la quantité d'œstrogène et de glycogène diminue chez les femmes (Mirmonsef *et al.*, 2014). De manière intéressante, le taux de glycogène est proportionnel à l'abondance des bactéries du genre *Lactobacillus* (Mirmonsef *et al.*, 2014). Ainsi, les femmes pré-ménopausées ont en moyenne 10^8 lactobacilles / mL de fluide vaginal alors que les femmes ménopausées, 10^7 lactobacilles / mL (Mirmonsef *et al.*, 2015). Une comparaison de la composition des microbiotes de femmes en âge de procréer et de femmes ménopausées montre que la diversité des espèces de *Lactobacillus* est plus importante chez les femmes fertiles que ménopausées (Gustafsson *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). De plus, le microbiote vaginal des femmes ménopausées n'est plus dominé par les bactéries du genre *Lactobacillus*, mais par des bactéries anaérobies qui peuvent perturber l'homéostasie vaginale. La diminution des espèces de *Lactobacillus* est associée à des symptômes vaginaux qui se manifestent par une

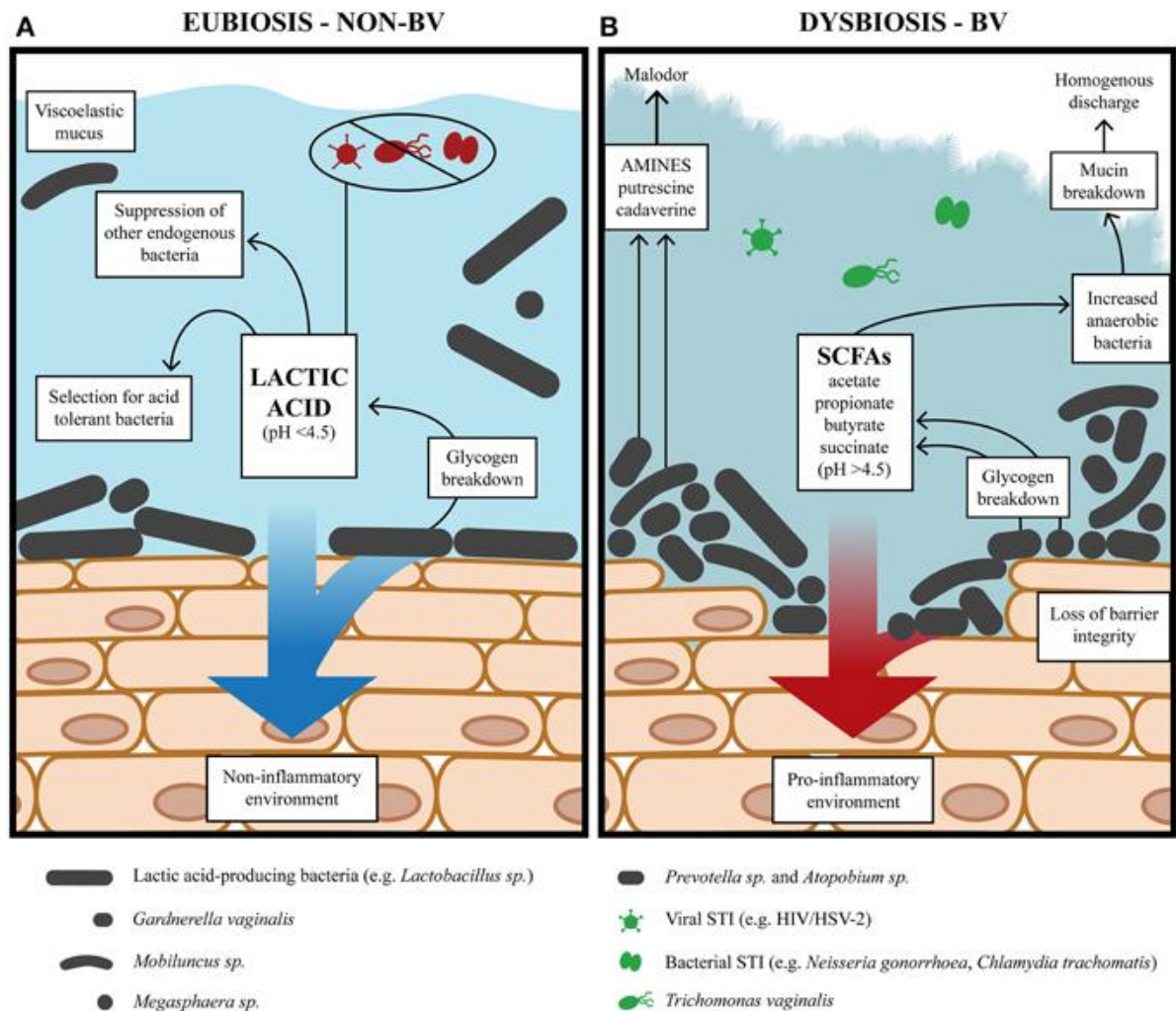


Figure 8 : L'environnement vaginal pendant les états alternatifs d'eubiose et de vaginose bactérienne (A) Pendant l'eubiose, les bactéries productrices d'acide lactique (métabolite prédominant) acidifient l'environnement vaginal (pH <math>< 4,5 </math>). L'acide lactique produit essentiellement par les lactobacilles inactive potentiellement les IST. **(B)** Pendant la vaginose bactérienne, l'environnement vaginal permet de favoriser la croissance de diverses bactéries et présente une charge bactérienne plus élevée. Les concentrations de SCFA (short chain fatty acids) et d'amines sont associées à une acidité vaginale avec un pH > 4,5 (Aldunate *et al.*, 2015)

atrophie vaginale, une sécheresse et une dyspareunie (douleurs ressenties lors des rapports sexuels) (Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016).

3. Eubiose, microflore lactobacillaire vaginale

a. Caractéristiques générales

En 1892, A. Doderleïn décrit pour la première fois la flore vaginale. Il conclut de ses premières observations à la présence d'une flore homogène constituée de bacilles à Gram-positif non sporulant. Il a de plus suggéré que ces bacilles présents dans les sécrétions vaginales normales maintiennent une acidité permettant la protection du vagin contre les bactéries pathogènes (Rampersaud *et al.*, 2012). Depuis, ces bacilles sont encore couramment appelés les bacilles de Doderleïn. En 1901, Beijerinck les classe dans le genre *Lactobacillus*. En 1960, le genre a été scindé en différentes espèces (Rogosa and Sharpe, 1960). Leur appellation vient de leur capacité à produire de l'acide lactique à partir du lactose et d'autres hydrates de carbone et de leur morphologie bacillaire. Aujourd'hui ils constituent un groupe hétérogène de bactéries appartenant au phylum des Firmicutes. Le terme « bacilles de Doderleïn » est encore utilisé en biologie médicale, et désigne l'ensemble de bactéries présentes naturellement dans la flore vaginale ayant un effet protecteur. Lorsque cette flore est présente et développée, elle participe activement au maintien de l'homéostasie des muqueuses intimes (Lepargneur and Rousseau, 2002; Shivers *et al.*, 2015).

La microflore lactobacillaire protège les muqueuses et forme une barrière contre les infections génitales et une stimulation constante du système immunitaire. Dans des conditions normales, appelées eubiose vaginale (partie gauche de la Figure 8), l'écologie vaginale est généralement dominée par une ou deux des cinq espèces principales de lactobacilles et est caractérisée par un pH moyen de l'ordre de 4,5 (Tachedjian *et al.*, 2017). Dans cette condition, *L. crispatus* est présent à environ 10^7 à 10^9 bactéries /ml de fluide vaginal. Cependant, une baisse de 100 fois peut être observée au moment des règles (Santiago *et al.*, 2012). Des études basées sur l'hybridation ADN : ADN pour identifier les isolats ont révélé que *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* et *L. vaginalis* (plus étroitement apparenté à *L. fermentum* et *L. reuteri*) sont les espèces les plus communément trouvées dans le vagin (Vanechoutte, 2017).

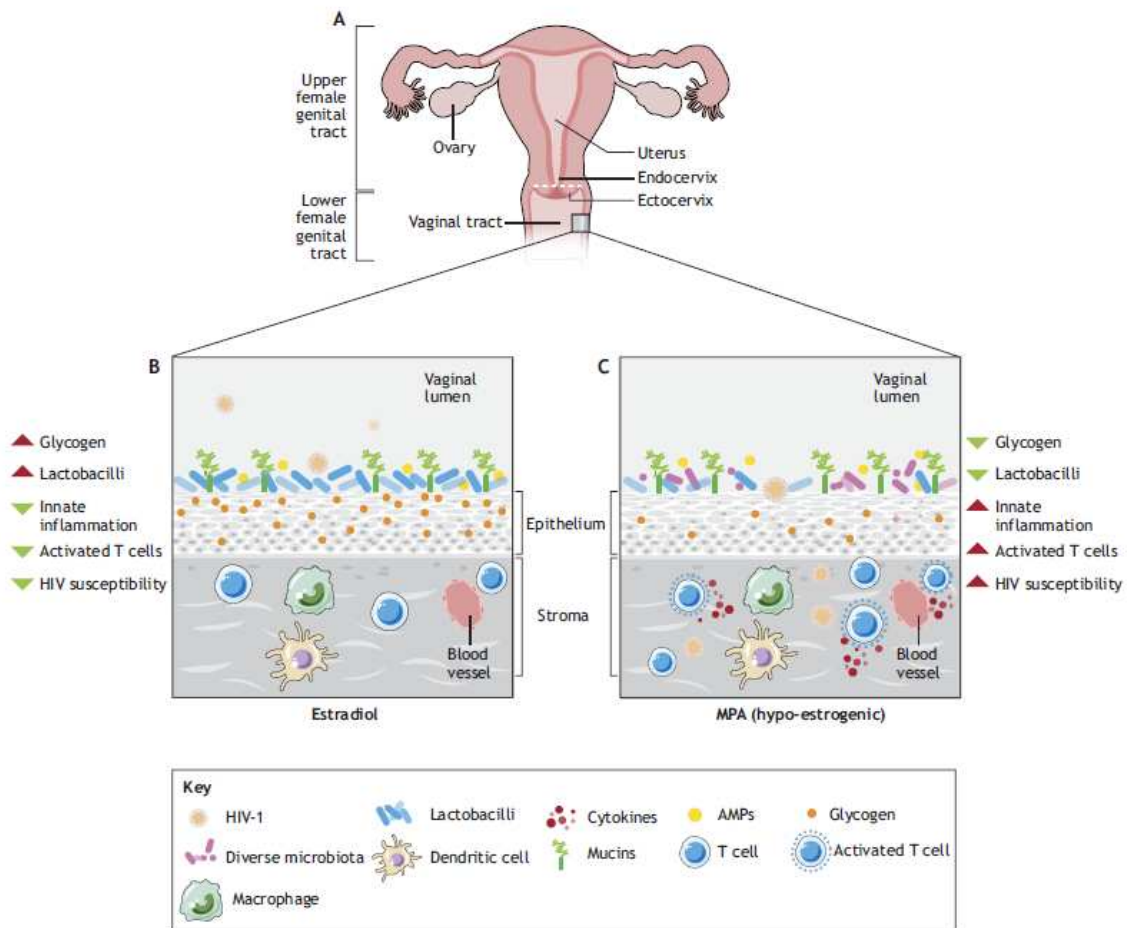


Figure 9 : Axe hormones sexuelles – microbiote – immunité et sensibilité au VIH chez les femmes (A) Anatomie du tractus génital de la femme. (B) Immunité et microbiote du tractus génital bas en présence élevée d'estradiol (C) Immunité et microbiote dans des conditions de taux d'estradiol bas (Wessels *et al.*, 2018).

b. Effets protecteurs des lactobacilles

Les lactobacilles fermentent le glycogène pour produire de l'acide D- et L-lactique qui diminuent le pH vaginal (Witkin, 2015). Certaines espèces produisent *in vitro* du peroxyde d'hydrogène. Cependant, des études suggèrent que dans les conditions hypoxiques de l'environnement vaginal, les concentrations ne peuvent jamais atteindre des niveaux qui sont inhibiteurs pour d'autres bactéries (O'Hanlon *et al.*, 2013). Dans les sécrétions vaginales, la croissance des bactéries associées aux infections vaginales bactériennes peut être limitée par l'acide lactique mais pas par le peroxyde d'hydrogène (O'Hanlon *et al.*, 2011). Certaines espèces produisent également des bactériocines qui peuvent tuer directement d'autres espèces bactériennes. Les lactobacilles sont également susceptibles de concurrencer d'autres organismes pour les nutriments, ou encore empêcher l'implantation par compétition de l'espace colonisé (Huang *et al.*, 2014). Ces mécanismes inhibiteurs diffèrent selon les espèces. Une analyse génomique comparative de *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* et *L. jensenii* a apporté la preuve que chaque espèce de *Lactobacillus* possède un répertoire unique de familles de protéines, ce qui suggère que ces différences peuvent refléter une adaptation et une protection spécifiques (Mendes-Soares *et al.*, 2014). L'adhérence des lactobacilles aux cellules des muqueuses entraîne une augmentation de la production de mucines, principale composante des sécrétions vaginales (Mack, 2003). Chez une femme, en condition normale, les lactobacilles jouent un rôle de protection contre les pathogènes. En tapissant les muqueuses, la microflore vaginale est en interaction perpétuelle avec l'hôte et provoque ainsi une modulation de sa physiologie et de son immunité. Une grande partie des recherches démontrant les répercussions microbiennes sur l'immunité de l'hôte a été réalisée au niveau digestif, et plus précisément au niveau du tractus intestinal (Round and Mazmanian, 2009; Arranz *et al.*, 2013). Cependant de plus en plus d'études suggèrent que la communauté microbienne vaginale joue un rôle immuno-modulateur similaire. C'est le cas de *L. crispatus*, (mais pas de *L. iners*) dont la présence pourrait être corrélée à une protection contre les maladies sexuellement transmissibles, dont le sida induit par le VIH-1 (Nunn *et al.*, 2015; Gosmann *et al.*, 2017) (Figure 9). L'un des principaux mécanismes par lequel les bactéries semblent modifier le risque d'infection par le VIH-1 se fait par la stimulation de la production de molécules responsables du phénomène inflammatoire et par la différence de recrutement des cellules cibles de ce virus. (Gosmann *et al.*, 2017) ont constaté que les personnes ayant des communautés bactériennes vaginales dominées par d'autres bactéries anaérobies telles que les *Prevotella spp.* et non les lactobacilles, présentaient un risque 4 fois plus élevé de

contracter le VIH car ils avaient un nombre accru de cellules T CD4+ par rapport à une communauté dominée par *L. crispatus* (Gosmann *et al.*, 2017; Lennard *et al.*, 2017) (Figure 9). À l'heure actuelle, il est difficile de discerner les mécanismes précis montrant que les bactéries vaginales manipulent les cellules cibles du VIH-1. Néanmoins, des co-cultures réalisées *in vitro* entre des cellules épithéliales vaginales VK2/E6E7 et des bactéries de la flore vaginale (genre *Fusobacterium* ou *Prevotella*) induisent la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que les IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , et IL-8, en activant les TLR de l'hôte (Fichorova *et al.*, 2011; Anahtar *et al.*, 2015). *A contrario*, les cytokines pro-inflammatoires ne sont pas induites lorsque les cellules épithéliales vaginales sont co-cultivées avec *L. crispatus*. Cette espèce est considérée comme protectrice contre le VIH-1 par son abondance au niveau des muqueuses : cette colonisation importante crée un environnement non inflammatoire permettant d'éviter le recrutement des cellules cibles du VIH (Doerflinger *et al.*, 2014).

Les lactobacilles peuvent également inhiber la colonisation des pathogènes en entrant en compétition pour les récepteurs des cellules hôtes utilisés dans les processus infectieux par des agents pathogènes urogénitaux tels que *G. vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* et *P. bivia*. Ainsi, les lactobacilles ayant une plus grande affinité pour les récepteurs des cellules hôtes peuvent empêcher *G. vaginalis* d'adhérer aux cellules (Huang *et al.*, 2014). Les récepteurs des cellules vaginales peuvent être des glycolipides, qui sont vraisemblablement des cibles de la compétition observée entre les lactobacilles et les pathogènes (Boris *et al.*, 1998). En outre, certains lactobacilles seraient co-agrégés avec des agents pathogènes, tels que *G. vaginalis*, *C. albicans* et *E. coli*, ce qui les empêche d'adhérer aux cellules de l'hôte et ainsi de coloniser les parois vaginales (Huang *et al.*, 2014). Les lactobacilles protègent également contre d'autres agents infectieux. La bactérie intracellulaire obligatoire *Chlamydia trachomatis* est l'une des principales causes d'infection sexuellement transmissible avec plus de 100 millions de nouveaux cas par an (Nardini *et al.*, 2016). Les lactobacilles, principalement *L. crispatus*, pourraient exercer une inhibition de l'infection par *Chlamydia*, probablement par acidification du milieu vaginal (Nardini *et al.*, 2016).

Quelques exemples de ces mécanismes et leurs bénéfices associés sont rapportés dans le tableau ci-dessous :

Bénéfice	Action des lactobacilles
Maintien du pH vaginal	Production d'acides organiques et de peroxyde d'hydrogène (Borges <i>et al.</i> , 2014)
Maintien des sécrétions	Adhérence aux cellules de l'épithélium induisant la production de mucines (Mack, 2003)
Actions antiseptique	Sécrétion de peroxyde d'hydrogène (Borges <i>et al.</i> , 2014; Aldunate <i>et al.</i> , 2015) Sécrétion de bactériocines (Boris and Barbés, 2000)
Biofilms	Constitution d'un biofilm à la surface des muqueuses vaginales (Lepargneur and Rousseau, 2002) Capacité de co-agrégation avec les germes pathogènes Inhibiteur d'adhérence de germes <i>via</i> la production de biosurfactants (Gomaa, 2013; Ceresa <i>et al.</i> , 2015)
Barrière immunitaire	Stimulation des défenses pré-immunitaires grâce aux antigènes de surface (Alvarez-Olmos <i>et al.</i> , 2004)

Tableau 1 : Bénéfices engendrés par la présence des lactobacilles.

c. Variations hormonales et lactobacilles

La fluctuation du nombre de lactobacilles pendant les cycles menstruels est importante. La période des menstruations correspond généralement à une population élevée en lactobacilles, et une augmentation de l'abondance du genre pendant la phase lutéale ou sécrétrice, c'est-à-dire après l'ovulation. Plusieurs études suggèrent que des taux élevés d'estradiol (c'est le cas pendant la phase lutéale) favorisent la prolifération des lactobacilles, et en particulier, *L. crispatus*. Eschenbach *et al.*, 2000 ont constaté que le taux de récupération d'une forte concentration en lactobacilles augmentait au cours du cycle menstruel et qu'à l'inverse la concentration d'autres genres bactériens avait tendance à être plus élevée au moment des règles (c'est-à-dire au début de la phase folliculaire correspondant à un taux d'estradiol bas). De plus, il a été montré que durant les règles il y avait une fluctuation rapide de la communauté microbienne et que cette phase était associée à un déséquilibre des abondances en lactobacilles (Brotman *et al.*, 2010). On peut ainsi noter que le niveau moyen d'estradiol serait de l'ordre de 39 ng/L lorsque la flore lactobacillaire est la moins abondante, contre 176 ng/L quand la communauté microbienne vaginale est normale (Wilson *et al.*, 2016). Dans la plupart des études les menstruations

représentent un facteur de perturbation très important, parfois associé à une réduction des lactobacilles ou même à une modulation de la population entre les différentes espèces de lactobacilles. C'est le cas par exemple du passage de la dominance par *L. crispatus* par rapport à *L. iners*, ou encore de l'apparition de bactéries indésirables comme les streptocoques. Cependant, de nombreuses publications indiquent que cette fluctuation du nombre de lactobacilles n'est pas observée chez toutes les femmes. Witkin *et al.*, 2007 affirment dans leur étude que les taux de lactobacilles vaginaux semblent rester constants tout au long du cycle. Ces données contradictoires peuvent être partiellement expliquées par l'observation qu'un grand nombre de *L. iners* peut remplacer *L. crispatus* pendant les règles. Enfin, il est également bien établi que la microflore intime des femmes enceintes est plus stable (Romero *et al.*, 2014), peut-être en raison de l'absence de menstruations, coïncidant avec une réduction supplémentaire du pH vaginal, où *L. crispatus* offre plus de protection que *L. gasseri* et *L. iners* contre l'évolution d'un déséquilibre de la microflore vaginale (Vanechoutte, 2017).

Cette fluctuation du taux de stéroïdes sexuels, et *in fine* des sécrétions vaginales, semble affecter la composition de la flore lactobacillaire.

		Statut hormonal	Flore
Nouveau-né (0- 6 semaines)		Œstrogènes présents suite à l'accouchement	Flore lactobacillaire importante
Enfance		Œstrogènes absents	Flore composée quasi-exclusivement de souches d'origines digestive et cutanée
Puberté		Œstrogènes présents	Flore lactobacillaire de plus en plus abondante
Cycle menstruel	Ovulation	Pic oestrogénique	Flore majoritairement composée de lactobacilles
	règles	Carence oestrogénique	Flore très peu abondante en lactobacilles
Grossesse		Forte imprégnation oestrogénique	Flore pauvre en lactobacilles
Ménopause		Carence importante oestrogénique	Absence de lactobacilles, souches d'origines digestive et cutanée

Tableau 2 : Représentation de la population lactobacillaire en fonction du contexte hormonal.

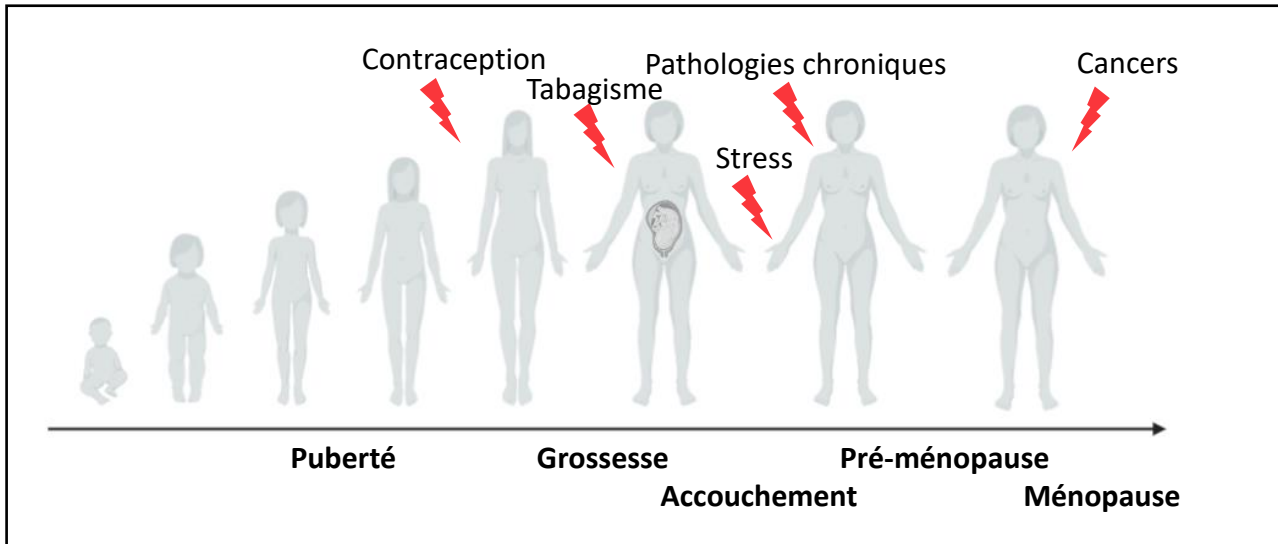


Figure 10 : Représentation de différents facteurs physiques, mécaniques et physiologiques qui peuvent avoir un impact sur la physiologie des muqueuses génitales

La caractérisation du microbiote vaginal dans les différents états de la vie d'une femme est complexe. L'âge, les menstruations et les niveaux d'œstrogènes peuvent tous avoir un impact sur la communauté bactérienne. Enfin d'autres facteurs environnementaux, tels que le stress ou le tabagisme, mais aussi les traitements thérapeutiques ont souvent des conséquences sur la physiologie de ces muqueuses. L'ensemble de ces fluctuations conduit à des changements importants dans la constitution et la biologie des tissus génitaux et elles influent directement sur l'homéostasie des muqueuses intimes.

d. Dysbioses vaginales

D'un point de vue anatomique le vagin est en relation directe avec une zone relativement aseptique, l'utérus, et une zone périnéale. Une flore bactérienne d'origine digestive ou cutanée peut potentiellement s'installer et s'y développer rapidement du fait de leur proximité physique (Huang *et al.*, 2014). Les affections et troubles gynécologiques sont courants et leur fréquence augmente avec l'âge. Chaque année dans le monde, près d'un milliard de femmes souffrent d'un déséquilibre de la microflore vaginale entraînant des infections génitales basses (Reid *et al.*, 2002). Tout au long de la vie les muqueuses génitales sont soumises à d'importantes variations physiques, mécaniques et physiologiques. Des périodes de changement hormonaux comme la grossesse, l'accouchement, l'allaitement ou la ménopause peuvent être associées à ces fluctuations (Figure 10). Les tissus vaginaux et vulvaires sont également soumis à des variations naturelles liées au vieillissement et aux variations hormonales (Farage and Maibach, 2006). Le microbiote vaginal humain joue un rôle important dans la prévention de pathologies urogénitales comme les vaginoses bactériennes (Donders *et al.*, 2000; Wiesenfeld *et al.*, 2003), mais aussi des infections liées aux levures et champignons, IST, ainsi que les infections du tractus génital, et les infections virales (exemple du VIH) (Taha *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 2009).

e. Déséquilibre du microbiote

La dysbiose vaginale est caractérisée par la présence de populations polymicrobiennes avec, soit une population peu abondante en lactobacilles (microbiote qualifié d'intermédiaire), soit sans lactobacilles (vaginose bactérienne) (Ling *et al.*, 2010; Ravel *et al.*, 2013). La vaginose bactérienne est une affection des parties intimes très courante (Brotman, 2011). Elle peut être asymptomatique ou symptomatique. Sous la forme asymptomatique, le microbiote vaginal est en grande partie composé de bactéries capables de produire de l'acide lactique (Tachedjian *et al.*, 2017) (Figure 11), ce qui suggère que l'acide lactique aurait une fonction clé dans la forme

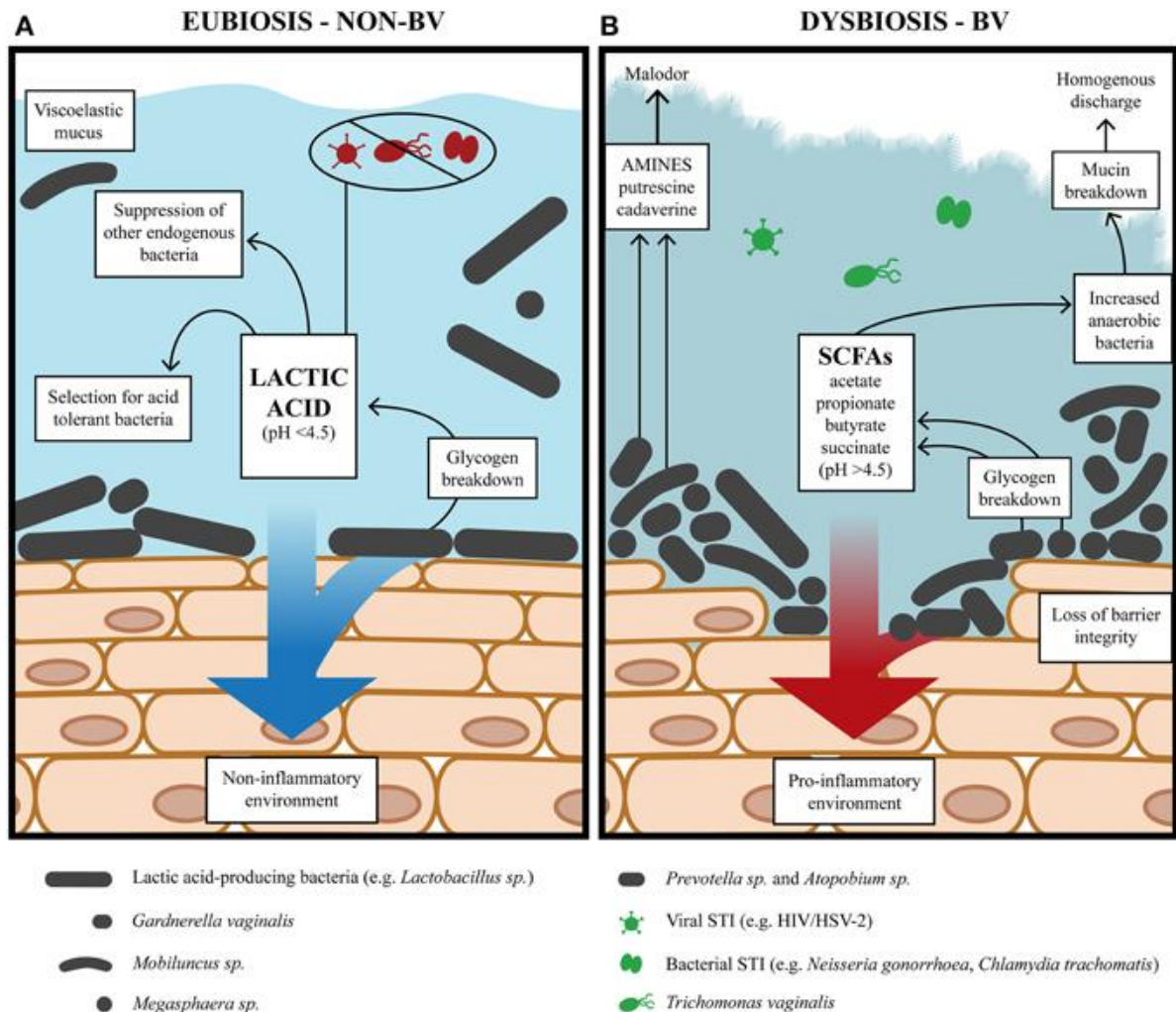


Figure 11 : L'environnement vaginal pendant les états alternatifs d'eubiose et de vaginose bactérienne. (A) Pendant l'eubiose, les bactéries productrices d'acide lactique (métabolite prédominant) acidifient l'environnement vaginal ($pH < 4,5$). L'acide lactique produit essentiellement par les lactobacilles inactivent potentiellement les IST. **(B)** Pendant la vaginose bactérienne, l'environnement vaginal permet de favoriser la croissance de diverses bactéries et présente une charge bactérienne plus élevée. Les concentrations de SCFA (short chain fatty acids) et d'amines sont associées à une acidité vaginale avec un $pH > 4,5$ (Aldunate *et al.*, 2015)

symptomatique. Lors d'infections, la flore lactobacillaire est remplacée par une flore potentiellement pathogène ou délétère entraînant une dysbiose. Cette flore remplaçante est représentée généralement par *G. vaginalis* et d'autres germes anaérobies. Dans le cas des vaginoses à levures on trouve essentiellement *Candida albicans*. Ces dysbioses peuvent devenir graves et entraîner des fausses couches ou des infections de la partie haute de l'appareil génital pouvant conduire à une perte de fécondité (Donders *et al.*, 2016). L'augmentation du pH vaginal lors de la vaginose bactérienne favorise la contamination par d'autres agents infectieux et la diffusion de l'infection dans le tractus génital (Famularo *et al.*, 2001; Cauci *et al.*, 2002) (Figure 11).

f. Infections vaginales

i. Vaginoses bactériennes

L'apparition d'inconfort génital est fréquente chez les femmes et peut s'exprimer par divers symptômes tels que des exsudats, prurits ainsi que des odeurs désagréables. La vaginose bactérienne représente 19% des diagnostics chez ces femmes (Reichman *et al.*, 2017). La vaginose bactérienne est considérée comme étant d'origine multifactorielle. Elle se caractérise par une dysbiose du microbiote vaginal (Kenyon and Osbak, 2014) et une concentration en *Lactobacillus spp.* réduite tandis que celle des bactéries pathogènes ou opportunistes est augmentée, c'est donc une pathologie polymicrobienne (Swidsinski *et al.*, 2013). Il n'y a donc pas de marqueur bactérien typique, même si la présence de *G. vaginalis* et *A. vaginae* sont de bons indicateurs (Yeoman *et al.*, 2010). D'autre part, il y a un débat sur l'élément déclencheur qui provoquerait les altérations, à savoir si ce serait un microorganisme tel que *G. vaginalis*, un ensemble de micro-organismes, ou d'autres paramètres liés au mode de vie tels que l'utilisation de douches vaginales (Ma *et al.*, 2012). Enfin, la vaginose bactérienne pourrait être confondue avec un autre phénomène récemment identifié cliniquement, la vaginite aérobie (Donders *et al.*, 2017).

ii. La vaginite aérobie

La vaginite aérobie peut être définie comme une altération du microbiote (moins de lactobacilles et plus de bactéries aérobies entériques) avec des niveaux variables d'inflammation, un déficit de maturation épithéliale et une réponse immunitaire avec élévation de la production d'interleukines (principalement l'IL-1, IL-6 et IL-8). Chez la femme enceinte, cette vaginite aérobie

est associée à un risque d'accouchement prématuré, pouvant entraîner des infections intra-amniotiques et une inflammation du cordon ombilical du fœtus (Donders *et al.*, 2016).

iii. *Autres infections vaginales*

Parmi les autres infections il y a celles causées par les levures et plus particulièrement par les espèces du genre *Candida*, appelées candidoses vulvo-vaginales. Ces infections touchent 75 % des femmes, et au moins 6 à 9 % des femmes souffrent de candidose vulvovaginale récurrente. Parmi les espèces de *Candida*, *C. albicans* est la principale cause d'infections. Les facteurs de risque de la candidose vulvovaginale comprennent les changements hormonaux, un état immunodéprimé, une grossesse ou une exposition aux antibiotiques (Sobel, 2007). Des médicaments antifongiques, tels que le clotrimazole et le fuconazole, sont utilisés pour traiter les infections à *C. albicans*. *C. albicans* adhère aux cellules épithéliales de l'hôte et produit des facteurs de virulence tels que des enzymes protéolytiques, la formation d'hyphes, des toxines, et des phospholipases (Sobel, 2007). Plusieurs espèces de lactobacilles peuvent potentiellement avoir une activité anti-*Candida*, c'est le cas par exemple de *L. crispatus* qui peut inhiber *in vitro* et *in vivo* (chez la souris), la croissance et la formation d'hyphes (Jang *et al.*, 2019).

Il y a également des infections causées par des parasites. La trichomonase est la maladie causée par le protozoaire extracellulaire *Trichomonas vaginalis*. C'est l'infection sexuellement transmissible causée par un parasite la plus courante dans le monde, avec 276 millions de cas chaque année (Hinderfeld and Simoes-Barbosa, 2020). Cette infection a été corrélée à une augmentation de l'infection par le VIH et au développement du cancer du col de l'utérus, des maladies inflammatoires pelviennes. Les infections à *T. vaginalis* s'accompagnent généralement d'une dysbiose vaginale avec un microbiote composé principalement de bactéries anaérobies souvent associées à une vaginose bactérienne, telles que *G. vaginalis*, *A. vaginae* et *P. bivia* (Hinderfeld and Simoes-Barbosa, 2020).

Il y a également les infections causées par les virus, en plus d'améliorer le recrutement des cellules cibles du VIH-1 telles que les lymphocytes CD4+, un autre mécanisme par lequel les bactéries vaginales retrouvées lors des dysbioses pourraient augmenter la sensibilité au virus se fait par la rupture de la barrière épithéliale vaginale. Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-8, IP-10) entraînent une diminution de la résistance transépithéliale (une mesure d'intégrité de la barrière épithéliale). Cela suggère que les bactéries peuvent également altérer la fonction barrière de la muqueuse *via* l'induction de cytokines pro-inflammatoires (Nazli *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2015). De plus, l'implication de la communauté bactérienne vaginale dans l'atteinte

de la barrière épithéliale a été montrée par des études *in vivo* reliant le déséquilibre du microbiote et l'augmentation des cytokines inflammatoires avec une altération des protéases vaginales (entraîneraient d'autres lésions tissulaires, un déclin de la fonction de barrière) et des protéines de la muqueuse (Arnold *et al.*, 2016; Borgdorff *et al.*, 2016). Ce lien est observé de façon plus prononcée pendant la phase lutéale des menstruations, lorsque le taux de progestérone est élevé (Birse *et al.*, 2015). En outre, altérer l'intégrité de la barrière épithéliale vaginale permet la translocation microbienne (Nazli *et al.*, 2010), ce qui pourrait expliquer le recrutement et l'activation des cellules immunitaires, dont les cellules cibles du VIH-1. L'ensemble de ces informations permet de conclure que la communauté microbienne vaginale est susceptible de manipuler la sensibilité de l'hôte à être infecté par le VIH-1 en modifiant à la fois l'inflammation et l'intégrité de la barrière épithéliale du tractus génital.

g. Approche thérapeutique des infections vaginales et dysbioses

Actuellement les approches thérapeutiques n'intègrent pas ou très peu le microbiote vaginal endogène. Les approches restent essentiellement symptomatiques, basées sur l'emploi d'anti-inflammatoires ou d'hormones et présentent de nombreux effets indésirables en plus d'une efficacité modérée sur le moyen et long terme. Les approches actuelles qui ciblent la microflore visent à son élimination (traitements antibiotique) ou à son renouvellement (bactériothérapie), mais restent encore peu satisfaisantes.

Les traitements conventionnels impliquent l'utilisation des antibiotiques et/ou d'antifongiques et relèvent d'une prise en charge médicale contraignante. Dans le cas des vaginites à levure les imidazolés (miconazole et clotrimazole) et les polyènes (mycostatine) sont utilisés. Dans les cas de vaginoses bactériennes, le métronidazole ou la clindamycine sont recommandés (Sobel and Sobel, 2015). L'efficacité des antibiotiques reste peu satisfaisante. En effet, après un traitement pour des cas de vaginose bactérienne, plus de 50% des femmes récidivent dans les 3 à 6 mois, et plus de 30% contractent des vaginites à levure (Reid and Bocking, 2003). Par ailleurs, dans certains cas, *G. vaginalis* et *A. vaginae* sont capables de produire des biofilms qui limitent l'action des antibiotiques (Machado and Cerca, 2015). Les risques associés à l'antibiothérapie sont le développement de micro-organismes résistants et une action limitée à un groupe de bactéries et ainsi l'inefficacité dans le cas d'infections polymicrobiennes. Le risque de récurrences et la possibilité d'infections secondaires sont également élevés (Gardiner *et al.*, 2002).

Une alternative aux traitements antibiotiques existe, c'est la bactériothérapie. Elle est utilisée et choisie dans la plupart des cas où une prise en charge n'est pas nécessaire et/ou non

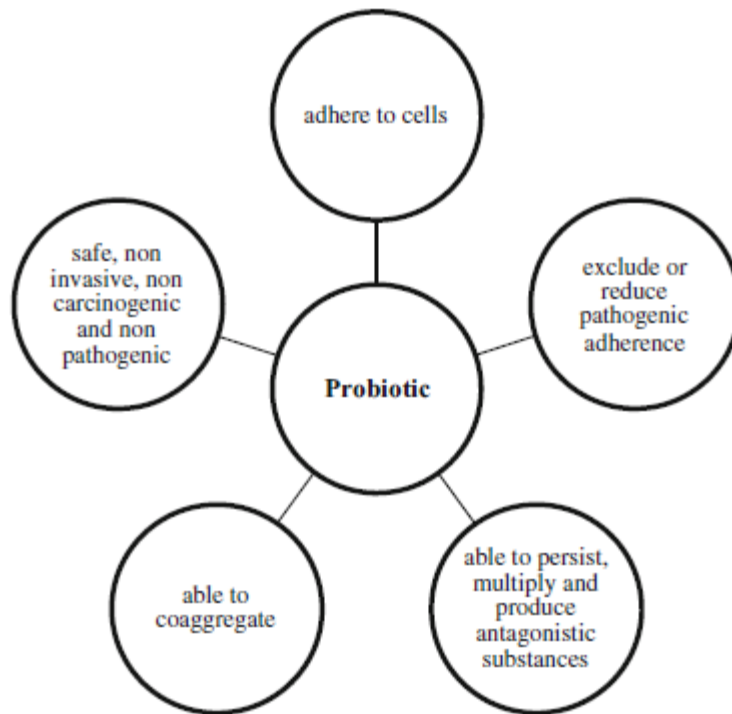


Figure 12 : Exigences attendues d'une souche probiotique (Borges *et al.*, 2014)

souhaitable. C'est une approche très ancienne, naturelle et non médicinale qui date de 1930 où Molher et Brown furent les premiers à proposer un traitement des vaginites et de la vaginose bactérienne par l'application d'une culture de bacilles de Dordelëin. En effet, l'écosystème bactérien saprophyte est un des principaux moyens de défense de l'organisme et il joue un rôle de protection contre les autres microorganismes non désirés. Il a même été démontré que des lactobacilles sont capables de détruire des biofilms de *G. vaginalis* (Saunders *et al.*, 2007). Le choix des souches probiotiques est régi par plusieurs exigences (Figure 12). Un bon probiotique doit par exemple, être capable d'adhérer aux cellules épithéliales et/ou empêcher celle de l'espèce non désirée, produire des substances antagonistes, et doit être naturellement non invasif et non pathogène (Figure 12).

D'après (Famularo *et al.*, 2001), la bactériothérapie peut être abordée de différentes façons :

- Par l'introduction d'une flore exogène bénéfique agissant comme probiotique (Table 3),
- Par l'ajout de composés glucidiques (prébiotiques) qui sont consommés et connus pour favoriser la croissance et l'implantation des lactobacilles au détriment d'une flore potentiellement pathogène (Table 4)
- Ou encore, par l'association de ces deux approches en utilisant un mélange de pré- et probiotiques.

Infection	Probiotic	Effect	References
BV	<i>L. rhamnosus</i> GR-1 <i>L. reuteri</i> RC-14	90% of cure of BV	Anukam et al. (2006)
	<i>L. rhamnosus</i> <i>L. acidophilus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	Reduction of BV recurrence and <i>C. vaginalis</i> incidence	Ya et al. (2010)
	<i>L. rhamnosus</i> (administered 8 days after treatment with 500mg oral metronidazole)	Stabilization of the vaginal ecosystem and reduction of BV recurrence	Marcone et al. (2010)
VVC	<i>L. gasseri</i> LN40 <i>L. fermentum</i> LN99 <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> LN113 <i>P. acidilactici</i> LN23 (Probiotic supplementation after conventional treatment of VVC)	Colonization of the vagina, less malodorous discharge, and higher cure rate	Ehrström et al. (2010)
	<i>L. acidophilus</i> strain NAS (H_2O_2 positive)	Significant decrease of infections by <i>Candida</i>	Metts et al. (2003)
	<i>L. plantarum</i> P17630 (after treatment with oral fluconazole 150mg)	Proportion of asymptomatic patients was significantly higher after treatment with probiotic	Carriero et al. (2007)
UTI	<i>L. crispatus</i> GAI 98332	Significant reduction in the number of UTI recurrences during treatment	Uehara et al. (2006)
	<i>L. crispatus</i> CTV-05	High-level colonization of the vagina Reduction of recurrent UTI	Stapleton et al. (2011)

Tableau 3 : Exemple de différentes souches probiotiques utilisées en cas de vaginose bactérienne (BV), de candidose vulvaire vaginale (VVC) ou d'infection du tractus urinaire (UTI).

Carbohydrate	Beneficial role	Type of study	Reference
Gluko-oligosaccharides, Fructo-oligosaccharides	Stimulate the growth of LAB	<i>In vitro</i>	Rousseau et al. (2005)
Gluko-oligosaccharides, Fructo-oligosaccharides, Galacto-oligosaccharides	Promote growth of LAB	<i>In vitro</i>	Bou-Antoun (2008)
Gluko-oligosaccharides	Improves the recovery of normal vaginal flora	Clinical trial	Coste et al. (2012)
Glucomannan hydrolysates (GMH)	Stimulate the growth of LAB	Clinical trial	Tester et al. (2012)
	Inhibit pathogen adhesion	<i>In vitro</i>	Sutherland et al. (2008)
Glycogen	Carbon source for LAB – requires α -amylase for depolymerization	Review	Kumar et al. (2011)
		Clinical trial	Mirmonsef et al. (2014)
Alginate oligosaccharide	Antibacterial agent	Clinical trial	Hou et al. (2014)
	Reduces the pH		
Dextrin sulphate	Restricts cellular adhesion (microbicide)	Clinical trial	Low-Beer et al. (2002)
		Clinical trial	Bakobaki et al. (2005)
		Clinical trial	D'Cruz and Uckun (2005)

LAB, lactic acid bacteria.

Tableau 4 : Exemples de différents carbohydrates ou prébiotiques utilisés pour différentes thérapies vaginales.

L'ensemble de solutions proposées à ce jour pour la prise en charge de l'inconfort féminin peut être résumé dans le tableau suivant.

Traitement	Actions	Avantages	Inconvénients
Approche strictement Symptomatique Lubrifiants	Lubrification	Efficacité immédiate Simple d'utilisation	Récidive importante Efficacité de courte durée
Pharmaco tissulaire Anti-inflammatoires	Cellulaire et/ou tissulaire	Diminution des symptômes liés à l'inflammation	Effets secondaires Durée limitée
Antimicrobienne Antibiotiques	Agit directement sur les populations bactériennes pathogènes	Elimination du pathogène et/ou d'espèces sensibles opportunistes	Non préventif (utilisé quand infection) Risqués (grossesse par exemple) Résistances bactériennes
Hormonale (prise d'hormones <i>via</i> injection ou ovule)	Corrige les déficiences hormonales qui influencent sur la lubrification	Maintien la dominance des lactobacilles	Effets secondaires (action systémique) Cancers hormono- dépendants
Pré/pro/postbiotiques Orale ou intra vaginal	Ajout de population bactériennes bénéfiques	Efficace sur le court terme (quelques jours) Meilleure piste actuellement	Néglige la physiologie des germes administrés et leur relation avec l'hôte Limité dans le temps Effets secondaires dus à la quantité de signaux de mort cellulaire si les germes ne peuvent pas survivre quelques jours

Tableau 5 : Les différents traitements de l'inconfort féminin en lien avec leurs avantages et inconvénients.

Dans cette approche, il s'est avéré important d'induire une ré-acidification du milieu vaginal afin de permettre une implantation durable des lactobacilles. Toutefois, on observe dans certains cas associés à des désordres hormonaux, dont une baisse des œstrogènes, que la flore probiotique ne parvient pas à s'implanter durablement et à jouer son rôle protecteur. L'efficacité de cette approche reste donc limitée dans le temps.

L'approche hormonale est basée sur le remplacement des œstrogènes chez les femmes ménopausées afin de maintenir une dominance des lactobacilles (Ginkel *et al.*, 1993; Brotman *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016). L'estradiol semble induire une augmentation de l'adhérence des lactobacilles sur les cellules épithéliales (Silva *et al.*, 2004) et une corrélation pourrait exister entre l'estradiol et les lactobacilles présents au niveau vaginal chez les femmes ménopausées sous traitement hormonal (Brotman *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2016). Cette hormone provoque une augmentation de la production de glycogène par les cellules épithéliales vaginales se retrouvant dans le mucus (Farage and Maibach, 2006). Chez les femmes ménopausées sous traitement hormonal substitutif, on a constaté une association avec le niveau de colonisation par les lactobacilles (Cauci *et al.*, 2002; Pabich *et al.*, 2003). Selon une étude de Cauci et coll., 44,1 % des femmes sans traitement ont présenté une absence de lactobacilles, contre 6,9 % des femmes sous traitement. Une méta-analyse a démontré que toutes les voies d'administration des œstrogènes (orale, transdermique ou vaginale) sont efficaces pour soulager les symptômes de la ménopause, en particulier les bouffées de chaleur (Nelson, 2004). Une étude a examiné la composition microbienne de 19 femmes ménopausées qui suivaient déjà un traitement oral contenant des œstrogènes. Chez ces femmes, des écouvillons vaginaux ont été prélevés et analysés pendant une période de trois mois. Les chercheurs ont constaté que toutes les femmes de l'étude étaient colonisées par des espèces de *Lactobacillus* et le plus souvent par *L. iners* et *L. crispatus*, comme les femmes pré-ménopausées (Devillard *et al.*, 2004). De même, un autre groupe a découvert que tous les échantillons vaginaux prélevés sur des femmes traitées contenaient une ou plusieurs espèces de *Lactobacillus* (sous-espèces prédominantes *L. iners* et *L. crispatus*) (Dahn *et al.*, 2008). Deux autres études ont comparé les femmes recevant une œstrogéno-thérapie substitutive à celles ne prenant pas de substituts hormonaux. Ces deux études ont montré que les femmes sous œstrogéno-thérapie étaient moins susceptibles d'être colonisées par des bactéries anaérobies que les femmes ne suivant pas de traitement de substitution et que toutes les femmes sous œstrogéno-thérapie présentaient des lactobacilles vaginaux (Ginkel *et al.*, 1993; Heinemann and Reid, 2011). Une autre étude sur les femmes sous traitement hormonal substitutif a révélé qu'après trois mois de traitement, 20 % des femmes sous placebo et 80 % des femmes traitées ont signalé une amélioration de la sécheresse et de

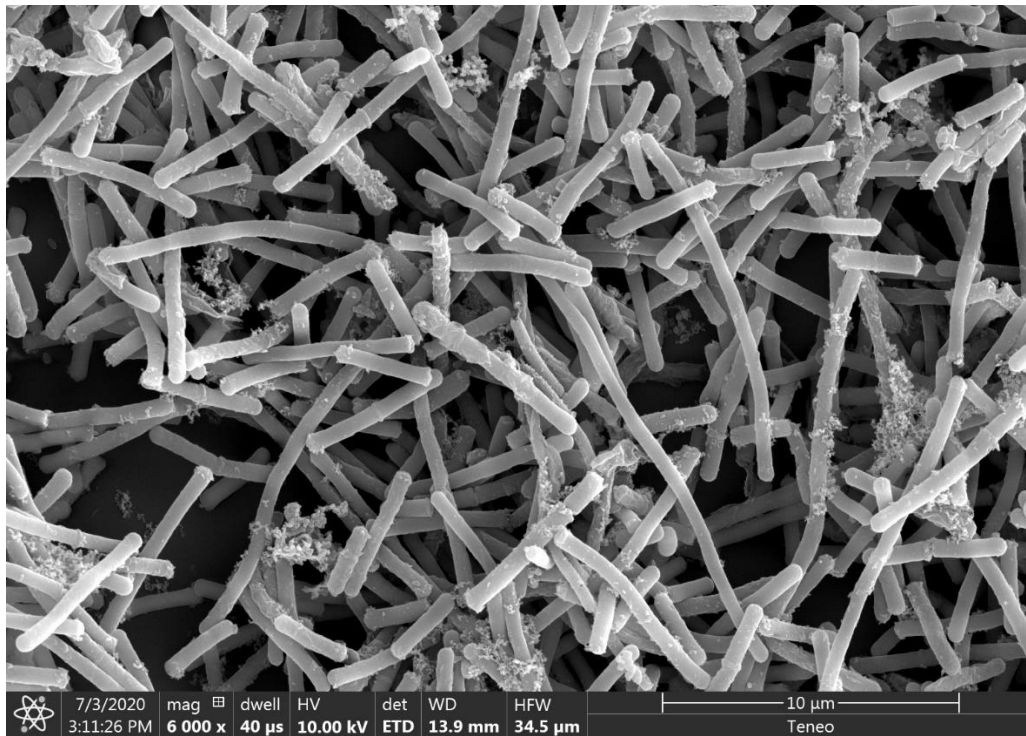


Figure 13 : Cliché de microscopie électronique à balayage de *L. crispatus* CIP104459 (Clabaut *et al.*, 2021)

l'irritation vaginales, accompagnée d'une augmentation des lactobacilles vaginaux et d'une diminution du pH vaginal (Galhardo *et al.*, 2006). Ces résultats suggèrent que ce traitement a des effets bénéfiques chez les femmes qui souffrent de symptômes associés à la ménopause. Toutes les femmes traitées dans ces études avaient un microbiote vaginal dominé par des espèces de Lactobacilles, et en particulier *L. crispatus*, ce qui est une indication supplémentaire que les niveaux d'œstrogènes ont un effet sur la structure et la composition de la communauté bactérienne vaginale. Toutefois, en raison de l'effet tumorigène des œstrogènes, ce traitement soulève de nombreuses questions, notamment en lien avec les risques de cancer du sein (Russo and Russo, 2006).

III. *Lactobacillus crispatus*

1. Présentation et caractéristiques générales

a. Présentation générale de la cellule et de sa physiologie

Lactobacillus crispatus fut décrit pour la première fois en 1953 par Brygoo *et aladame*. C'est une bactérie de forme bacillaire (Figure 13) d'environ 1 à 6 μm de longueur, homofermentaire, catalase-négative et à Gram-positif. Cette espèce fait partie des bactéries lactiques (Lactic Acid Bacteria, LAB). Ce sont des microorganismes représentatifs d'un groupe diversifié de bactéries qui sont caractérisées comme étant à Gram-positif, microaérophiles ou anaérobies, tolérantes aux acides, non sporulantes et capables de produire de l'acide lactique (Papadimitriou *et al.*, 2016). Les bactéries lactiques sont des organismes exigeants qui ont besoin de nutriments riches et complexes pour leur croissance, dont des glucides (lactose), des acides aminés, des vitamines et des minéraux. Sur la base de l'assimilation du glucose, les LAB sont divisés en deux groupes de fermentation, homolactiques et hétérolactiques. Les *L. crispatus*, comme les LAB homolactiques, utilisent la voie de la glycolyse (Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), ou Embden-Meyerhof). Dans cette voie, le glucose est converti en acide lactique (2 molécules d'acide lactique par molécule de glucose consommée). La fructose 1,6-diphosphatase est l'enzyme clé dans cette voie. Deux molécules d'ATP sont générées à partir d'une molécule de glucose par phosphorylation du substrat (Endo and Dicks, 2014).

b. Membranes, peptidoglycane, couche S et polysaccharides

La membrane cytoplasmique est une cible clé pour les lésions induites par les changements des conditions environnementales pendant la culture, en raison de son

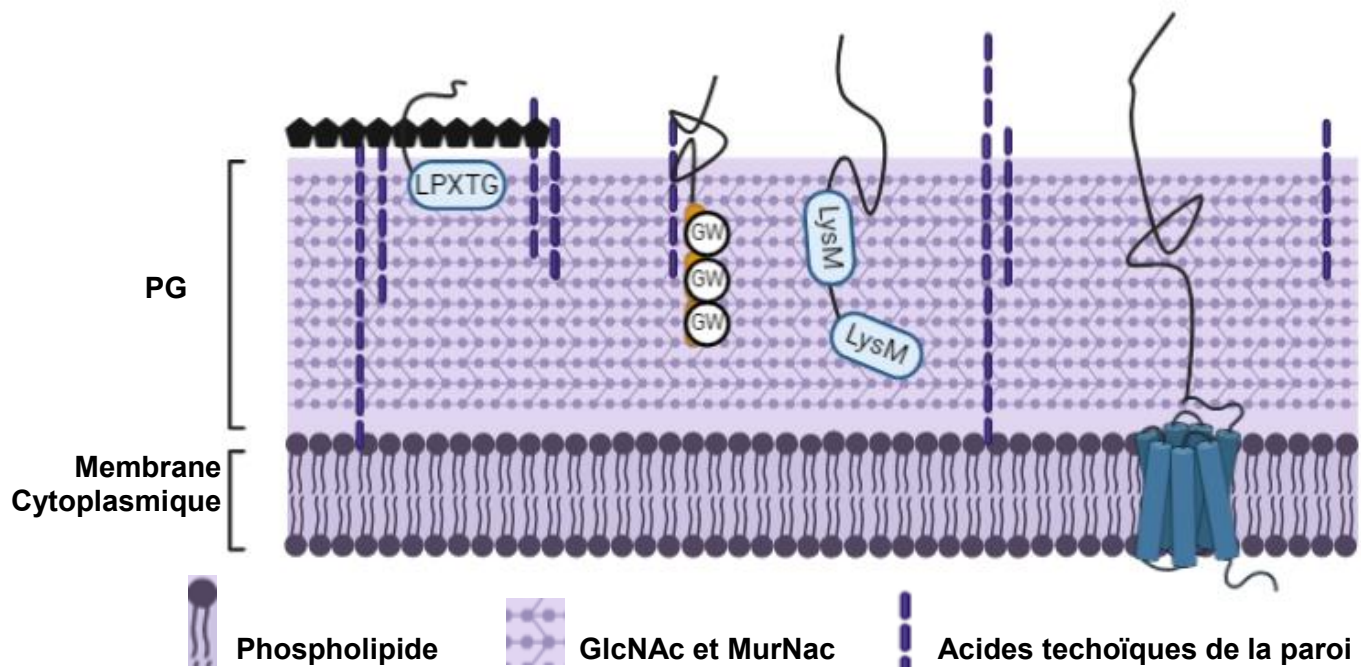


Figure 14 : Représentation schématique de la membrane, de la paroi et de la couche S de *L. crispatus*

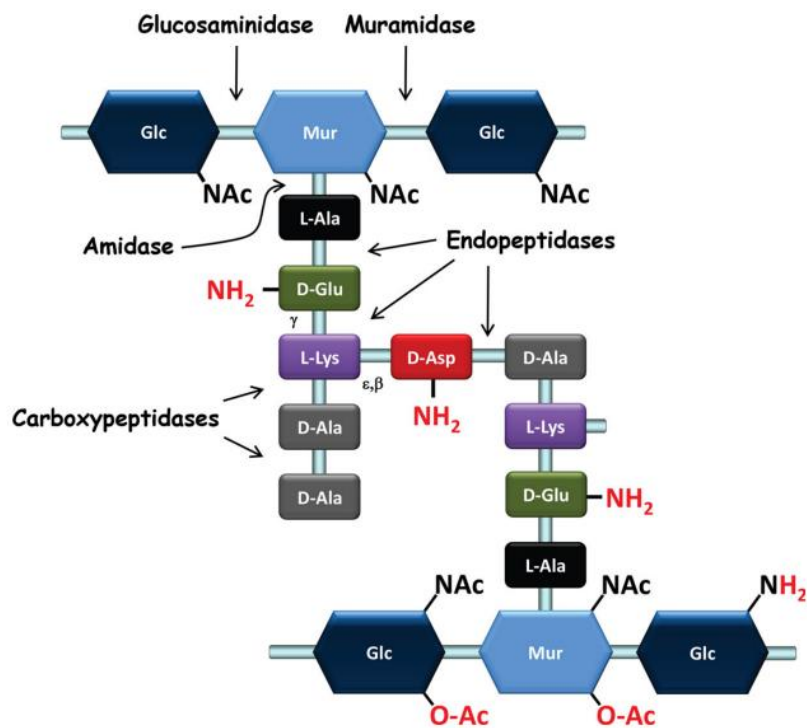


Figure 15 : Représentation schématique de la structure du peptidoglycane. Ici la structure type du peptidoglycane de plusieurs lactobacilles (Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014)

emplacement entre l'environnement externe et le milieu intracellulaire où elle agit comme une barrière. La membrane est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires vitales, dont le transport et la diffusion des solutés, la transduction de l'énergie, la croissance cellulaire et le métabolisme, afin de maintenir un environnement intracellulaire constant. Les lésions peuvent entraîner une perte d'intégrité de la membrane et des changements de perméabilité.

La membrane est une bicouche de phospholipides dans laquelle sont incorporées des protéines (Figure 14). Dans des conditions physiologiques normales, l'état biologiquement actif de la membrane est décrit comme une mosaïque fluide avec une grande liberté de mouvement, c'est la phase lamellaire. Les molécules lipidiques de la membrane peuvent se déplacer librement latéralement et en rotation alors qu'à l'état de gel, les chaînes lipidiques deviennent rigides et les mouvements sont réduits (Denich *et al.*, 2003). Les modifications des conditions environnementales telles que la température, le pH, la pression, l'oxygène, les nutriments, l'éthanol, la teneur en ions et en produits chimiques induisent des variations de l'état physico-chimique de la membrane. Elles peuvent provoquer des variations de la fluidité et du comportement de phase qui représentent les propriétés dynamiques des lipides à l'intérieur de la membrane (Mykytczuk *et al.*, 2007). Les fonctions cellulaires de la membrane nécessitent le maintien d'une fluidité membranaire et d'une phase lamellaire cristalline liquide appropriée, appelée adaptation homéovisqueuse de la membrane (Sinensky, 1974). Par conséquent, en réponse à des stress tels que la température, le pH et la composition du milieu, les bactéries adaptent la composition en acides gras de leur membrane *via* plusieurs processus, notamment des modifications du rapport saturation/insaturation, de la longueur de la chaîne hydrocarbonée, de la position des ramifications, de l'isomérisation *cis/trans* et de la cyclopropanation. Ces adaptations peuvent se produire simultanément, par exemple une augmentation du rapport insaturation/saturation et une diminution de la longueur de la chaîne acyle grasse lorsque la température de croissance diminue (Denich *et al.*, 2003).

La paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif est constituée d'un réseau de peptidoglycane qui entoure la membrane cytoplasmique et est associée à des acides teichoïques, des polysaccharides et des protéines. La paroi cellulaire a de multiples fonctions pendant la croissance bactérienne, notamment le maintien de l'intégrité et de la forme des cellules ainsi que la résistance à la pression de turgescence. Elle doit rester souple pour permettre le remodelage nécessaire à la division et à la croissance des cellules. De plus, comme elle sert d'interface entre la cellule bactérienne et son environnement, la paroi cellulaire sert également de médiateur entre les bactéries et les surfaces abiotiques, les bactériophages ou encore les cellules eucaryotes de

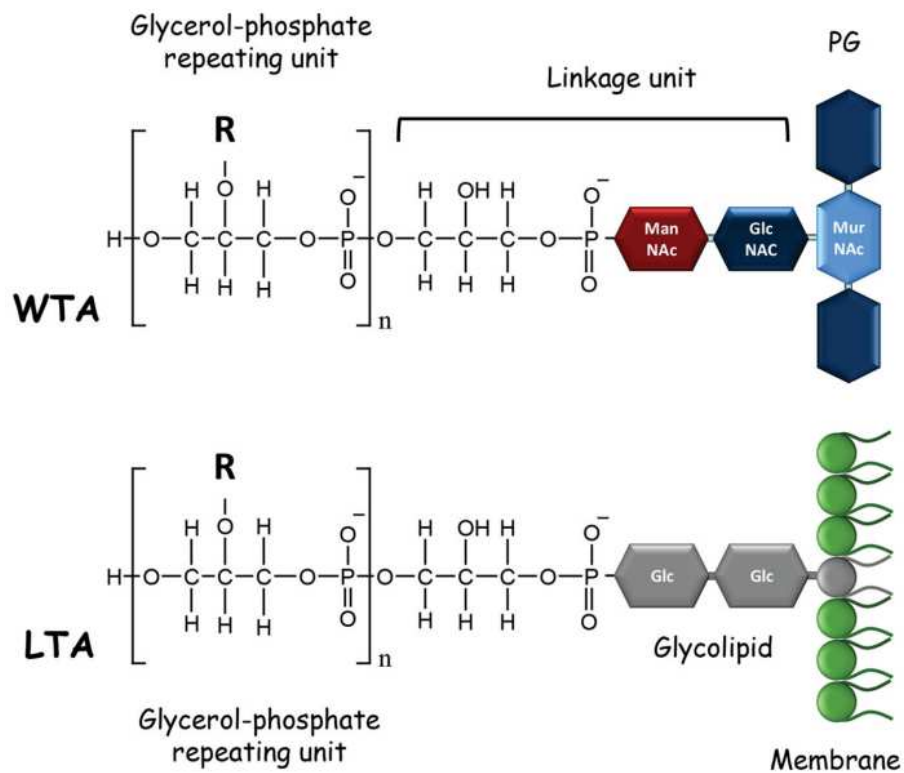


Figure 16 : Représentation schématique de la structure des acides téichoïques (WTA) et des acides lipotéichoïques (LTA, Chapot-Chartier et Kulakauskas, 2014)

l'hôte. Le peptidoglycane est le principal composant de la paroi cellulaire des bactéries à Gram-positif. Il est constitué de chaînes de glycanes constituées d'une alternance de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc) qui sont liées par des liaisons glycosydiques β -1,4 (Figure 15) (Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014). Les chaînes peptidiques sont liées de manière covalente par leur extrémité N-terminale au groupe lactyle de MurNAc. La composition de ces chaînes peptidiques varie selon les espèces et peut être réticulée directement ou indirectement, par le biais d'un ou plusieurs acides aminés qui génèrent une structure tridimensionnelle autour de la cellule. Un maillage de peptidoglycane solide est nécessaire au maintien de la forme des cellules et permet de contrecarrer à la fois la pression de turgescence élevée et le stress de la paroi cellulaire lié aux facteurs environnementaux. En même temps, la croissance et la séparation des cellules nécessitent également un degré élevé d'élasticité du réseau de peptidoglycane. Ces deux exigences opposées requièrent l'action coordonnée des enzymes de synthèse et de dégradation de celui-ci. La perte de cet équilibre peut entraîner un arrêt de la croissance et une lyse cellulaire. Chez les bactéries, un tel équilibre est atteint principalement par la régulation des activités des enzymes autolytiques potentiellement mortelles que sont les peptidoglycane-hydrolases. La régulation de ces enzymes peut avoir lieu au niveau de la transcription, mais également être médiée par des mécanismes impliquant des modifications post-transcriptionnelles des peptidoglycane-hydrolases ou la modification de leur substrat lui-même. D'autre part, le peptidoglycane des *Lactobacillus* peut avoir une activité immunomodulatrice en améliorant la réponse de l'immunité innée de l'hôte. Par exemple, celui de *L. crispatus* provenant d'un isolat vaginal peut stimuler l'expression des protéines CD207 des cellules de Langerhans (antigènes présents sur les cellules dendritiques vaginales). Ce dernier réduit, de manière significative, l'expression des récepteurs pour l'entrée du VIH qui se lie à ces protéines (Song *et al.*, 2018). L'équilibre entre le microbiote vaginal et le système immunitaire au niveau des cellules épithéliales vaginales est cruciale dans la prévention des infections. L'effet potentiel du peptidoglycane dans la modulation de l'homéostasie immunitaire pourrait contribuer efficacement au maintien d'un écosystème vaginal sain (Chee *et al.*, 2020).

La paroi cellulaire de la plupart des bactéries à Gram-positif contient des acides téichoïques et lipotéichoïques qui sont des polymères anioniques constitués d'unités répétitives d'alditol-phosphate. Les acides téichoïques sont liés de manière covalente au peptidoglycane alors que les acides lipotéichoïques sont ancrés dans la membrane cytoplasmique par leur fraction glycolipidique. Les structures les plus courantes des acides téichoïques de la paroi sont des chaînes de poly-glycérophosphate [poly(Gro-P)] ou de poly-ribitolphosphate [poly(Rbo-P)]. Elles sont attachées de manière covalente au peptidoglycane par une liaison phosphodiester à

l'hydroxyle situé en position C6 de MurNAc, *via* une unité de liaison généralement constituée d'un disaccharide, la N-acétylmannosaminyl- β (1-4)-N-acétylglucosamine, et d'une unité glycérophosphate (Figure 16) (Chapot-Chartier and Kulakauskas, 2014). La structure de l'acide lipotéichoïque consiste en une chaîne de poly(Gro-P) liée à une molécule d'ancrage glycolipidique (Figure 16). Les groupes hydroxyles libres des unités Gro- ou Ribo-alditol sont partiellement décorés de D-Ala ou de monosaccharides tels que Glc, Gal ou GlcNAc. La longueur des chaînes poly(Gro-P) ou poly(Rbo-P) varie selon les espèces et les souches. Les acides téichoïques et lipotéichoïques contribuent de manière significative à la fonctionnalité de la paroi cellulaire. Les différents rôles attribués aux acides téichoïques sont, au moins en partie, liés à leur caractère anionique ou à leur distribution au sein de la paroi cellulaire bactérienne. Le niveau des substitués D-Ala, qui modifient la charge globale et locale de ces acides, a également un impact majeur sur leur fonctionnalité (Neuhaus and Baddiley, 2003). En général, celles-ci fournissent un réservoir d'ions à proximité de la paroi cellulaire qui peut être nécessaire au bon fonctionnement des enzymes. En raison de leur caractère anionique, ils peuvent se lier à la fois à des cations, tels que Mg^{2+} , et à des protons, créant ainsi un gradient de pH à travers la paroi cellulaire (Neuhaus and Baddiley, 2003). Ils jouent d'autres rôles : ils contrôlent les autolysines, maintiennent la morphologie des cellules bactériennes, reconnaissent les bactériophages, interagissent avec le système immunitaire de l'hôte et sont impliqués dans la colonisation de l'hôte. Chez *L. lactis*, la D-alanylation de l'acide téichoïque a également un impact sur l'efficacité de la sécrétion de protéines (Nouaille *et al.*, 2004), la résistance au stress UV (Duwat *et al.*, 1997) et la résistance à la nisine, un peptide antimicrobien cationique (Kramer *et al.*, 2006).

Avec d'autres molécules de surfaces, les acides lipotéichoïques modulent les récepteurs de reconnaissance ainsi que plusieurs voies de signalisation de l'hôte qui sont responsables de l'effet probiotique et anti-pathogène de *Lactobacillus* (Lebeer *et al.*, 2010). L'éradication des biofilms polymicrobiens dans le vagin humain est l'une des stratégies qui peuvent être utilisées pour entraver la virulence bactérienne et prévenir l'apparition de la vaginose bactérienne (Hardy *et al.*, 2017). Par exemple, l'acide lipotéichoïque de *L. plantarum* permet d'inhiber la formation du biofilm d'*Enterococcus faecalis* sur la dentine humaine (Jung *et al.*, 2019). De plus, ils permettraient de moduler la production de cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, ceux de *Lactobacillus johnsonii* et *Lactobacillus acidophilus* stimulent la production de TNF- α , d'IL-8 et d'interleukine-5 par les cellules épithéliales intestinales, en présence de LPS ou de bactéries à Gram-négatif (Vidal *et al.*, 2002). Chez les femmes atteintes de vaginose bactérienne, les maladies sexuellement transmissibles sont souvent associées à une sur-stimulation des cytokines pro-inflammatoires et à un recrutement des neutrophiles à la surface de

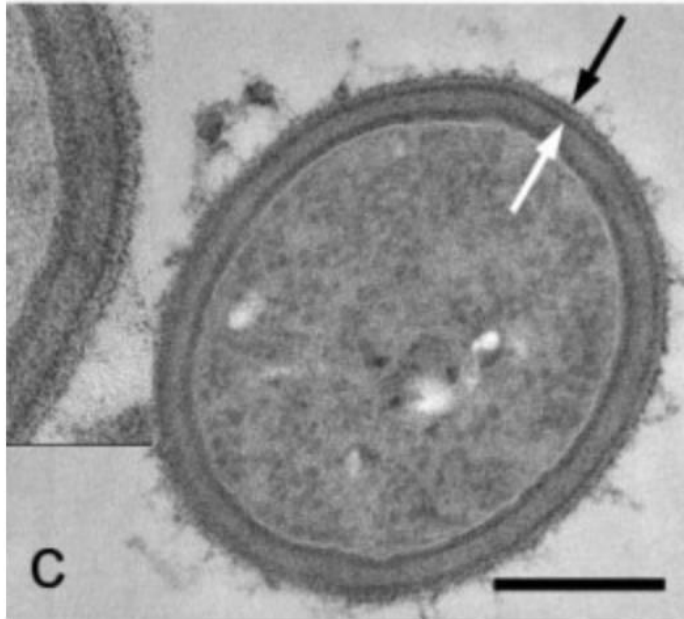


Figure 17 : Observation par microscopie électronique de la couche S chez *L. crispatus* DSM20584. La couche S est visible entre les deux flèches. Barre noire = 250 nm. (Schär-Zammaretti et Ubbink, 2003)

la muqueuse vaginale (Masson *et al.*, 2019). Ainsi, l'activité immunomodulatrice des acides lipotéichoïques des lactobacilles pourrait atténuer l'inflammation vaginale causées par les agents pathogènes (Chee *et al.*, 2020).

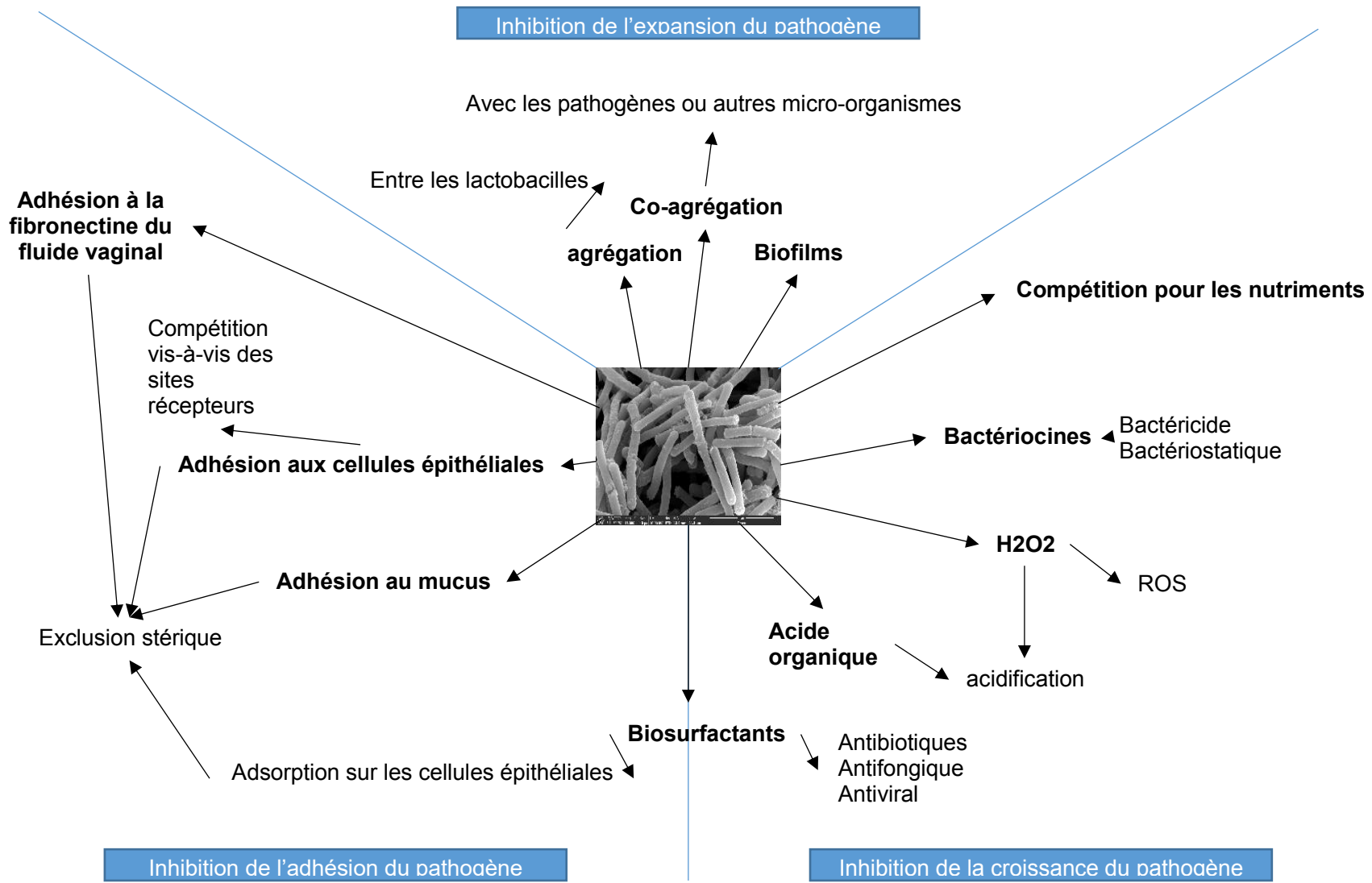
La couche superficielle (couche S) est une monocouche cristalline composée de protéines ou de glycoprotéines entrant dans la composition de l'enveloppe extérieure. Les molécules qui la composent ont des masses allant de 40 à 200 kDa (Sára and Sleytr, 2000) (Figure 17). Les protéines de la couche S peuvent représenter 10 à 15 % des protéines totales de la cellule bactérienne. De nombreuses fonctions des couches S sont hypothétiques et restent à élucider. Néanmoins, plusieurs rôles sont attribués à celle-ci. La couche S a été considérée comme une couche protectrice, un déterminant de la forme des cellules, un piège pour d'autres molécules et ions, un facteur de virulence (pour les espèces pathogènes), et un site d'adhésion pour les exoenzymes et cellules de l'hôte (Avall-Jääskeläinen and Palva, 2005). Les protéines de la couche S de plusieurs espèces du genre *Lactobacillus* sont des protéines dont le poids moléculaire est de l'ordre de 25 à 71 kDa. Elles sont généralement très basiques (pI > 9) (Avall-Jääskeläinen and Palva, 2005). Les protéines de la couche S sont variables dans la région N-terminale mais présentent des séquences conservées dans la région C-terminale (Sillanpää *et al.*, 2000). L'étude de la structure primaire des protéines de la couche S a démontré que deux régions fonctionnelles sont impliquées dans des fonctions clés : l'une permet de médier à la fois l'auto-assemblage et l'adhérence des bactéries pour différentes cibles, l'autre permet l'ancrage de la couche S dans l'enveloppe cellulaire (Avall-Jääskeläinen and Palva, 2005). L'une des fonctions les plus importantes de la couche S est la médiation de l'adhérence des bactéries à leur environnement. Les cellules épithéliales, le collagène et la fibronectine ont été utilisés pour rechercher des probiotiques ayant une forte capacité d'adhérence (Buck *et al.*, 2005). Pour la protéine de la couche S de *L. crispatus* JCM 5810, la région de liaison de l'enveloppe cellulaire est située à l'extrémité C-terminale, et la partie variable N-terminale est responsable de l'auto-assemblage (Antikainen *et al.*, 2002). Les protéines de la couche S sont ancrées à la paroi cellulaire par divers mécanismes de liaison. La protéine de la couche S de *L. crispatus* JCM 5810, CbsA, se lie aux acides lipotéichoïques de *S. aureus* et *E. faecalis*. Cette liaison est médiée par des interactions électrostatiques dans la partie C-terminale (Antikainen *et al.*, 2002).

Les bactéries forment des polymères étroitement liés à la surface des cellules et les libèrent dans l'environnement sous forme d'exopolysaccharides. En général, ils sont essentiels pour l'adhérence et la reconnaissance cellulaire lors de l'interaction hôte-microorganisme (Laiño *et al.*, 2016). Les exopolysaccharides sont des polymères glucidiques biodégradables de haut poids

moléculaire et sont désignés en homopolysaccharides ou hétéropolysaccharides sur la base de leurs constituants monosaccharidiques (Chee *et al.*, 2020). La production d'exopolysaccharides par les *Lactobacillus* est régulée par les conditions de culture et la composition en nutriments (Lin *et al.*, 2019). Par exemple, leur production chez *L. rhamnosus* est augmentée de 40 à 50% après 48 heures de co-fermentation avec *Saccharomyces cerevisiae*, grâce à la régulation de l'expression des opérons exopolysaccharides qui a amélioré la biosynthèse des acides aminés, le métabolisme des glucides et les métabolismes des acides gras (Bertsch *et al.*, 2019). Une étude similaire a également rapporté qu'une production plus élevée d'exopolysaccharides de *L. plantarum* est observée dans un milieu Man, Rogosa et Sharpe (MRS) contenant du glucose comme source de carbone (Imran *et al.*, 2016). Les différentes sources de carbone du milieu de culture influencent également de manière significative l'activité fonctionnelle des exopolysaccharides de *Lactobacillus*. Pour preuve, le MRS additionné de saccharose augmente de manière significative leur production par *L. plantarum* LPC-1. Cependant, une activité antioxydante plus importante a été rapportée chez cette bactérie lorsque le glucose est utilisé comme source de carbone au lieu du saccharose (Cheng *et al.*, 2019). Ensemble, ces deux facteurs qui affectent la production d'exopolysaccharides (souches de *Lactobacillus* et source de carbone) déterminent les propriétés rhéologiques et peuvent influencer leurs activités fonctionnelles. Les propriétés physico-chimiques des exopolysaccharides des *Lactobacillus* peuvent avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine, car ils possèdent des propriétés anti-athérosclérotiques, anticancéreuses, antioxydantes, antivirales, anti-levures, immunomodulatrices et prébiotiques (Rahbar Saadat *et al.*, 2019). La β -défensine-2 humaine est un peptide antimicrobien sécrété par les cellules épithéliales de l'hôte qui aide à réguler l'inflammation et la fonction des microbiotes vaginaux (Meade and O'Farrelly, 2019). Les exopolysaccharides de *L. crispatus* L1 renforcent fortement la capacité des cellules épithéliales vaginales VK2 à produire de la β -défensine-2 qui exerce un effet anti-*Candida* et réduit l'adhérence de *C. albicans* par exclusion compétitive (Donnarumma *et al.*, 2014). De plus, il a été rapporté que les exopolysaccharides de *L. plantarum* WLPL04 réduisent de manière significative l'adhérence d'*E. coli*, de *P. aeruginosa*, de *S. aureus* et de *Salmonella typhimurium* sur la lignée cellulaire HT-29 de côlon humain (Liu *et al.*, 2017), ce qui en fait un agent anti-biofilm potentiel.

2. Adaptations spécifiques à l'habitat vaginal

Les caractéristiques suivantes expliquent la capacité particulière de *L. crispatus* à s'implanter et dominer la muqueuse vaginale : (1) la production d'antimicrobiens tels que l'acide lactique,



77 **Figure 18 : Les moyens de lutte des lactobacilles contre les autres micro-organismes potentiellement pathogènes**

diverses bactériocines et de l' H_2O_2 . Ces derniers peuvent inhiber la croissance et/ou l'adhérence des agents pathogènes urogénitaux, (2) l'utilisation efficace des nutriments disponibles - en particulier le glycogène, car il s'agit de la principale source de carbone dans la lumière vaginale,(3) la production de molécules de surfaces actives ou de biosurfactants, l'adhérence aux muqueuses et aux cellules épithéliales, (4) la formation d'une matrice extracellulaire sur la surface de la muqueuse vaginale et la production d'un biofilm, (5) la capacité à s'auto-agrégéer ou se co-agrégéer avec d'autres micro-organismes, et (6) la capacité à moduler les réponses immunitaires de l'hôte (Figure 18).

a. Production d'antimicrobiens

i. Production d'acide organique

Les lactobacilles sont des bactéries anaérobies aéro-tolérantes qui produisent de l'acide lactique par la fermentation du glucose. Les *Lactobacillus* spp. acidifient le vagin à différents niveaux de pH, l'acidité induite par *L. crispatus* étant en général plus élevée par rapport à celle générée par *L. iners*, *L. jensenii* ou *L. gasseri* (Ravel *et al.*, 2011). (O'Hanlon *et al.*, 2013) ont démontré que le pH moyen est de $3,5 \pm 0,3$ (moyenne \pm écart-type) chez les femmes ayant un microbiote dominé par les lactobacilles. Ce phénotype est associé à une quantité de lactate (acide lactique protoné) de $1,0 \% \pm 0,2 \%$ (p/v). Cette forme est la plus disponible et elle est microbiocide. Cela suggère que lorsque les lactobacilles dominent le microbiote vaginal, les femmes ont une protection contre les infections grâce à l'acide lactique (O'Hanlon *et al.*, 2013). L'acide lactique vaginal existe sous deux formes d'isomères L et D. Elles sont principalement produites par les lactobacilles et dans une moindre mesure (moins de 15 %) l'acide L-lactique peut être produit directement par les cellules épithéliales vaginales (Boskey *et al.*, 2001). Le rapport entre les deux stéréo-isomères de cet acide et la diminution du pH qui en découle, sont des caractéristiques spécifiques aux espèces et aux souches de *Lactobacillus*. Les lactobacilles qui acidifient l'environnement vaginal ralentissent leur production d'acide lactique jusqu'à ce que leur taux de production corresponde à la vitesse à laquelle l'acide lactique est dégradé dans le vagin. À cet état d'équilibre, pratiquement tous les lactobacilles sont encore *viables* et croissent lentement (Boskey *et al.*, 1999). Dans les cultures axéniques, *L. crispatus* est capable de produire à la fois des formes D et L de l'acide lactique, tandis que d'autres souches telles que *L. iners* ne produisent que l'isomère L et *L. jensenii* uniquement l'isomère D (Witkin *et al.*, 2013). D'autre part, les niveaux de production varient selon l'espèce. L'étude de (Witkin *et al.*, 2013) a montré que, *in vitro*, *L. iners* produit moins d'acide lactique que *L. crispatus*.

La forme protonée de l'acide lactique prédomine à des valeurs de pH inférieures au pKa de dissociation de 3,9 et l'anion lactate (chargé, non protoné) à des valeurs de pH supérieures au pKa. Des études, réalisées *in vitro*, montrent que l'acide lactique et l'anion lactate ont des propriétés distinctes. La forme protonée de l'acide lactique a des activités antimicrobiennes et immunomodulatrices, avec des propriétés similaires entre les isomères L et D (O'Hanlon *et al.*, 2011). Contrairement à l'anion lactate, l'acide lactique protoné est capable de traverser la membrane et pénètre probablement dans les cellules sans utiliser les transporteurs de monocarboxylates ou le récepteur GPR81 connu pour se lier au lactate (Ahmed *et al.*, 2009). Dès son entrée, l'acide lactique acidifie le cytosol de la plupart des bactéries, ce qui interfère avec la fonction intracellulaire et entraîne leur mort (Kashket, 1987). Cette action est observée aussi bien chez les bactéries à Gram-positif que Gram-négatif (Alakomi *et al.*, 2000). Pour maximiser les propriétés antibactériennes de l'acide lactique, les probiotiques à base de lactobacilles devraient donc acidifier le vagin à un pH $\leq 3,9$ afin d'obtenir un état où la forme protonée de l'acide lactique domine.

L'acide lactique, et non l' H_2O_2 , est actif contre les infections sexuellement transmissibles d'origines bactériennes. La production d'acide lactique par *L. crispatus* et *L. gasseri*, inactive *C. trachomatis*, et *N. gonorrhoeae*, ainsi qu' *E. coli in vitro* (Tachedjian *et al.*, 2017). L'acide lactique, produit par *L. crispatus* affecte la croissance des bactéries présentes sur les tissus vivants, comme le démontre l'inhibition de *N. gonorrhoeae* et *G. vaginalis*, dans un modèle de muqueuse vaginale porcine (Breshears *et al.*, 2015). Ces études *in vitro* et *ex vivo* suggèrent que l'acide lactique délivré par une souche probiotique a le potentiel de maintenir l'eubiose vaginale ou de réverser la dysbiose et de protéger contre les infections d'origine bactériennes. Toutefois, les études cliniques montrant que les femmes ayant des lactobacilles producteurs d' H_2O_2 ont un risque réduit de microbiote dysbiotique, suggèrent aussi indirectement que cette association pourrait provenir de microbiote vaginal dominé par des *Lactobacillus* spp. tels que *L. crispatus*, qui peuvent produire de l' H_2O_2 dans des conditions aérobies ou de micro-aérobies (Gong *et al.*, 2014).

ii. Péroxyde d'hydrogène et formation d'espèces réactives de l'oxygène

Jusqu'à récemment, l'opinion dominante était que l' H_2O_2 est le principal facteur antimicrobien produit par les lactobacilles. Mais la plupart des études ont été réalisées dans des conditions aérobies, ne prenant pas en compte l'hypoxie vaginale (Nasielli *et al.*, 1972; Platz-Christensen *et al.*, 1995). Le rôle antimicrobien dominant de l' H_2O_2 est aujourd'hui remis en

question en raison de plusieurs découvertes récentes. Dans les conditions hypoxiques de l'environnement vaginal, les lactobacilles produisent peu ou pas d' H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène est inactivé par le puissant effet antioxydant des sécrétions vaginales et du sperme (Mirmonsef *et al.*, 2012). Les explications possibles sont que les sécrétions vaginales contiennent des protéines, des glycoprotéines, des polysaccharides, des lipides et d'autres molécules susceptibles de réagir avec l' H_2O_2 et de l'inactiver. Le taux de production d' H_2O_2 par les lactobacilles est limité en l'absence d'oxygène, comme c'est le cas dans les conditions anaérobies du vagin, alors que la plupart des études indiquent une augmentation de la production de l' H_2O_2 uniquement en cas d'exposition à l'oxygène. Lorsque les lactobacilles sont cultivés dans un environnement aérobie, les NADH oxydases et les pyruvates oxydases entrent en compétition pour le NADH avec la lactate déshydrogénase et favorisent la production d' H_2O_2 plutôt que de lactate. Mais, considérant que l'oxygène est peu présent au niveau vaginal, le métabolisme des lactobacilles devrait s'orienter vers la fermentation, c'est-à-dire l'activation de la voie dépendant de la lactate déshydrogénase qui génère du lactate et non de l' H_2O_2 comme principal produit (Vaneechoutte, 2017). Il a aussi été vérifié que les concentrations physiologiques d' H_2O_2 au niveau vaginal ne sont pas bactéricides contre les bactéries associées à la vaginose bactérienne et que lorsque de l' H_2O_2 exogène est ajouté, il affecte plus la *viabilité* des lactobacilles vaginaux que celle des bactéries associées à la vaginose bactérienne (Mirmonsef *et al.*, 2012). Inversement, *in vitro*, l'acide lactique à des concentrations physiologiques (par exemple 110 mM) ne conduit qu'à un pH de 4,5 mais cela s'avère suffisant pour induire une diminution significative de la *viabilité* de différentes bactéries associées à la vaginose bactérienne, et cela sans affecter la *viabilité* des *Lactobacillus* spp. vaginaux (Dörderlein, 1894).

Bien qu'il ait été démontré que les lactobacilles producteurs d' H_2O_2 inactivent, *in vitro*, le VIH-1, le virus de l'herpès simplex de type 2 (HSV-2), *E. coli*, *G. vaginalis*, *P. bivia* et *T. vaginalis*. Tachedjian *et al.*, 2017 remettent en question le rôle direct de l' H_2O_2 en tant qu'agent protecteur. Défendu par Klebanoff (Klebanoff *et al.*, 1991; Klebanoff, 2005) en suggérant que la production d' H_2O_2 est simplement un biomarqueur pour les lactobacilles probiotiques et qu'il est bénéfique pour d'autres raisons. En effet, par exemple *L. iners* est connu pour être moins, voir pas producteur d' H_2O_2 et cette bactérie est connue pour être moins protectrice que *L. crispatus*, mais cette différence pourrait être liée à d'autres caractéristiques telles que l'absence de production d'acide D-lactique ou la production de bactériocines (Vaneechoutte, 2017). Cependant, il existe des arguments convaincants contre la capacité de l' H_2O_2 à agir comme agent bactéricide dans les conditions qui prévalent dans l'éconiche vaginale saine (O'Hanlon *et al.*, 2013). (O'Hanlon *et al.*, 2011) ont démontré que l'ajout de seulement 1% de sécrétion vaginale et de sperme bloque

l'activité de 1 M d' H_2O_2 , et que les concentrations physiologiques d' H_2O_2 inférieures à 100 μM ne parviennent à inactiver aucune des 17 espèces bactériennes associées à la vaginose bactérienne. Seules les concentrations supra-physiologiques d' H_2O_2 exogène (100 mM) sont capables d'inactiver les bactéries associées à la vaginose, mais aussi d'affecter les lactobacilles. Une concentration de 100 mM de H_2O_2 est environ 50 fois plus élevée que ce que les lactobacilles sont capables de produire, même dans des conditions optimales à faible teneur en antioxydants, et environ 5000 fois plus élevée que la concentration estimée de H_2O_2 dans l'environnement vaginal. En effet, (Strus *et al.*, 2006) ont trouvé que les concentrations d' H_2O_2 n'atteignaient que 0,05 à 1,0 mM pour les lactobacilles cultivés en conditions standard et sous aération intense, 1,8 mM. De même, (Ocaña *et al.*, 1999) ont montré que les niveaux de H_2O_2 dans le surnageant de *L. crispatus* étaient à leur maximum en début de la phase stationnaire (3,29 mM) dans des conditions d'aérobiose, c'est-à-dire dans des cultures agitées, mais qu'il n'y avait pas de niveaux détectables de l' H_2O_2 dans des cultures non agitées. (Hertzberger *et al.*, 2014) ont rapporté jusqu'à 1 mM d' H_2O_2 après aération. D'autre part (Whittenbury, 1964), a mesuré une production de H_2O_2 à la fois en conditions aérobies et anaérobies, et (Hertzberger *et al.*, 2014) ont établi que la production d' H_2O_2 était également constitutive en conditions anaérobies, bien que la production de H_2O_2 soit fortement augmentée en présence d'oxygène. Les rapports sexuels ou l'introduction de dispositifs vaginaux (tampons, anneaux) peuvent provoquer une oxygénation temporaire, exactement aux moments où la production de H_2O_2 pourrait être utile en tant qu'élément de protection supplémentaire contre la dysbiose (Vanechoutte, 2017).

France *et al.*, (2016) ont trouvé que *L. crispatus* possède les gènes qui codent une pyruvate oxydase, conduisant à la production d' H_2O_2 (France *et al.*, 2016). Chez cette espèce, Condon (1983) a indiqué que l' H_2O_2 peut également être généré à partir de l' O_2 au cours du métabolisme du glycérol par la glycérol-3-phosphate oxydase (Condon, 1983). Cependant, Hertzberger *et al.*, (2014) ont trouvé que la production de l' H_2O_2 ne dépend pas des gènes codant pour la pyruvate oxydase, la lactate oxydase ou la NADH oxydase (Hertzberger *et al.*, 2014).

Enfin, l' H_2O_2 peut s'associer à la myéloperoxydase et à l'acide chlorhydrique du mucus pour former une substance hautement toxique pour les pathogènes transmis sexuellement dont *G. vaginalis*, *P. bivia*, *N. gonorrhoeae* ou encore le VIH (Borges *et al.*, 2014; Aldunate *et al.*, 2015). La présence d'oxygène atmosphérique entraîne la génération d'espèces hautement réactives (ROS), principalement l'ion superoxyde (O_2^-) et l' H_2O_2 , qui attaquent tout groupe oxydable, par exemple les groupes sulfhydryle, les centres fer-soufre (Fe-S), les groupes sulfureux-éthers et les groupes Fe-hèmes. Cela peut induire une réduction du transport membranaire microbien et une

interruption de la chaîne de transport des électrons. La dismutation de l'ion superoxyde génère aussi de l' H_2O_2 (Vaneechoutte, 2017).

iii. Bactériocines

La production de bactériocines dépend de la souche microbienne et des conditions de culture. Les bactériocines sont des peptides synthétisés par voie ribosomale, initialement sous une forme biologiquement inactive, puis activés par des modifications post-traductionnelles. En général, les gènes de la voie métabolique permettant la production de bactériocines et ceux de l'immunité sont organisés en opérons. Ils peuvent être localisés sur des éléments génétiques mobiles, tels que des transposons ou des plasmides. Les bactériocines nouvellement synthétisées sont ensuite modifiées avant d'être exportées hors de la cellule (Mokoena, 2017).

Plusieurs bactériocines ont été décrites chez différentes souches de lactobacilles. La bactériocine L23 (7 kDa) produite par *L. fermentum* L23 présente une activité inhibitrice contre des pathogènes à Gram-négatif et à Gram-positif et contre les *Candida* spp. (Pascual *et al.*, 2008). La fermenticine HV6b (peptide antimicrobien), produite par *L. fermentum* HV6b MTCC 10770, montre une inhibition de la croissance de *G. vaginalis*, *Mobiluncus*, certains staphylocoques et streptocoques (Kaur *et al.*, 2013). La lactocilline, produite par *L. gasseri* JV-V03 possède une activité contre *S. aureus*, *E. faecalis*, *G. vaginalis* et *Corynebacterium aurimucosum* (Donia *et al.*, 2014). L'helveticine V1829 est une bactériocine thermolabile agissant contre *L. helveticus* et *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. (Sun *et al.*, 2018) ont décrit l'helveticine-M comme une nouvelle bactériocine produite par *L. crispatus*, qui présente une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, *S. saprophyticus* et *Enterobacter cloacae*. La crispacine A, une bactériocine produite par *L. crispatus* JCM 2009, a été purifiée après culture en milieu MRS. Cette bactériocine aurait un effet sur la croissance de *Lactobacillus amylovorus* JCM 2010 (Tahara and Kanatani, 1997). Malheureusement, peu d'études ont été réalisées sur des bactériocines produites par *L. crispatus*. La couche S des lactobacilles peut également jouer un rôle dans le renforcement de l'activité bactéricide des bactériocines, une synergie ayant été démontrée entre la nisine et la protéine de la couche S de *L. acidophilus* (Prado-Acosta *et al.*, 2010).

Certaines bactériocines sont capables de déstabiliser les membranes *via* la formation de pores, ou encore de métaboliser l'arginine *via* une activité enzymatique, ce qui prive les germes pathogènes de cet acide aminé essentiel à leur croissance et leur prolifération (Boris and Barbés, 2000).

b. Relation entre glycogène et acide lactique

La production du glycogène provient essentiellement des cellules épithéliales vaginales. Le glycogène peut être libéré de l'épithélium vaginal par le biais de la production d'une métalloprotéinase matricielle 8 (MMP-8) et de la hyaluronidase-1. Le glycogène est également libéré lors de la lyse cellulaire, celle-ci peut être provoquée par de fortes concentrations d'acide lactique. Enfin, les lactobacilles produisent des cytolysines qui peuvent dégrader des membranes cellulaires et provoquer la libération du glycogène dans le microenvironnement (Boskey *et al.*, 2001). La capacité à métaboliser directement le glycogène libre semble différente selon les espèces de *Lactobacillus*, voire selon les souches. Une première étude suggérait que les lactobacilles vaginaux avaient la capacité de dégrader le glycogène en glucose mais en 1964, Stewart-Tull a constaté qu'aucun des 36 isolats de lactobacilles vaginaux de femmes enceintes testées ne pouvait métaboliser le glycogène (Stewart-Tull, 1964). De même, Wylie et Henderson (1969) ont constaté que sur 11 souches vaginales de *L. acidophilus* provenant de femmes enceintes, seulement 2 étaient capables de produire de l'acide à partir du glycogène humain (Wylie and Henderson, 1969). Martin *et al.*, (2008) n'ont observé aucune acidification avec 0,5% de glycogène ajouté à l'agar du milieu MRS pour aucune des 21 souches de *L. crispatus*, 17 souches de *L. jensenii* et 6 souches de *L. gasseri* (Martín and Soberón, 2008). D'autre part, Cato *et al.*, (1983) ont trouvé que 9 souches de *L. crispatus* sur 14 testées étaient capables de fermenter le glycogène (CATO *et al.*, 1983). Boyd *et al.*, (2005) ont rapporté que 8 souches de *L. crispatus* sur 18 étudiées étaient positives lorsqu'elles étaient testées avec la galerie API CH50 permettant de réaliser des tests de fermentation pour différents substrats, dont ici le glycogène (Boyd *et al.*, 2005). Dans ce même test, *L. jensenii* (n = 19), *L. gasseri* (20) et *L. iners* (20) sont tous négatifs. Certaines souches de *L. crispatus* pourraient métaboliser le glycogène contrairement à d'autres espèces comme *L. jensenii*, *L. gasseri* et *L. iners* également retrouvées dans l'environnement vaginal (Boyd *et al.*, 2005).

Goh et Klaenhammer (2014) ont identifié, dans le génome de la souche EM-LC1 de *L. crispatus*, une glycogène phosphorylase (GlgP) qui libère séquentiellement des fragments de glucose à partir des extrémités non réductrices du glycogène et forme du glucose-1-phosphate (Goh and Klaenhammer, 2014). Van der Veer *et al.*, (2019) ont découvert que les gènes codant une glycosyltransférase étaient plus abondants dans les *L. crispatus* isolés à partir d'échantillons vaginaux prélevés lors d'un épisode de vaginoses que ceux présent dans le tractus vaginal des femmes avec un microbiote vaginal dominé par les lactobacilles (van der Veer *et al.*, 2019).

Macklaim *et al.* 2013, ont rapporté que, lors un épisode de vaginose bactérienne, *L. iners* surexprime des gènes codant quatre glycosylases impliquées dans la dégradation du glycogène, et les gènes qui codent des systèmes de transport de la mucine (Macklaim *et al.*, 2013). La présence de gènes nécessaires à la dégradation du glycogène a aussi été décrite chez *L. acidophilus*, qui est étroitement apparenté du point de vue phylogénétique à *L. crispatus* (Goh and Klaenhammer, 2013). La production d'enzymes de dégradation permettant la métabolisation du glycogène chez les lactobacilles ne semble pas être la seule explication de la dégradation du glycogène environnant. Spear *et al.*, 2014, 2015 ont découvert la présence chez l'Homme, d'une α -amylase vaginale qui peut dégrader le glycogène en dimères, trimères ou tétramères de glucose. Une fois dégradés, ces sucres seraient plus facilement assimilables par les bactéries. Toutefois, cela soulève la question de savoir comment ces polysaccharides simples peuvent favoriser sélectivement les lactobacilles, car ils stimulent généralement de façon aspécifique la croissance de la plupart des espèces bactériennes. Nasioudis *et al.*, (2015) ont constaté que le taux médian d' α -amylase dans les sécrétions vaginales était de 1,83 mU/mL chez des femmes témoins, contre 1,07 mU/mL chez des femmes atteintes de vaginose bactérienne. Les taux vaginaux d' α -amylase étaient corrélés avec la présence d'acide D-lactique, mais pas avec celle d'acide L-lactique, ainsi qu'avec la hyaluronidase-1, la MMP-8, la lipocaline associée à la gélatinase des neutrophiles (NGAL) et la SLPI (Nasioudis *et al.*, 2015). Les chercheurs ont émis l'hypothèse que la hyaluronidase-1 et la MMP-8 augmenteraient l'exfoliation des cellules épithéliales riches en glycogène dans la lumière vaginale, entraînant une augmentation de la disponibilité du glycogène, et favoriserait l'activité de l' α -amylase. La combinaison des deux effets sur la production du glycogène et sur l'activité de l' α -amylase augmenterait la disponibilité du maltose, favorisant la prolifération des lactobacilles et expliquerait l'augmentation observée de l'acide D-lactique et donc la baisse du pH vaginal. La production concomitante de NGAL, un agent bactériostatique qui interfère avec l'acquisition du fer par les sidérophores, et de la SLPI pourrait retarder la croissance des bactéries liées à la vaginose bactérienne, ce qui pourrait conférer un avantage sélectif aux lactobacilles (Vanechoutte, 2017). Ainsi, l'activité amylase conduisant à une disponibilité accrue de saccharides simples favoriserait la croissance de la plupart des bactéries mais ne constituerait pas en soi un avantage sélectif pour les lactobacilles.

c. Production de biosurfactants

Les biosurfactants (BS) sont des métabolites amphiphiles qui présentent une grande diversité de structures chimiques. On y retrouve des glycolipides, des lipopeptides, des complexes polysaccharide-protéines, des phospholipides, des acides gras et des lipides neutres (Fiechter, 1992). Ils facilitent l'absorption de substrats non miscibles à l'eau (HOMMEL, 1993), et sont impliqués dans l'adhérence (Millsap *et al.*, 1994; Velraeds *et al.*, 1998).

Les BS présentent des caractéristiques anti-adhérence et antimicrobiennes en modifiant les propriétés de surface (Spurbeck and Arvidson, 2011). Les BS de *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. debrueckii* ATCC 9645 et *L. paracasei* 11 réduisent la formation du biofilm de *C. albicans* de 40 à 50% (dos Santos *et al.*, 2019). Ce phénotype est amplifié par les BS isolés de *L. brevis* CV8LAC, qui réduisent la formation de biofilm de *C. albicans* d'environ 90 % (Ceresa *et al.*, 2015). Les BS de *L. jensenii* P6A et *L. gasserii* P65 possèdent de puissantes activités antimicrobiennes et anti-biofilms contre de multiples pathogènes urogénitaux tels que *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus* et *Enterobacter aerogenes* (Morais *et al.*, 2017). De nombreuses études ont également été réalisées afin de rechercher les effets des BS des lactobacilles contre d'autres agents vaginaux et uropathogènes. Selon Spurbeck et Arvidson (2012), les BS de *L. gasserii* 33323 ont démontré une activité anti-adhérence contre *N. gonorrhoeae* en bloquant sa liaison à la fibronectine, un composant de la matrice extracellulaire des cellules épithéliales (Spurbeck and Arvidson, 2011). Le BS de *L. crispatus* a également été montré comme inhibant de manière significative la croissance de *N. gonorrhoeae* (>50%) (Foschi *et al.*, 2017). Jiang *et al.* ont rapporté que le mécanisme impliqué dans l'activité anti-adhérence des BS de *L. helveticus* 27170 contre *S. aureus* était lié à une perturbation de la signalisation dépendant de l'autoinducteur-2 (molécule du quorum-sensing) (Jiang *et al.*, 2019). De plus, Satpute *et al.* ont révélé que les BS de *L. acidophilus* étaient capable de réduire les biofilms d'*E. coli*, *S. aureus*, *P. vulgaris*, *B. subtilis* et *P. putida* sur la surface de polydiméthylsiloxane des implants médicaux par un mécanisme d'anti-adhérence (Satpute *et al.*, 2019). Récemment, les BS isolés et produits par la souche vaginale BC1 de *L. crispatus* ont été caractérisés comme étant des molécules lipopeptidiques. À 1,25 mg/mL, ceux-ci n'étaient pas cytotoxiques et avait la capacité d'entraver l'adhérence des souches de *Candida* vis-à-vis des cellules épithéliales vaginales humaines, principalement par un mécanisme d'exclusion. De plus, l'inoculation intra-vaginale de BS dans un modèle expérimental murin ne perturbe pas la cytologie vaginale, l'histologie et le microbiote vaginal cultivable. Enfin, au niveau vaginal chez la souris, ils présentent une activité immunomodulatrice par réduction de l'afflux de leucocytes causées par *C. albicans* ce qui limite

les lésions des muqueuses (De Gregorio *et al.*, 2020). Sur la base de ces informations, il apparaît que le mécanisme d'action des BS produits par les lactobacilles repose plus sur une inhibition de l'adhérence des pathogènes que sur un effet létal.

d. Propriétés physico-chimiques de surface

L'adhérence des bactéries aux surfaces est déterminée par l'interaction de différentes propriétés physico-chimiques des surfaces cellulaires, notamment l'hydrophobie et la charge de la surface cellulaire, deux conséquences de la composition chimique des surfaces cellulaires. En outre, des facteurs spécifiques de reconnaissance de ligands, comme l'activité de liaison aux protéines de la couche S, peuvent être décrits à l'échelle microscopique comme des interactions hydrophobes et électrostatiques. Les propriétés physicochimiques des parois cellulaires des lactobacilles déterminent leur comportement et leurs interactions non spécifiques avec l'environnement. Les principales propriétés physico-chimiques des surfaces cellulaires qui sont couramment étudiées comprennent l'hydrophobicité et la charge de surface (Deepika and Charalampopoulos, 2010). Il existe un certain nombre d'études sur les propriétés de polarité de surface des souches de *Lactobacillus*. Les résultats dépendent à la fois de l'espèce et des souches examinées (Schär-Zammaretti *et al.*, 2005).

La charge de surface nette est généralement déterminée en mesurant la mobilité électrophorétique ou le potentiel zêta de la surface de la bactérie (van der Mei *et al.*, 2003). Elle est attribuée aux constituants de la paroi cellulaire, par exemple, les groupes phosphates et carboxylates ainsi que les protéines (Pelletier *et al.*, 1997). Comme dans le cas des mesures d'hydrophobicité, les profils de potentiel z rapportés dans la littérature dépendent des espèces et des souches examinées. Toutefois, l'opinion générale est que la plupart des souches de *Lactobacillus* ont un point isoélectrique généralement compris entre 3 et 4,5 (Pelletier *et al.*, 1997; Schär-Zammaretti and Ubbink, 2003), même s'il peut être dans certains cas inférieur à 2 (Deepika *et al.*, 2009).

e. Adhérence aux cellules épithéliales et à la muqueuse

L'adhérence bactérienne à l'hôte est l'étape initiale de la colonisation. L'adhérence des bactéries aux surfaces est déterminée par l'interaction de différentes propriétés physico-chimiques des surfaces cellulaires, notamment l'hydrophobie et la charge de la surface cellulaire, deux conséquences de la composition chimique des surfaces cellulaires. Il est généralement admis que les caractéristiques probiotiques des lactobacilles associées à l'interaction entre l'hôte

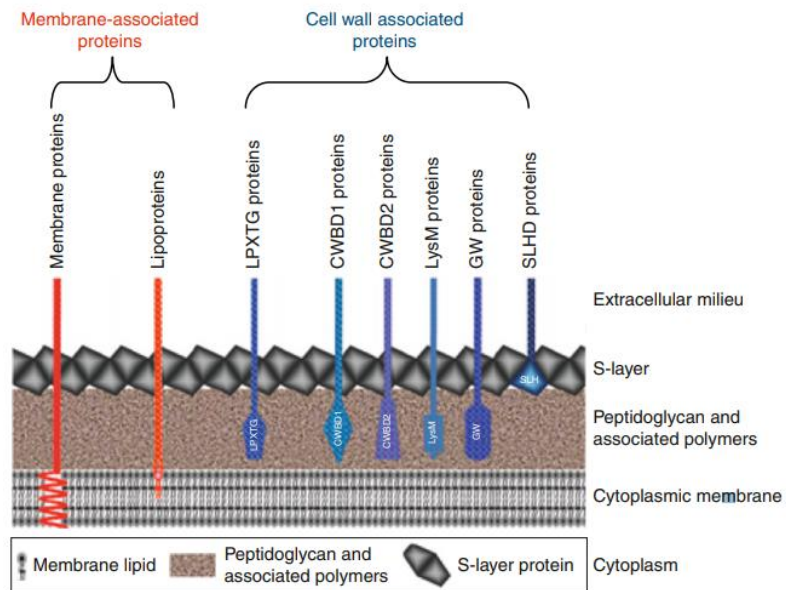


Figure 19 : Représentation schématique des différents types de protéines retrouvées chez les bactéries à Gram-positif (Desvaux *et al.*, 2006)

et les *Lactobacillus* sont médiées par des molécules tensioactives de surface (Lebeer *et al.*, 2010). Les molécules tensioactives de surface des lactobacilles qui ont été rapportées comme étant bénéfiques des actions probiotiques sont le peptidoglycane, les polysaccharides bactériens, les BS et les acides téichoïques (Hajfarajollah *et al.*, 2018). Les molécules qui sont partagées par tous les lactobacilles comprennent l'acide lipotéichoïque, les polysaccharides, les protéines associées aux couches S, les protéines de liaison à la mucine et les protéines de liaison à la fibronectine (Sanders *et al.*, 2018). Ces molécules tensioactives de surface régissent les interactions hôte-microorganisme lors de l'adhérence des lactobacilles. Il a été démontré que ces molécules sont les médiateurs des réponses physiologiques de l'hôte directement *via* l'adhérence directe aux cellules épithéliales et aux récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires de la muqueuse (Sanders *et al.*, 2018). En outre, des facteurs spécifiques de reconnaissance de ligands, comme l'activité de liaison aux protéines de la couche S, peuvent être décrits à l'échelle microscopique comme des interactions hydrophobes et électrostatiques. L'adhérence des bactéries au niveau des surfaces cellulaires implique initialement des liaisons non spécifiques telles que les interactions hydrophobes (Pawat *et al.*, 2015), suivie par des interactions spécifiques entre les composants bactériens de surface, tels que les acides lipoteichoïques, les protéines des couches S et les récepteurs sur les cellules épithéliales de l'hôte (Zhang *et al.*, 2013). La compétition par l'adhérence des lactobacilles peut jouer un rôle dans la dominance des lactobacilles et la résistance à la colonisation vaginale *in vivo*. Plusieurs études, *in vitro*, montrent que les lactobacilles peuvent prévenir/inhiber l'adhérence d'autres espèces bactériennes. La couche S protéique extracellulaire de *L. crispatus*, bien conservée chez la plupart des autres espèces du groupe *L. acidophilus* (Boot *et al.*, 1996), peut inhiber l'adhérence d'*E. coli* O157:H7 aux cellules HeLa (Kalyoussef *et al.*, 2012). Les principales protéines exposées en surface chez de nombreuses espèces bactériennes, y compris les lactobacilles, sont les protéines de la couche S. Il a été démontré que les couches S de *Lactobacillus* sp. interagissent avec les récepteurs des cellules épithéliales de l'hôte. Ainsi, elles bloquent les sites récepteurs exposés à la surface des muqueuses et empêchent l'adhérence des espèces pathogènes (van der Mei *et al.*, 2003).

i. Adhésines

Chez les lactobacilles, l'étape d'adhérence est liée à la production d'adhésines qui sont classées en 2 groupes, les adhésines associées à la paroi contenant un motif d'ancrage au peptidoglycane LPxTG ainsi que celles associées à la membrane et les adhésines qualifiées de «moonlighting proteins» (Desvaux *et al.*, 2006) (Figure 19).

Les protéines qui contiennent un motif d'ancrage de type LPxTG portent généralement au moins une séquence signal de sécrétion de type YSIK, deux domaines répétitifs Rib/alpha et des domaines de liaison au mucus (MucBP). Par exemple, la protéine Lsp participe à l'adhérence de *L. reuteri*, à l'épithélium de l'estomac stratifié chez la souris (Walter *et al.*, 2005). Récemment, un facteur de liaison à la muqueuse de la souche probiotique *L. rhamnosus* GG a été caractérisé. Cette molécule contient également un motif signal de sécrétion N-terminal, quatre motifs MucBP et un domaine d'ancrage C-terminal à la paroi (von Ossowski *et al.*, 2011). Chez *L. crispatus* une adhésine se liant aux cellules épithéliales du vagin humain, a été nommée Lea pour « *Lactobacillus* epithelial adhesin ». L'expression de cette adhésine est spécifique aux souches de *L. crispatus* et régule directement la capacité d'adhérence bactérienne *in vitro*. La séquence partielle du gène *lea* indique que la protéine porte une séquence signal YSIK N-terminale et un motif d'ancrage LPxTG C-terminal, ainsi qu'une région hautement répétitive de 82 acides aminés. L'adhérence épithéliale sur les cellules médiées par l'adhésine peut améliorer la colonisation bactérienne dans l'environnement vaginal humain (Edelman *et al.*, 2012). Une adhésine sortase-dépendante de *Lactobacillus* est la protéine Msa, identifiée chez *L. plantarum*. Cette protéine est plus petite (1010 acides aminés) et se lie au mucus *via* un domaine de liaison spécifique au mannose (Pretzer *et al.*, 2005).

Des exopolysaccharides et des protéines multifonctionnelles, qualifiées de « moonlighting proteins », sont localisées à la surface bactérienne (Huberts and van der Klei, 2010), mais sont également retrouvées au niveau cytoplasmique où elles exercent d'autres fonctions. L'adhérence de *L. crispatus* peut également impliquer ces « Moonlighting proteins », telles que la glutamine synthétase, la glucose-6-phosphate isomérase, l'énolase et la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, qui sont liées à la surface bactérienne à un pH acide (Kainulainen *et al.*, 2012). Chez *L. crispatus*, on trouve ainsi dans cette catégorie essentiellement des enzymes, dont une dizaine ont été identifiées telles que les fructose-bisphosphate aldolases I et II (Aldo I et II), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) et l'énolase. Si l'Aldo I est très diminuée dans le contexte de la vaginose, la GAPDH et l'énolase sont elles aussi retrouvées à des taux plus faibles (Lepargneur and Abbal, 2012). Ces protéines multifonctionnelles, en particulier la glutamine synthétase et la glucose-6-phosphate isomérase, sont libérées par *L. crispatus* en situation de stress telle qu'une forte augmentation du pH ou en présence de la cathélicidine LL-37 qui est un peptide antimicrobien produit par les cellules humaines (Kainulainen *et al.*, 2012). La protéine CbsA de la couche S de *L. crispatus* a également été décrite comme pouvant se lier au collagène (Sillanpää *et al.*, 2000). *L. crispatus* est également capable de se fixer à la

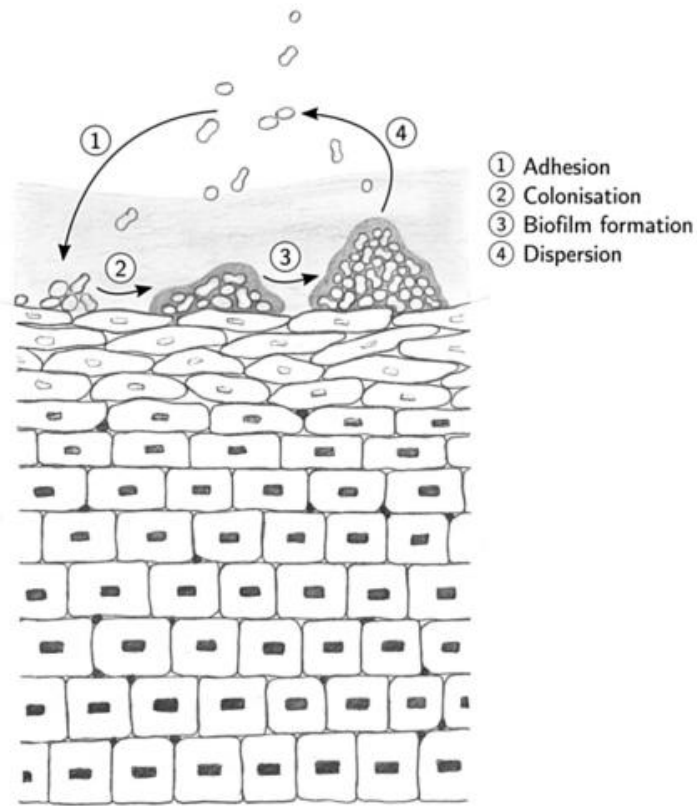


Figure 20 : Représentation des 5 étapes de la formation d'un biofilm sur une surface épithéliale vaginale d'après Hardy *et al.*, 2017

fibronectine, au collagène et à la laminine humaine *via* l' α -énolase (Deepika and Charalampopoulos, 2010).

f. Formation de biofilms

Les bactéries peuvent se trouver majoritairement sous deux formes, soit planctonique flottant librement, soit sessiles et associées au substrat ou les unes avec les autres sous forme de biofilm ou d'agrégats, respectivement. La formation et le développement d'un biofilm sont influencés par de multiples facteurs, notamment la souche, les propriétés de la surface colonisée et les paramètres environnementaux tels que le pH, la concentration en nutriments et la température (Salas-Jara *et al.*, 2016).

i. Biofilms

Cinq étapes sont nécessaires à la formation d'un biofilm. (i) attachement initial ; (ii) attachement irréversible ; (iii) formation de microcolonies ; (iv) maturation ; et (v) dispersion (Figure 20). Dans la première étape, l'adhérence de la cellule dépend fortement des propriétés physico-chimiques de la surface des cellules bactériennes. À ce stade, l'adhérence est réversible puisque les micro-organismes attachés ne sont pas encore engagés dans le processus de différenciation qui nécessite une série de changements morphologiques et métaboliques conduisant à la formation d'un biofilm. De nombreuses cellules peuvent se détacher et revenir au mode de vie planctonique (Terraf *et al.*, 2012). L'adhérence à la surface dépend également des propriétés physico-chimiques de la surface telles que la texture (rugueuse ou lisse), l'hydrophobicité, le pH et la température (Donlan and Costerton, 2002). Dans la deuxième étape, le passage de l'attachement réversible à l'attachement irréversible implique de passer d'une faible interaction des bactéries avec la surface à une liaison plus forte notamment par l'implication d'exopolysaccharides (Stoodley *et al.*, 2002). La troisième étape est caractérisée par l'agrégation des cellules en microcolonies résultant de l'accumulation et de la croissance simultanées de microorganismes et correspond au stade principal pendant lequel les exopolysaccharides sont produits. Ils contribuent à renforcer le lien entre les bactéries et le substrat et stabilisent la colonie contre les stress environnementaux. Lorsque les bactéries forment des microcolonies, elles peuvent bénéficier d'un échange de substrat entre espèces et/ou d'un produit final. Dans la quatrième étape, le biofilm arrive à maturité et se développe en une structure organisée tridimensionnelle (Salas-Jara *et al.*, 2016). Enfin, au cours de la cinquième étape, les cellules du biofilm se détachent et reviennent transitoirement à une forme planctonique (Terraf *et al.*, 2012).

Des fragments de biofilms peuvent aussi directement se disperser. Le détachement est un processus actif permettant la colonisation de nouvelles niches (Sauer *et al.*, 2002).

Les micro-organismes inclus dans le biofilm ont un comportement différent de celui des micro-organismes planctoniques. Ils sont plus résistants aux traitements conventionnels par les antibiotiques et sont capables d'échapper plus facilement au système immunitaire de l'hôte. La formation d'un biofilm par des bactéries probiotiques, telles que *Lactobacillus* spp. est considérée comme une propriété bénéfique car cela pourrait favoriser la colonisation et une plus longue permanence dans la muqueuse de l'hôte et également éviter la colonisation par des bactéries pathogènes (Salas-Jara *et al.*, 2016). La capacité des lactobacilles à former des biofilms sur les surfaces abiotiques (verre ou polystyrène) a été étudiée au cours des dernières années, et les résultats indiquent que seules certaines souches ont cette propriété. Il a également été démontré que l'EPS produit par certaines souches formant des biofilms est capable d'inhiber la formation de biofilms par certaines bactéries pathogènes (Hardy *et al.*, 2017). La constitution de biofilms à la surface des cellules épithéliales forme une barrière limitant l'adhérence des germes pathogènes. En effet, la capacité des lactobacilles à adhérer de façon spécifique à la fibronectine renforce l'efficacité du biofilm, et permet, par compétition, de limiter l'adhérence d'autres germes aux tissus vaginaux (Lepargneur and Rousseau, 2002).

Les biofilms formés par les lactobacilles et en particulier ceux de *L. crispatus* sont très peu décrits dans la littérature contrairement à *L. rhamnosus* GG (ATCC 53103) qui est l'un des probiotiques les mieux étudiés. Cette souche est capable d'adhérer à la muqueuse intestinale humaine et de persister pendant plus d'une semaine après avoir été ingéré oralement par des adultes en bonne santé (Alander *et al.*, 1999). Elle est également capable de former des biofilms *in vitro* sur une surface abiotique (polystyrène), une caractéristique fortement influencée par la culture, le milieu utilisé et les conditions associées à l'environnement telles que le pH faible, l'osmolarité, la présence de bile ou de mucine. *L. crispatus* est capable, par exemple, de former des biofilms lorsqu'il est cultivé dans le milieu MRS sans glucose alors que la présence de mucine augmente de 20 % sa capacité à former un biofilm. En revanche, un pH faible diminue sa capacité à former un biofilm (Lebeer *et al.*, 2007b). Une autre espèce de *Lactobacillus* largement étudiée pour sa capacité à former des biofilms est *L. plantarum*. Kubota *et al.* (2008) ont étudié la capacité de trois souches à former des biofilms, dont *L. plantarum* subsp. *plantarum* JCM1149 (Kubota *et al.*, 2008). Ils ont montré que ce lactobacille est capable de former des biofilms dans le milieu de culture MRS sur une surface en verre et que sous cette forme il est plus résistant à l'acide acétique et à l'éthanol que les bactéries planctoniques.

ii. Auto-agrégation et co-agrégation

Le terme d'auto-agrégation est employé pour l'agrégation des microorganismes de la même souche, alors que la co-agrégation est utilisée pour différentes souches bactériennes ou différents microorganismes. L'anti-adhérence des probiotiques contre les pathogènes à la muqueuse de l'hôte peut être réalisée soit en formant une barrière par auto-agrégation de la souche elle-même, soit par co-agrégation directe avec les souches pathogènes. La co-agrégation avec les germes pathogènes permet d'empêcher ces derniers d'accéder et d'adhérer aux tissus de l'hôte. De plus, l'adhérence aux cellules épithéliales, l'auto-agrégation et la co-agrégation sont des phénomènes qui contribuent à la formation et à la stabilité des biofilms sur la muqueuse. L'auto-agrégation et la co-agrégation sont impliquées dans la colonisation microbienne du tractus urogénital.

Une souche phénotypique positive pour l'auto-agrégation, *L. crispatus* M247, a été isolée à partir d'échantillons fécaux de nouveau-nés. Un mutant spontané isogénique ne formant pas d'agrégats, Mu5, a été isolé. Il a été montré que la souche sauvage M247 (phénotype d'agrégation) pouvait coloniser le tractus intestinal alors que le mutant Mu5 en était incapable, suggérant un rôle de l'agrégation dans la colonisation de *Lactobacillus* dans le tractus intestinal (Cesena *et al.*, 2001). Il a également été démontré que ce phénotype d'auto-agrégation est important dans le processus de stimulation du système immunitaire dans la muqueuse intestinale des modèles murins, colonisée par *L. crispatus* M247, via la modulation des TLR2 et 4 et la production de cytokines pro-inflammatoires (Voltan *et al.*, 2007).

De nombreux auteurs ont rapporté que les capacités de co-agrégation des espèces de lactobacilles pourraient leur permettre de former une barrière qui empêche la colonisation par des bactéries pathogènes (Marcotte *et al.*, 2004). Ils ont constaté que les lactobacilles intestinaux et vaginaux co-agrégeaient avec *E. coli* ou *Candida* spp. (Jin *et al.*, 2007). L'agrégation cellulaire semble impliquer l'interaction de composants de surface cellulaire tels que l'acide lipotéichoïque, les protéines et les glucides ainsi que les protéines solubles (Reniero *et al.*, 1992). Des études sur le mécanisme d'auto-agrégation chez les lactobacilles ont montré que les protéines présentes dans le surnageant de culture et les protéines ou lipoprotéines situées à la surface cellulaire sont impliquées dans l'agrégation cellulaire. En outre, il a été observé que les surnageants de culture des lactobacilles auto-agrégés peuvent médier non seulement l'agrégation des cellules de la souche productrice mais également l'agrégation d'autres bactéries lactiques et même celle de *E. coli* (Kmet and Lucchini, 1997; Marcotte *et al.*, 2004).

g. *L. crispatus* et immunité vaginale

La muqueuse vaginale a une fonction dans les réponses immunitaires locales contre les agents pathogènes qui peuvent être favorisées par *L. crispatus*. Butler *et al.*, (2016) ont évalué, *in vitro*, les rôles protecteurs et anti-inflammatoires de la souche probiotique CTV-05 de *L. crispatus* (Butler *et al.*, 2016). La souche CTV-05 ne présentait aucune cytotoxicité pour les cellules épithéliales vaginales par rapport aux témoins non infectés et offrait une protection significative contre l'infection par un uropathogène tel qu'*E. coli*. De plus, *L. crispatus* CTV-05 n'induit pas de réponse pro-inflammatoire *in vitro*, ni d'augmentation de la production d'IL-1 β ou d'IL-6. Cela a permis d'établir le potentiel de la souche CTV-05 de *L. crispatus* dans le cadre d'un traitement probiotique pour réduire le risque d'infections urinaires récurrentes. Les communautés microbiennes vaginales dans lesquelles *L. crispatus* est abondant contribuent probablement à limiter la présence de *E. coli* dans les sécrétions vaginales (Ghartey *et al.*, 2014). *L. crispatus* peut atténuer la virulence de *C. albicans*, moduler la sécrétion de cytokines et de chimiokines et améliorer la réponse immunitaire *in vitro* des cellules épithéliales vaginales VK2 / E6E7 (Niu *et al.*, 2017).

La colonisation du tractus génital inférieur par *L. crispatus* et d'autres *Lactobacillus* spp. entraîne également de faibles niveaux d'activation des cellules épithéliales vaginales. De multiples études épidémiologiques ont démontré que les femmes ayant un microbiote vaginal dominé par *L. crispatus* présentent de faibles niveaux de cytokines pro-inflammatoires dans leurs sécrétions vaginales (IL-1 α , IL-1 β et chimiokines dont IL-8 et les protéines inductibles par l'interféron gamma (IP-10) et de protéines inflammatoires des macrophages (MIP) -3 α) (Masson *et al.*, 2019). Dans une étude transversale portant sur le rôle du microbiote vaginal dans la carcinogenèse génitale, les femmes avec un microbiote vaginal à dominance lactobacille ont montré moins de preuves d'inflammation génitale mesurée par les scores inflammatoires génitaux (par exemple, des niveaux élevés d'IL-1 α , IL-1 β , IL-8, MIP-1 β , MIP-3 α , TNF α) en comparaison aux femmes ayant un microbiote vaginal non-*Lactobacillus*-dominant (Łaniewski *et al.*, 2019).

Il est intéressant de noter que la colonisation par *L. iners* ne fournit pas la même quiescence immunitaire au niveau de la muqueuse que *L. crispatus*. Deux études indépendantes ont montré que la dominance de *L. iners* est associée à des niveaux élevés de chimiokines, y compris IP-10, MIP-3 α et d'autres molécules pro-inflammatoires, ce qui peut entraîner un recrutement muqueux des cellules CD4⁺ et un risque accru de VIH (Joag *et al.*, 2019).

Des études *in vitro*, utilisant des modèles tridimensionnel organotypiques de cellules épithéliales de l'appareil reproducteur féminin, ont validé ces résultats épidémiologiques et ont montré que *L. crispatus* ne modifie pas de manière significative les niveaux de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α), des chimiokines (IL-8, MIP-3 α) ou des peptides antimicrobiens (β -défensine (hBD)-2 et SLPI), entraînant une faible activation des cellules épithéliales (Gardner *et al.*, 2019). D'autres auteurs ont démontré que *L. crispatus* ne modifie pas de manière significative les niveaux d'IL-8, ou de SLPI dans les cultures monocouches des cellules épithéliales vaginales (Fichorova *et al.*, 2011). En outre, les métabolites produits par les lactobacilles peuvent moduler les réponses des cellules épithéliales et stimuler la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, y compris l'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (IL-1Ra), et la production a faible niveau de peptides antimicrobiens (par exemple hBD-1, SLPI), résultant en une homéostasie de la muqueuse (Muzny *et al.*, 2020).

IV. Endocrinologie microbienne

1. Concept et historique

En 1901, une nouvelle ère est née en physiologie humaine avec la première purification d'une hormone, l'adrénaline, par J. Jakamine et l'émergence de l'endocrinologie. Dès lors, l'adrénaline fut utilisée à des fins cliniques pour le traitement de chocs anaphylactiques, réactions allergiques et arrêt cardiovasculaires (Yamashima, 2003). Dans les années 30, on nota une augmentation des infections dues aux proliférations bactériennes à la suite de traitement par l'adrénaline. Les explications de l'époque laissèrent penser que ces proliférations bactériennes survenues à la suite d'administration d'adrénaline étaient les conséquences de l'effet de l'hormone sur l'hôte en raison de son action inhibitrice sur la réponse immunitaire voire de son effet vasoconstricteur qui faciliterait la prolifération des micro-organismes (Renaud & Miget, 1930; Cooper, 1946; Evans *et al.*, 1948). À l'époque, personne n'envisageait qu'une hormone puisse agir directement sur la physiologie bactérienne. Les premières évidences de ces interactions hôtes-microorganismes, notamment concernant les pathogènes, remontent à plusieurs décennies. En effet, c'est en 1930 que Renaud et Miget ont rapporté le premier cas d'une personne ayant contracté un sepsis associé à la présence d'épinéphrine (adrénaline) et d'une infection à *Clostridium perfringens* (Renaud & Miget, 1930). Un cas similaire a également été décrit par Cooper en 1946 (Cooper, 1946) suivi, quelques années plus tard, par des essais visant à comprendre le rôle de cette hormone sur l'établissement d'une infection bactérienne (Evans *et al.*, 1948). Pour cela, des cultures ont été administrées en présence d'épinéphrine ou d'eau physiologique (témoin) à des

cochons d'Inde. Les résultats de cette étude ont montré que la prolifération bactérienne était bien plus importante en présence d'épinéphrine, comparée au témoin. Ce n'est qu'en 1991 que Lyte et Ernst ont décidé d'évaluer l'effet des catécholamines sur la croissance des bactéries (Lyte and Ernst, 1992). Ils ont mis en évidence pour la première fois que les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) pouvaient agir directement sur la croissance des bactéries à Gram-négatif. Quelques années plus tard, l'étude a été étendue à d'autres bactéries dont *Klebsiella pneumoniae* et certaines bactéries à Gram-positif comme *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* ou encore *S. aureus*. Faisant suite à ces travaux, un nouveau domaine a vu le jour, celui de l'endocrinologie microbienne, qui étudie l'influence des molécules sécrétées par le corps humain sur les bactéries. Aujourd'hui, cette discipline contribue à mieux comprendre les facteurs à l'origine de la pathogénèse des maladies infectieuses (Lyte, 2004).

L'endocrinologie est la science qui étudie les hormones. Son nom signifie : l'étude (logos) de la sécrétion (crine) interne (endo). L'endocrinologie microbienne est un domaine de recherche reconnu qui est basé sur l'idée selon laquelle, en raison de leur origine commune et de leur co-évolution avec les eucaryotes métazoaires (plantes et animaux), les micro-organismes ont préservé ou développé des systèmes senseurs leur permettant de détecter des hormones et neurohormones exprimées par l'hôte. Ces senseurs sont susceptibles de permettre à la bactérie de reconnaître qu'elle est au contact d'un hôte approprié, soit pour les bactéries commensales qu'elles puissent initier l'expression de gènes impliqués dans la colonisation de l'hôte, soit dans le cas de pathogènes qu'elles puissent exprimer les gènes codant pour des facteurs de virulence. Même si l'endocrinologie microbienne s'est beaucoup développée ces dernières années, peu d'études concernant les hormones stéroïdiennes ont été réalisées. Alors que les effets des hormones peptidiques et des neurotransmetteurs classiques ont été particulièrement étudiés (Lesouhaitier *et al.*, 2009, 2019), notre connaissance de l'impact des hormones stéroïdiennes sur les bactéries est beaucoup plus limitée.

2. Effets des hormones stéroïdiennes chez les bactéries

En 2013, Beury-Cirou *et al.*, ont mis en évidence que des hormones sexuelles humaines diminuaient l'accumulation de molécules de communication, les N-acylhomoserine lactones chez le pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*, ainsi que l'expression de gènes impliqués dans la régulation du quorum sensing (Beury-Cirou *et al.*, 2013). L'estradiol interfère avec la virulence de *P. aeruginosa* par inhibition de la communication bactérienne (Tyrrell and Harvey, 2020).

La présence d'estradiol conduit à une augmentation de la production d'alginate (un exopolysaccharide important dans la formation de biofilms) chez une souche de *P. aeruginosa*, isolée d'une patiente atteinte de mucoviscidose (Chotirmall *et al.*, 2012). De plus, l'estradiol semble moduler l'expression de facteurs de virulence en inhibant la communication entre des bactéries phytopathogènes (*Agrobacterium tumefaciens*, Beury-Cirou *et al.*, 2013). La progestérone peut, au contraire, inhiber la croissance de *Neisseria gonorrhoeae* et *N. meningitidis*, bactéries pathogènes responsables de méningites. La progestérone peut être bactéricide ou bactériostatique envers *N. gonorrhoeae*, selon sa concentration (Morse and Fitzgerald, 1974). L'estradiol à 30 et 90 nM module la croissance en condition planctonique de 3 espèces de *Prevotella* responsables de gingivites pendant la grossesse, la co-agrégation avec d'autres bactéries (*Fusobacterium spp.*), la production de polysaccharides et la formation de biofilms (Fteita *et al.*, 2014). Un effet de l'estradiol sur la croissance et la formation de biofilms de souches cliniques de *S. epidermidis* et la formation d'un biofilm a également été rapporté (Wang *et al.*, 2016). Néanmoins, à notre connaissance, les effets de l'estradiol sur les lactobacilles n'ont pas été étudiés précisément jusqu'à présent.

3. Importance de l'endocrinologie microbienne et espoirs thérapeutiques

Comprendre les mécanismes par lesquels les hormones peuvent moduler la virulence, la communication bactérienne ou encore l'implantation et la colonisation des bactéries dans un environnement permettrait d'anticiper les conséquences de ces modulations dans les microbiotes. L'identification de senseurs impliqués dans ces processus ouvre de nouveaux champs de recherche. La caractérisation des domaines de liaison de ces senseurs bactériens, le déchiffrement des signaux, les réseaux de transduction associés à leur activation représentent également un défi important afin de développer des thérapies pour contrer la propagation d'un pathogène ou au contraire, favoriser durablement l'implantation d'une espèce bénéfique chez l'hôte.

Concepts et objectifs de la thèse

I. Le projet GYNCEUTICS

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du contrat GYNCEUTICS financé par le Fond Unique Inter-Ministériel (FUI, AAP N°23), et pour le Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (LMSM EA 4312), la Région Normandie et l'Union Européenne (FEDER). Ce projet a été labélisé et soutenu par les pôles de compétitivité « COSMETIC VALLEY » et « CANCERBIOSANTE ».

GYNCEUTICS vise à identifier de « Nouveaux produits pour l'amélioration de l'homéostasie de la microflore féminine ».

Les affections et troubles gynécologiques sont courants et leur fréquence augmente avec l'âge. Chaque année dans le monde, près d'un milliard de femmes souffrent d'un déséquilibre de la microflore vaginale entraînant des infections génitales. Ainsi, au cours de leur vie, la majorité des femmes seront concernées par une ou plusieurs problématiques gynécologiques. Des périodes comme la grossesse, l'accouchement, l'allaitement, la ménopause ou les suites de traitements oncologiques impliquent des besoins médicaux ciblés. Les désagréments intimes qui découlent de ces variations représentent une réelle sensation d'inconfort quotidien. La sécheresse intime, une des problématiques les plus courantes, provoque des brûlures, des irritations et des douleurs pendant les rapports sexuels. Au-delà de la simple gêne physique, cet inconfort impacte toute la sphère intime des femmes. Si ces désagréments représentent une cause fréquente de consultation, il n'existe aujourd'hui aucune prise en charge satisfaisante et durable pour y remédier. De nombreuses solutions ont été proposées (probiotiques, anti-inflammatoires, lubrifiant) mais aucune ne permet de traiter le déséquilibre sur le long terme et certaines présentent parfois de sérieux risques (traitements hormonaux). Les produits actuellement disponibles ciblent une approche purement symptomatique, et ne correspondent pas aux besoins réels des consommatrices.

GYNCEUTICS ambitionne de développer une gamme de produits permettant le rétablissement durable d'une microflore intime saine sans affecter l'équilibre endocrinien et ce même en cas de carence hormonale.

Le marché prioritairement visé par les résultats du projet GYNCEUTICS est le marché du confort et bien-être féminin et plus particulièrement le marché des produits destinés à la zone intime (segments « bien-être intime, lubrifiants », et « probiotiques, flore intime ») en France et à

l'international, notamment en Asie. Aujourd'hui, ce marché est en pleine expansion. De plus, à ce jour, l'offre reste limitée et aucun produit développé n'a d'effet sur le bien-être intime des consommatrices.

Cinq partenaires font parti de ce projet :

- la SARL GIMOPHARM pour la partie formulation et la production des premiers lots industriels,
- la société SEQENS pour la recherche, l'extraction de principes actifs,
- le Laboratoire BIO-EC pour les prélèvements biologiques
- et la SAS REMEDIALS pour la mise sur le marché du produit final auprès de son réseau de clients distributeurs français et internationaux spécialisés en dermo-cosmétiques, produits pharmaceutiques ou matériel médical et les drugstores.
- le Centre de Biologie Moléculaire (CBM) CNRS UPR 4301, en particulier l'équipe de biologie cellulaire, cibles moléculaires et thérapies innovantes dirigée par le Pr. Chantal Pichon.
- le Laboratoire de Microbiologie, Signaux et Microenvironnement (LMSM EA 4312) dans le cadre duquel a été réalisée ma thèse, a développé une stratégie de recherches dans le domaine de la microbiologie cellulaire basée sur une étude approfondie du dialogue entre les bactéries et les cellules eucaryotes et dans le domaine de l'endocrinologie microbienne.

II. Objectifs de la thèse

L'objectif de ma thèse était de définir l'effet de l'estradiol sur les lactobacilles et de sélectionner des molécules analogues de l'estradiol, capables d'interférer dans le dialogue moléculaire entre le tissu vaginal et les bactéries en favorisant le maintien des *Lactobacillus* spp. Ainsi, il serait possible de concevoir des dispositifs médicaux et produits cosmétiques capables de préserver une microflore Lactobacillaire saine. Le maintien de cette flore représente à la fois une réelle barrière biologique face au risque microbien pathogène, et permet de prévenir les problématiques d'irritation, d'inflammation et de sécheresse intime.

La stratégie mise en œuvre dans ce projet est intimement liée à une connaissance précise de la flore microbienne vaginale, et ce, pendant les dérèglements qui surviennent tout au long de la vie, en particulier suivant le contexte hormonal de l'hôte. Dans la littérature, il est classiquement admis que la proportion en lactobacilles est la plus abondante dans les conditions

normales chez les femmes en âge de procréer. Cette microflore lactobacillaire est généralement dominée par *L. crispatus*. De plus, cette espèce semble être à l'origine de plusieurs formes de protection des muqueuses *via* une multitude de mécanismes et de comportements qui peuvent différer selon la souche bactérienne. En effet, la relation entre le contexte hormonal de l'hôte et la modulation de la proportion en lactobacilles de la microflore vaginale n'est pas totalement comprise, et les hormones peuvent être détectées et moduler la physiologie de plusieurs espèces bactériennes. *L. crispatus* étant l'espèce dominante quand les taux d'œstrogènes circulant sont les plus hauts, l'objectif de cette thèse a donc été de savoir si les œstrogènes sont capables de moduler la physiologie de *L. crispatus*, et d'en déterminer les effets et les mécanismes impliqués.

Une collecte des micro-organismes présents naturellement au niveau vaginal a donc été réalisée. Les souches bactériennes obtenues ont été identifiées à l'aide de techniques de biologie moléculaire (séquençage des génomes et de l'ARN 16S), et de protéomique (MALDI-TOF/TOF, *via* l'utilisation du logiciel Biotyper®).

Une souche provenant d'un prélèvement vaginal chez une femme non ménopausée et appartenant à l'espèce *L. crispatus* a été sectionnée et nommée V4. Afin de disposer d'une souche de référence et d'appréhender les différences phénotypiques que peuvent présenter les lactobacilles, une souche de *L. crispatus* CIP 104459 a été commandée auprès de la Collection de l'Institut Pasteur.

La caractérisation de ces deux souches de *L. crispatus* a été réalisée d'un point de vue génétique et physiologique. Nous avons recherché les effets du 17 β -estradiol sur ces 2 souches en termes de croissance, propriétés physico-chimiques de surface, fluidité membranaire, capacité à s'auto-agrégier, production de biosurfactants, formation de biofilms et capacité à adhérer sur des cellules épithéliales vaginales. Nous avons également tenté de décrypter les mécanismes mis en jeu par une analyse comparative entre les deux génomes et une étude du protéome total exprimé en présence de l'hormone. Parallèlement, une étude *in silico* basée sur la structure des récepteurs de l'estradiol connus chez les eucaryotes et le génome de *L. crispatus* V4 a été réalisée et complétée par une approche de docking moléculaire. Ce travail a permis d'identifier un senseur putatif pour le 17 β -estradiol chez *L. crispatus* V4.

Dans ce manuscrit, les résultats s'articulent selon 2 chapitres :

Le chapitre 1 présente les travaux réalisés sur *L. crispatus* CIP104459, incluant l'analyse de son génome séquencé (*Microbiology Resource Announcement* 2020;9(2):e01373-19. doi:10.1128/MRA.01373-19), les effets d'un traitement par le 17 β -estradiol et la découverte d'un senseur putatif (Clabaut M, Suet A, Racine PJ, Tahrioui A, Verdon J, Barreau M, Maillot O, Le Tirant A, Karsybayeva M, Kremser C, Redziniak G, Duclairoir-Poc C, Pichon C, Chevalier S, Feuilloley MGJ. Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain. *Sci Rep.* 2021 Mar 30;11(1):7133. doi: 10.1038/s41598-021-86628-x. PMID: 33785829; PMCID: PMC8010061.).

Le chapitre 2 présente les travaux réalisés sur *L. cristapus* V4, incluant l'analyse de son génome séquencé (*Microbiology Resource Announcement* 2019;8(38):e00856-19. doi:10.1128/MRA.00856-19), et les effets d'un traitement par le 17 β -estradiol (Manuscrit rédigé sous la forme d'un article pour soumission dans *Scientific Reports*).

Le manuscrit de thèse se termine par une discussion, une conclusion générale et les perspectives qui en découlent.

Résultats

Article 1**Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, Isolated from a Vaginal Swab**

L. crispatus CIP 104459 a été isolée le 1er janvier 1955 à partir d'un frottis vaginal humain dans la maternité de l'hôpital de la Croix-Rousse (Lyon, France). Cette souche a été obtenue à partir de la collection de l'Institut Pasteur (catalogue de la biobanque de micro-organismes du CRBIP) à Paris, France. Cet article correspond au séquençage de cette souche et à son analyse globale. Le génome rapporté est constitué de 1 993 673 pb, avec une teneur en G+C de 36,8 % et 2 024 séquences prédites codantes pour des protéines.

Clabaut M, Boukerb AM, Racine PJ, Pichon C, Kremser C, Picot JP, Karsybayeva M, Redziniak G, Chevalier S, Feuilloy MGJ. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, Isolated from a Vaginal Swab. *Microbiol Resour Announc*. 2020 Jan 9;9(2):e01373-19. doi: 10.1128/MRA.01373-19. PMID: 31919178; PMCID: PMC6952664.



Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, Isolated from a Vaginal Swab

Maximilien Clabaut,^a  Amine M. Boukerb,^a Pierre-Jean Racine,^a Chantal Pichon,^b Coralie Kremser,^c Jean-Pierre Picot,^d Madina Karsybayeva,^e Gérard Redziniak,^f Sylvie Chevalier,^a  Marc G. J. Feuilloley^a

^aLaboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LSM), EA4312, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Évreux, France

^bCentre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

^cGimoPharm, Longjumeau, France

^dSeqens, Limoges, France

^eRemedials Laboratoire, Paris, France

^fCosmetic Inventions, Antony, France

Maximilien Clabaut and Amine M. Boukerb contributed equally to this work. Author order was determined by the order of involvement in experimental study and project management.

ABSTRACT We report the draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, isolated from a human vaginal swab. This draft genome consists of 1,993,673 bp, with 36.8% G+C content and 2,024 predicted protein-encoding sequences.

Lactobacilli are the predominant vaginal microbiota found in healthy women of reproductive age. Several studies have revealed that vaginal disorders and dysbiosis are closely related to lactobacillus decrease and pathogen increase (1). *Lactobacillus crispatus* is one of the dominant species in the normal vaginal environment and plays an important role in preventing infections such as bacterial vaginosis (BV) and in modulating inflammation (2). *L. crispatus* is a producer of lactic acid, hydrogen peroxide, and other antimicrobial compounds that inhibit the growth (3), hyphae, and biofilm formation of *Candida albicans* (4) and reduce the cytotoxicity of *Gardnerella vaginalis* (5) and the infectivity of *Chlamydia trachomatis* (6). *L. crispatus* seems to possess additional protective mechanisms against BV and contributes to the maintenance of the normal vaginal microbiota (2).

L. crispatus CIP 104459 was isolated on 1 January 1955 from a human vaginal swab in the maternity ward of La Croix-Rousse Hospital (Lyon, France). This strain was obtained from the Collection of Institut Pasteur (CRBIP—microorganism biobank catalogue) in Paris, France. The bacterial isolate was grown anaerobically onto de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium agar plates (ISO, VWR reference 84607.0500) overnight at 37°C under static conditions. The purified bacterial isolate was obtained by single-colony isolation, which was later maintained at –80°C using MRS medium supplemented with 20% glycerol.

In a first step, *L. crispatus* strain CIP 104459 was identified by total proteome analysis (data not shown). Subsequently, 16S rRNA gene sequencing was performed, and the blast algorithm allowed sequence comparison with other *L. crispatus* strains reported in the NCBI 16S RefSeq database. Since the 16S rRNA gene sequence of strain CIP 104459 displayed 100% sequence identity with those of *L. crispatus* strains V4, CO3MRS11, and AB70 (GenBank accession numbers [SRLG00000000](#), [CP033426](#), and [CP026503](#), respectively), CIP 104459 was identified as belonging to the species *L. crispatus*.

Genomic DNA was extracted from *L. crispatus* CIP 104459 grown in MRS broth for 24 h using a GeneJET genomic extraction kit, as per the manufacturer's instructions

Citation Clabaut M, Boukerb AM, Racine P-J, Pichon C, Kremser C, Picot J-P, Karsybayeva M, Redziniak G, Chevalier S, Feuilloley MGJ. 2020. Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, isolated from a vaginal swab. *Microbiol Resour Announc* 9:e01373-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01373-19>.

Editor Vincent Bruno, University of Maryland School of Medicine

Copyright © 2020 Clabaut et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](#).

Address correspondence to Marc G. J. Feuilloley, marc.feuilleley@univ-rouen.fr.

Received 18 November 2019

Accepted 6 December 2019

Published 9 January 2020

(catalog number K0721; Thermo Scientific), after treatment for 60 min with a lysozyme-containing solution (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme). The genomic DNA was then sequenced on an Illumina MiSeq platform, as described by Clabaut et al. (7), using 250-bp paired-end (PE) read sequencing.

Default parameters were used for all software, unless otherwise noted. Sequencing resulted in 1,708,490 raw PE reads that were trimmed and quality filtered using Trimmomatic v0.36 (8) and then assembled into contigs using Unicycler v0.4.7 (9), with default parameters. This resulted in 428× coverage and 124 contigs, with a G+C content of 36.8%, an N_{50} value of 38,667 bp, an L_{50} value of 19, and a genome size of 1,993,673 bp, as calculated using QUAST v5.0.0 (10). Whole-genome *de novo* gene prediction was performed using Prokka v1.13.4 (11). This prediction resulted in 2,024 putative protein-encoding genes, 59 tRNA genes, and 3 rRNA genes.

Data availability. This whole-genome sequencing project has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under BioProject accession number [PRJNA557339](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA557339), and the corresponding assembly was deposited under accession number [VOMA00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/VOMA00000000). The version described in this paper is the first version, VOMA00000000.1. The raw data reads have been deposited in the Sequence Read Archive (SRA) database under accession number [SRR9860122](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRR9860122).

ACKNOWLEDGMENTS

M.C. is the recipient of a doctoral grant financed by the FUI GYNCEUTICS program (Region Normandy, BPI). A.M.B. is the recipient of a postdoctoral grant from the Region Normandy and European Union (FEDER).

The LMSM is a member of the industrial cluster Cosmetic Valley and of CNRS GDR 3711 Cosm'Actifs.

REFERENCES

- Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. 2015. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol* 6:81. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>.
- Vaneechoutte M. 2017. The human vaginal microbial community. *Res Microbiol* 168:811–825. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.08.001>.
- Kaewsrichan J, Peeyananjarassri K, Kongprasertkit J. 2006. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:75–83. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00124.x>.
- Jang SJ, Lee K, Kwon B, You HJ, Ko G. 2019. Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Sci Rep* 9:8121. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44579-4>.
- Castro J, Martins AP, Rodrigues ME, Cerca N. 2018. *Lactobacillus crispatus* represses vaginolytic expression by BV associated *Gardnerella vaginalis* and reduces cell cytotoxicity. *Anaerobe* 50:60–63. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.01.014>.
- Parolin C, Frisco G, Foschi C, Giordani B, Salvo M, Vitali B, Marangoni A, Calonghi N. 2018. *Lactobacillus crispatus* BC5 interferes with *Chlamydia trachomatis* infectivity through integrin modulation in cervical cells. *Front Microbiol* 9:2630. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02630>.
- Clabaut M, Boukerb AM, Racine P-J, Pichon C, Kremser C, Queiroz A, Karsybayeva M, Redziniak G, Chevalier S, Feuilloley MGJ. 2019. Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* strain V4, isolated from a vaginal swab from a young healthy nonmenopausal woman. *Microbiol Resour Announc* 8:e00856-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00856-19>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- Mikheenko A, Prjibelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. 2018. Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34:i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

Article 2**Effect of 17 β -estradiol on a Human Vaginal *Lactobacillus crispatus* Strain**

Le microbiote vaginal est en constante évolution en fonction de la physiologie de la femme, en réponse à différents facteurs intrinsèques et extrinsèques. Chez les femmes en âge de procréer et en bonne santé, le microbiote vaginal est majoritairement composé de lactobacilles et en particulier, de *L. crispatus*. Les lactobacilles assurent naturellement une protection contre les agents pathogènes par divers mécanismes, dont l'abaissement du pH par la production d'acide lactique. La composition de ce microbiote reste assez stable, jusqu'à la ménopause. Pendant la ménopause, la population de lactobacilles diminue et, par conséquent, le pH vaginal local revient à la neutralité, amenant d'autres micro-organismes potentiellement pathogènes à coloniser la muqueuse vaginale. La prévalence des lactobacilles dans le microbiote est importante pour protéger les femmes des troubles gynécologiques et la question repose alors sur la compréhension des raisons de la diminution de la population de lactobacilles chez les femmes post-ménopausées. Les variations du pH ne semblent pas être le principal facteur à l'origine de la diminution de ces bactéries protectrices, car même lorsque le milieu vaginal est artificiellement ré-acidifié, les lactobacilles restent incapables de se stabiliser et d'exercer efficacement une fonction protectrice sur une longue période. Une des raisons pourrait être la diminution de la production d'œstrogènes observée pendant la ménopause affectant la dynamique et la lubrification de la muqueuse vaginale. En effet, les œstrogènes semblent moduler la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal. De plus, des effets directs de l'estradiol sur les bactéries ont été signalés. L'estradiol interfère en effet avec l'expression de la virulence en inhibant la communication inter-bactérienne, la croissance et la formation de biofilms de certaines bactéries. Néanmoins, à notre connaissance, les effets de l'estradiol sur les lactobacilles n'ont pas été étudiés jusqu'à présent.

Dans la présente étude, les effets du 17 β -estradiol sur une souche vaginale de *L. crispatus*, ont été étudiés par des approches physiologiques et physico-chimiques. Une recherche de senseur de l'hormone a été réalisée par bioinformatique.

Nos résultats montrent que l'estradiol peut affecter la physiologie de *L. crispatus* CIP104459, suggérant que cette hormone pourrait jouer un rôle clé dans l'implantation et la colonisation de la muqueuse vaginale.

Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain

Maximilien CLABAUT¹, Amandine SUET², Pierre-Jean RACINE¹, Ali TAHRIOUI¹, Julien VERDON³, Magalie BARREAU¹, Olivier MAILLOT¹, Agathe LE TIRANT⁴, Madina KARSYBAYEVA⁵, Coralie KREMSE⁶, Gérard REDZINI⁷, Cécile DUCLAIROIR-POC¹, Chantal PICHON², Sylvie CHEVALIER¹, Marc G.J. FEUILLOLEY^{1*}

¹ LMSM EA4312, Université de Rouen Normandie, Evreux, France

² Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

³ Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, Poitiers, France

⁴ Seqens Cosmetics', Porcheville, France

⁵ Remedials Laboratory, Paris, France,

⁶ GymoPharm, Longjumeau, France,

⁷ Cosmetic Inventions, Antony, France

* Correspondence: Marc G.J. Feuilleley, Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM EA 4312), Rouen Normandie Université, 55 rue Saint-Germain 27000 Evreux, France.

Tel: 00 332 32 29 15 42 Fax: 00 332 32 29 15 50 E-mail: marc.feuilleley@univ-rouen.fr

Short title: Effect of 17 β -estradiol on *Lactobacillus crispatus*

Key words: Host-bacteria communication – Vaginal homeostasis – Bacterial adhesion – Bacterial virulence – Estrogens – Microbial endocrinology

Key points: We demonstrate that 17 β -estradiol can exert direct effects on a vaginal strain of *Lactobacillus crispatus*, affecting membrane dynamics, biosurfactant production and adhesion to vaginal cells in particular. This process may contribute to vaginal physiology by promoting lactobacillus adhesion to the mucosa.



OPEN

Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain

Maximilien Clabaut¹, Amandine Suet², Pierre-Jean Racine¹, Ali Tahrioui¹, Julien Verdon³, Magalie Barreau¹, Olivier Maillot¹, Agathe Le Tirant⁴, Madina Karsybayeva⁵, Coralie Kremser⁶, Gérard Redziniak⁷, Cécile Duclairoir-Poc¹, Chantal Pichon², Sylvie Chevalier¹ & Marc G. J. Feuilleley¹✉

Lactobacilli and estrogens play essential roles in vaginal homeostasis. We investigated the potential direct effect of 17 β -estradiol on a vaginal strain of *Lactobacillus crispatus*, the major bacterial species of the vaginal microbiota. 17 β -estradiol (10⁻⁶ to 10⁻¹⁰ M) had no effect on *L. crispatus* growth, but markedly affected the membrane dynamics of this bacterium. This effect appeared consistent with a signal transduction process. The surface polarity and aggregation potential of the bacterium were unaffected by exposure to 17 β -estradiol, but its mean size was significantly reduced. 17 β -estradiol also promoted biosurfactant production by *L. crispatus* and adhesion to vaginal VK2/E6E7 cells, but had little effect on bacterial biofilm formation activity. Bioinformatic analysis of *L. crispatus* identified a membrane lipid raft-associated stomatin/prohibitin/flotillin/HflK domain containing protein as a potential 17 β -estradiol binding site. Overall, our results reveal direct effects of 17 β -estradiol on *L. crispatus*. These effects are of potential importance in the physiology of the vaginal environment, through the promotion of lactobacillus adhesion to the mucosa and protection against pathogens.

The human microbiota has a dynamic structure that differs among organs and populations¹. It evolves constantly, in response to local and environmental factors^{1–3}. The vaginal microbiota is less diverse than other microbiota⁴ but evolves rapidly with changes in female physiology over time⁵. In young children (under the age of 5 to 6 years), it seems to be composed essentially of microorganisms of cutaneous and fecal origins⁶, but even before menarche, at the age of 10 to 12 years, the vaginal microbiota begins to resemble that of adult women, with a dominance of lactobacilli⁷. Colonization by acid producers⁸ such as *Lactobacillus crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* and/or *L. gasseri*, the predominant vaginal bacteria in adults^{9,10} is associated with decrease in the pH of the vaginal environment. In women of reproductive age, the composition of the vaginal microbiota remains fairly stable until menopause. With a few exceptions, in which lactobacilli remain detectable after menopause¹¹, the lactobacilli population generally decreases in size at menopause, resulting in a return of local vaginal pH to neutrality⁸, allowing staphylococci and other skin microorganisms to colonize the vaginal mucosa^{11,12}. Finally, the composition of the post-menopause vaginal microbiota gradually comes to resemble that of the cutaneous microbiota. These events are frequently associated with gynecological problems, including itching, inflammation, and even infections¹³, because lactobacilli naturally provide protection against pathogens. This protection results from the extensive secretory activity of lactobacilli, which produce the lactic acid responsible for the decrease in vaginal pH and key protection factor^{14,15}, but also hydrogen peroxide^{8,16}, exoenzymes, bacteriocins and surfactants^{17–19}. For these reasons, various strategies for the re-implantation of lactobacilli in post-menopausal women have been developed, based on the introduction of exogenous bacteria (probiotics), nutritional supplementation (prebiotics) or a combination of both these approaches (symbiotics)²⁰. The prevalence of lactobacilli in the vaginal microbiota is of importance for protection against gynecological disorders and sexually transmitted infections^{14,15}, but it remains unclear why the lactobacillus population decreases after menopause. Changes in pH do not seem to be the major factor underlying the decrease in lactobacilli, because, even if the vaginal medium is artificially re-acidified, the lactobacilli population cannot be stabilized and does not exert efficient

¹Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM EA 4312), Université de Rouen Normandie, 55 rue Saint-Germain, 27000 Evreux, France. ²Centre de Biophysique Moléculaire, UPR4301 French National Centre for Scientific Research, Orléans, France. ³Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, Poitiers, France. ⁴Seqens Cosmetics, Porcheville, France. ⁵Remedials Laboratory, Paris, France. ⁶GymoPharm, Longjumeau, France. ⁷Cosmetic Inventions, Antony, France. ✉email: marc.feuilleley@univ-rouen.fr

long-term protection²¹. One reason for the observed changes in this population may be the large decrease in estrogen production during menopause relative to the levels in women of reproductive age, with effects on the dynamics and lubrication of the vaginal mucosa^{13, 22}. Low doses of estrogens have been shown to restore a low vaginal pH²³ and to stimulate glycogen production²⁴. However, the potential direct effect of estrogens on lactobacilli has never before been considered.

It has been known since the end of the twentieth century that bacteria can sense and adapt to host factors²⁵. The effects of peptide hormones and classical neurotransmitters, in particular, have been studied^{26, 27}. However, our knowledge of the impact of steroid hormones remains much more limited. In skin, testosterone indirectly promotes the development of *Cutibacterium acnes* by increasing the availability of surface lipids²⁸, and estrogens appear to modulate the composition and metabolic activity of the gut microbiota²⁹. Direct effects of estradiol on bacteria have also been reported. In *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas aeruginosa*, estradiol interferes with the expression of virulence by inhibiting inter-bacterial communication^{30, 31}. In addition, estradiol stimulates the growth and regulates biofilm formation, coaggregation and polysaccharide production in *Prevotella intermedia*³². An effect of estradiol on *Staphylococcus epidermidis* growth and biofilm formation has also been reported³³. However, the effects of estradiol on lactobacilli remain unknown.

In this study, we investigated the effects of estradiol on a vaginal strain of *L. crispatus*, the genome of which was recently sequenced³⁴, through cell-binding assays and physiological, physicochemical, morphological, and bioinformatics approaches. We found that estradiol can affect the physiology of lactobacilli, suggesting a possible key role for estradiol in their adherence to the vaginal mucosa.

Results

17 β -estradiol alters *L. crispatus* CIP104459 membrane fluidity. Preliminary studies showed that 17 β -estradiol, at concentrations of 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M, had no effect on *L. crispatus* CIP104459 growth (Suppl Fig. 1). 17 β -estradiol is amphiphilic and can, therefore, integrate into phospholipid membranes, affecting their fluidity. We investigated the effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* CIP104459 membrane fluidity, by performing fluorescence anisotropy analysis, as previously described³⁵. Anisotropy reflects the degree of organization of the bacterial membrane, with decreases in this index indicating a less organized phospholipid bilayer and, thus, an increase in membrane fluidity. Bacteria were grown for 18 h in the presence or absence of 17 β -estradiol at concentrations of 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M, and anisotropy index was then measured. 17 β -estradiol decreased fluorescence anisotropy (Fig. 1A). This effect was statistically significant for 17 β -estradiol concentrations of 10⁻⁶ and 10⁻¹⁰ M. For 10⁻⁸ M, the difference relative to control values was smaller and non-significant. We initially suspected that this result was an artefact, but subsequent studies showed that the bacterial response to 17 β -estradiol was not systematically linear, suggesting a complex mechanism and different targets. These data indicate that 17 β -estradiol increases membrane fluidity in *L. crispatus* CIP104459. This increased fluidity may be due to the integration of 17 β -estradiol into the bacterial membrane or an adaptive response of the bacteria after the sensing of 17 β -estradiol as an environmental signal. The sensitivity of the bacterial membrane changes with the growth stage³⁶ and, if it happens, 17 β -estradiol is rapidly integrated into the membrane, within minutes or hours³⁷. The bacteria were then cultured for 6, 12 or 24 h (corresponding to mid-log growth phase, early stationary growth phase and full stationary growth phase, respectively) in MRS medium before the addition of 17 β -estradiol, and anisotropy was immediately monitored at 15-min intervals for 3 h (Fig. 1B–D, respectively). Remarkably, the fluorescence anisotropy of control bacteria after 6 h of culture, and, to a lesser extent, after 12 h, tended to increase spontaneously. No variation was detected when bacteria were grown to stationary phase (24 h), suggesting that a steady state membrane organization had been achieved by this point. The exposure of bacteria to 17 β -estradiol after 6 h of culture resulted in noisy anisotropy data, probably because of membrane instability, but a gradual evolution of the signal was observed over 3 h, as for the control. The signal was more stable for bacteria cultured for 12 and 24 h before treatment with 17 β -estradiol, for which no difference relative to the control was noted. If the effect of 17 β -estradiol was due to non-specific interaction with the membrane, this process should be rapid and associated with an immediate decrease in anisotropy. Limited changes in membrane fluidity were observed for cultures treated after 6 h, whereas such changes were undetectable in cells grown to stationary phase. These data thus indicate that the increase in *L. crispatus* CIP104459 membrane fluidity observed after exposure to 17 β -estradiol from the beginning to the end of culture, probably results from an adaptive process. These exposure conditions were used in subsequent assays.

17 β -Estradiol marginally affects the polarity and Lewis acid/base surface properties of *L. crispatus* CIP104459. Given the effect of 17 β -estradiol on membrane fluidity, we assessed the surface polarity of *L. crispatus* CIP104459 with the microbial affinity to solvents (MATS) assay. Solvent affinity was limited for this bacterium, particularly for apolar solvents, such as decane and hexadecane (mean values 12 \pm 2.19% and 12 \pm 1.36%, respectively). Affinity for more polar solvents, such as ethyl acetate and chloroform, was higher (24 \pm 1.21% and 32 \pm 1.62%, respectively) (Fig. 2A–D). *L. crispatus* CIP104459 thus has a hydrophilic surface. Exposure to 17 β -estradiol tended to lead to a limited increase in affinity for chloroform and a parallel decrease in affinity for the other three solvents. Only the decrease in affinity for ethyl acetate with 17 β -estradiol at 10⁻⁸ M was statistically significant ($p < 0.05$). An evaluation of the Lewis acid/base ratio with two pairs of solvents, hexadecane/chloroform and decane/ethyl acetate, revealed that all bacteria exposed to 17 β -estradiol displayed a change in their electron donor/acceptor behavior. The untreated bacterial surface had acido-basic characteristics, whereas the surface of 17 β -estradiol treated bacteria was basic (Fig. 2E). However, this change was marginal and was significant only for hexadecane/chloroform, for bacteria exposed to 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol.

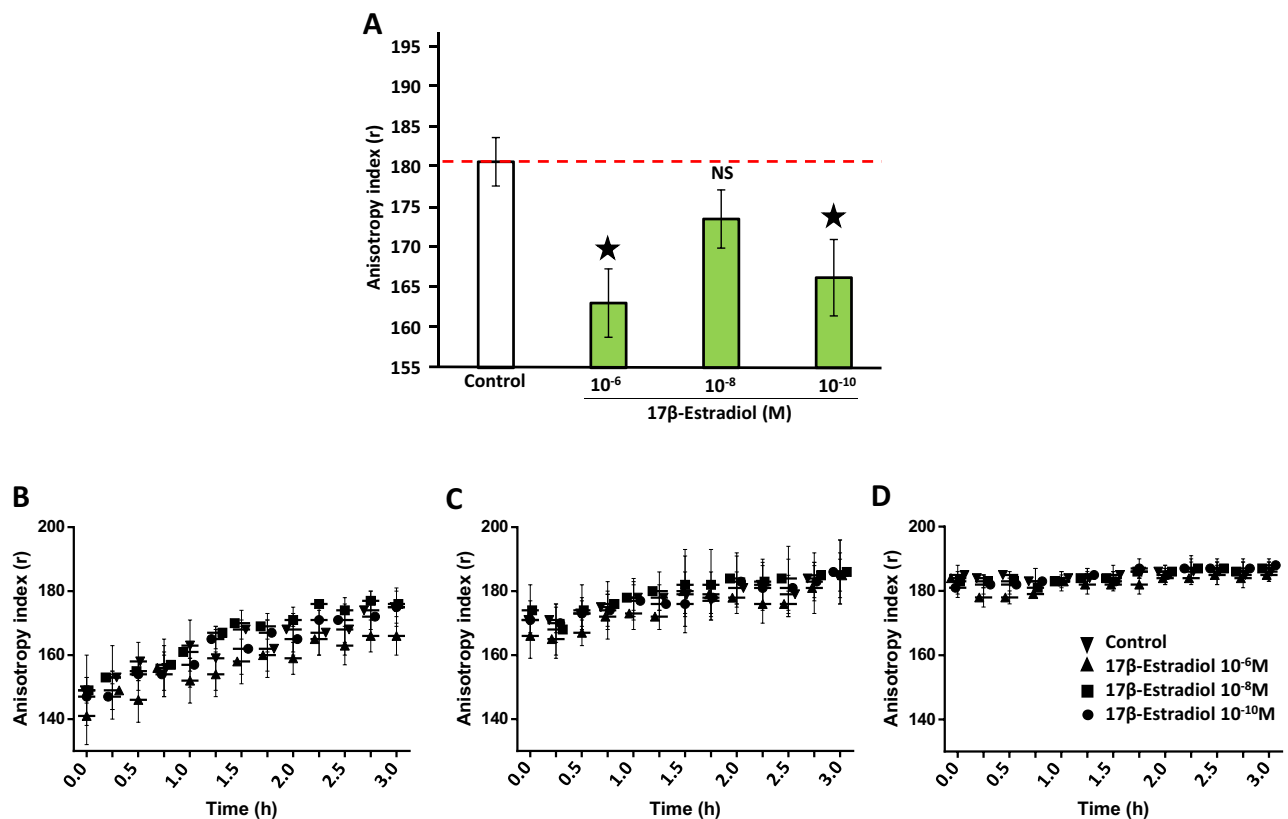


Figure 1. Effect of 17 β -estradiol on *Lactobacillus crispatus* CIP104459 membrane fluidity. **(A)** Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* CIP104459 grown for 18 h in the absence (control) or presence of 17 β -estradiol (10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M). **(B)** Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* grown for 6 h in control MRS medium and then exposed to 17 β -estradiol (10^{-6} , 10^{-8} or 10^{-10} M). **(C)** Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* grown for 12 h in control MRS and subsequently exposed to 17 β -estradiol (10^{-6} , 10^{-8} or 10^{-10} M). **(D)** Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* grown for 24 h in control MRS medium and subsequently exposed to 17 β -estradiol (10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M). Values and curves are the means \pm SEM of three independent studies. (NS: not significant; * = $p < 0.05$).

17 β -Estradiol alters the morphology of *L. crispatus* CIP104459, but not its aggregation phenotype.

As membrane fluidity can affect cell morphology or aggregation, we then investigated the effects of 17 β -estradiol on these phenotypes in *L. crispatus* CIP104459. For macroscopic investigations of the aggregation phenotype, we first performed a “sedimentation” technique, as previously described by Vandevorde et al.³⁸. 17 β -estradiol had no effect on the aggregation potential of *L. crispatus* CIP104459 in these conditions. The percentage aggregation reached a mean value of $66.6 \pm 1.6\%$ in control bacteria and of 65.3 ± 2.2 , 62.9 ± 1.3 , and $66.4 \pm 1.2\%$ in bacteria cultured in the presence of 10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M 17 β -estradiol, respectively (Suppl. Fig. 2). The effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* CIP104459 was assessed further by flow cytometry, which can provide information about cell aggregation, mean size, and structural heterogeneity (granularity). This information is obtained by determining the forward scatter (FSC) and lateral or side scatter (SSC) fractions of the light³⁹. We plotted the FSC and SSC values of *L. crispatus* CIP104459. For FSC (x axis), the maximal size of the detected events (in red) was decreased by exposure to 17 β -estradiol, whereas the signal corresponding to small events (in blue) increased (Fig. 3A). This pattern was particularly marked for bacteria exposed to 10^{-6} and 10^{-8} M 17 β -estradiol, and was less clear for those exposed to 10^{-10} M of 17 β -estradiol, although small particles continued to predominate, relative to control conditions. By contrast, the surface heterogeneity (granularity) of the bacteria, corresponding to the SCC values (y axis), was not modified. The difference in FSC values between control and 17 β -estradiol-treated bacteria was not significant, probably because this signal combines two different types of information, relating to the degree of aggregation of the bacteria and their mean size. Overall, these data suggest that 17 β -estradiol affects the morphology of *L. crispatus* CIP104459. Scanning electron microscopy (SEM) observations of cells revealed that 17 β -estradiol had no detectable effect on aggregate formation (Fig. 3B). Measurements of cells’ length on SEM images led to *L. crispatus* CIP104459 cells being classified as small (1 to 2 μm) to large (4 to 9 μm). Remarkably, treatment with 10^{-8} or 10^{-10} M 17 β -estradiol led to significant increases in the proportion of small bacteria ($p < 0.001$) and decreases in the portion of large bacteria ($p < 0.01$) (Fig. 3C).

17 β -Estradiol promotes biosurfactant production by *L. crispatus* CIP104459. Biosurfactants are surface-active molecules that can reduce air/water surface tension to low levels. Some of these molecules can insert into bacterial membranes and modify membrane fluidity⁴⁰. Cultures of *L. crispatus* CIP104459 exposed

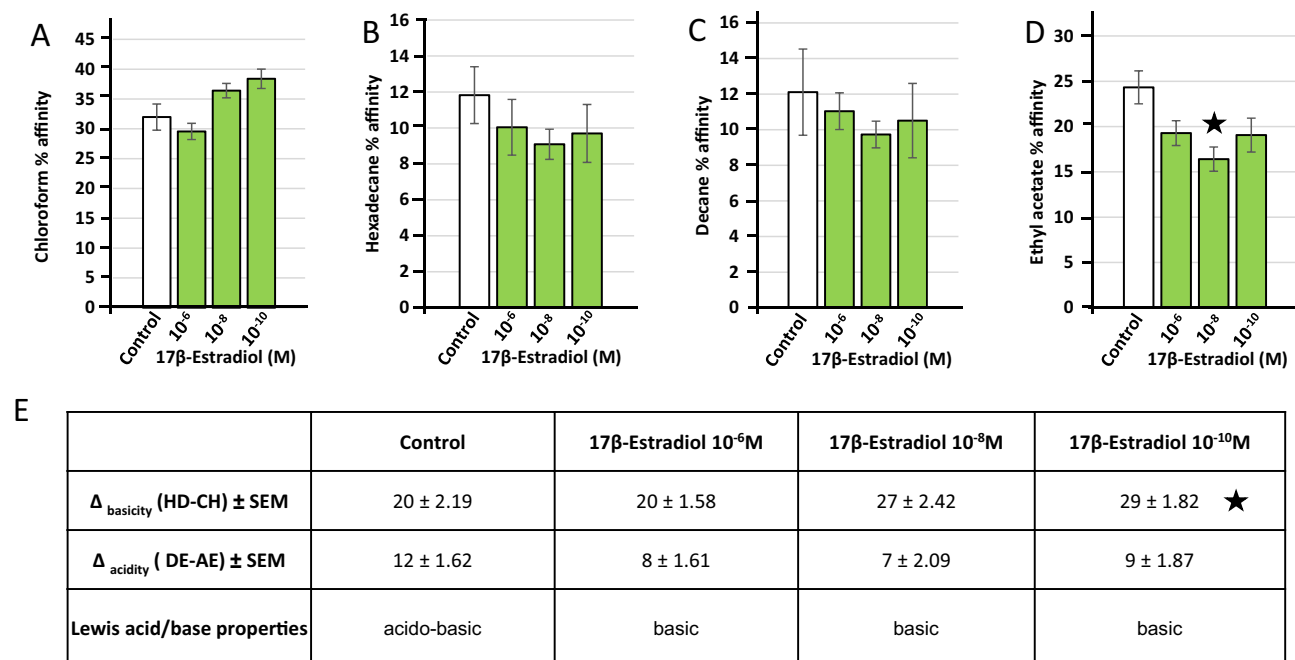


Figure 2. Effect of 17 β -estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) on the solvent affinities and Lewis acid/base surface properties of *Lactobacillus crispatus* CIP104459. **(A)** Partitioning between water and chloroform. **(B)** Partitioning between water and hexadecane. **(C)** Partitioning between water and decane. **(D)** Partitioning between water and ethyl acetate. **(E)** Lewis acid/base behavior of *L. crispatus* CIP104459 with the two solvent couples hexadecane (HD)/chloroform (CH) and decane (DE)/ethyl acetate (EA). The values presented are the means \pm SEM of three independent studies. (* = $p < 0.05$).

to 17 β -estradiol (10⁻⁶ and 10⁻⁸ M) for 48 h and layered on MRS-agar spread and flowed over the Petri dishes, suggesting that biosurfactants were produced (Fig. 4A). Biosurfactants were extracted by gently scrapping the bacterial lawn and resuspending the cells in Volvic water (selected for its neutral effect on surface tension). The bacteria were then removed by centrifugation, as described by Meylheuc et al.⁴¹. The solutions obtained from *L. crispatus* cultures with and without exposure to 17 β -estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) behaved differently on testing by the sessile drop technique on a polystyrene surface (Fig. 4B). Controls, with 10⁻⁶ to 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol alone in Volvic water, showed that the steroid alone had no effect on the surface tension values (*data not shown*). The drops of solution obtained from the bacterial lawn exposed to 17 β -estradiol were flatter than those obtained with pure Volvic water (control), particularly for samples treated with 10⁻⁶ M 17 β -estradiol. This decrease in the contact angle of the liquid with the surface indicates a decrease in surface tension due to the presence of biosurfactants. We used the pendant drop method to determine the decrease in surface tension, and the mean surface tension of the solution was calculated by modeling the shape of the hanging drop visualized with a camera. A dose-related decrease in the surface tension of solutions extracted from *L. crispatus* CIP104459 exposed to 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol was observed. However, the difference in surface tension between control solutions and solutions from 17 β -estradiol-treated bacteria was significant only for 10⁻⁶ M 17 β -estradiol (Fig. 4C).

17 β -Estradiol increases the adhesion of *L. crispatus* CIP104459 to vaginal mucosa epithelial cells in vitro, but has a limited effect on biofilm formation. Finally, we investigated the effect of 17 β -estradiol on adhesion and biofilm formation. We assessed the adhesion of *L. crispatus* CIP104459 to vaginal mucosa epithelial cells with the human vaginal VK2/E6E7 cell line. Bacteria cultured in the presence of 10⁻⁸ M 17 β -estradiol displayed significantly higher rates of adhesion to VK2/E6E7 cells (+10.2 \pm 3.8%) (Fig. 5). Unexpectedly, this effect was not observed with bacteria exposed to 10⁻⁶ M and 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol. Assessment of *L. crispatus* CIP104459 biofilm formation in crystal violet staining assays showed that 10⁻⁶ and 10⁻⁸ M 17 β -estradiol induced a small but significant increase in biofilm formation, whereas 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol did not (Fig. 6A). We investigated the effect of 17 β -estradiol on biofilm architecture in more details, by visualizing the 3D structure of *L. crispatus* CIP104459 biofilm by confocal laser scanning microscopy. However, bacteria cultured in MRS were unable to adhere to the glass bottom of the microtiter plate, and no biofilm was observed in such conditions (*data not shown*). We therefore cultured the bacteria in a specific medium, “simulating genital tract secretion” (SGTS) medium⁴² (Table 1). In these conditions, 17 β -estradiol had no visible effect on biofilm structure (Fig. 6B). Biofilm images analysis with COMSTAT2 software revealed that the mean thickness (μm), mean biomass volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) and roughness coefficients of control and 17 β -estradiol-treated bacteria were unaffected by treatment (Fig. 6C).

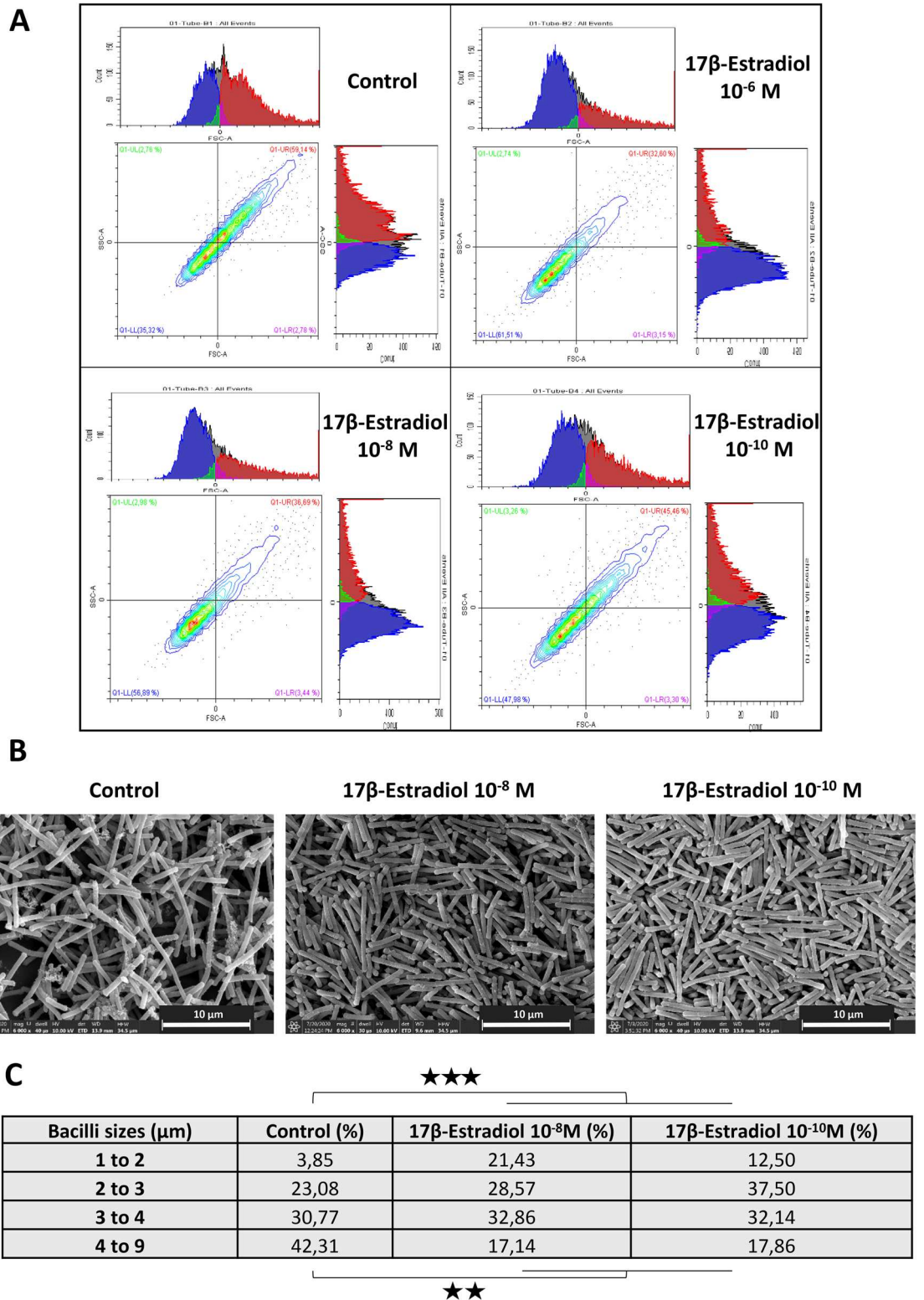


Figure 3. Effect of 17β-estradiol on the aggregation potential and morphology of *Lactobacillus crispatus* CIP104459. **(A)** Flow cytometry diagrams illustrating the effect of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) on the mean size and aggregation (x axis = forward scattering fraction (FSC)) and surface heterogeneity (y axis = side scatter (SSC)) of the bacteria. **(B)** Scanning electron microscopy of control and 17β-estradiol treated bacteria. Scale bar = 5 μm. **(C)** Table showing the relative percentages of bacteria classified by size after culture in the presence or absence of 17β-estradiol (10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M). (** = p < 0.01; *** = p < 0.001).

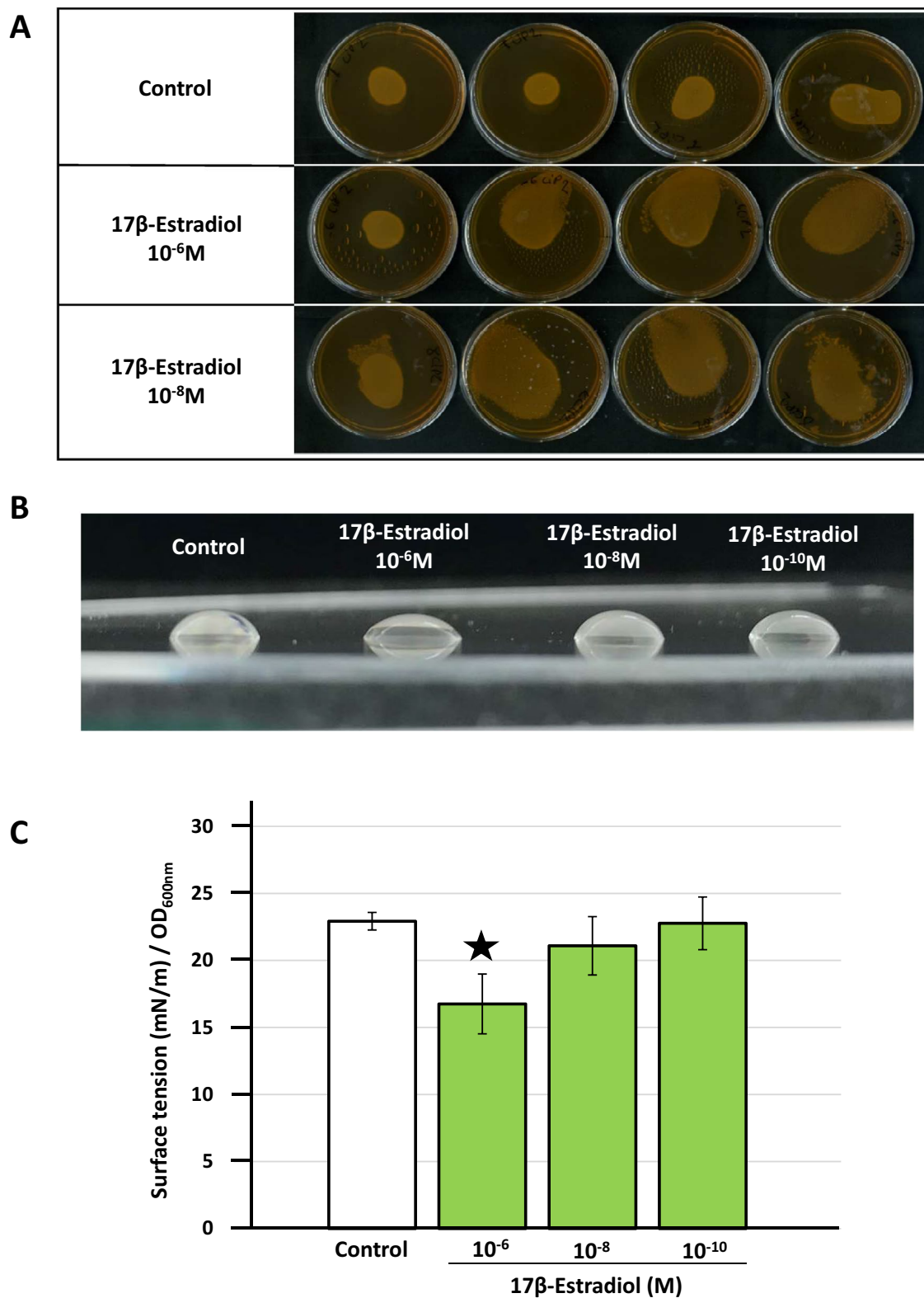


Figure 4. Effect of 17 β -estradiol on *Lactobacillus crispatus* CIP104459 biosurfactant production. **(A)** Cultures of *L. crispatus* CIP104459 on MRS agar medium after exposure to 17 β -estradiol (10⁻⁶ and 10⁻⁸ M). **(B)** Typical shape of drops of solution obtained after rinsing the bacterial lawn formed on Petri dishes in the presence or absence of 17 β -estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M). **(C)** Surface tension value of solutions extracted from *L. crispatus* CIP104459 exposed to 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M 17 β -estradiol, measured by the pendant drop method. Values are the means \pm SEM of three independent experiments. (* = $p < 0.05$).

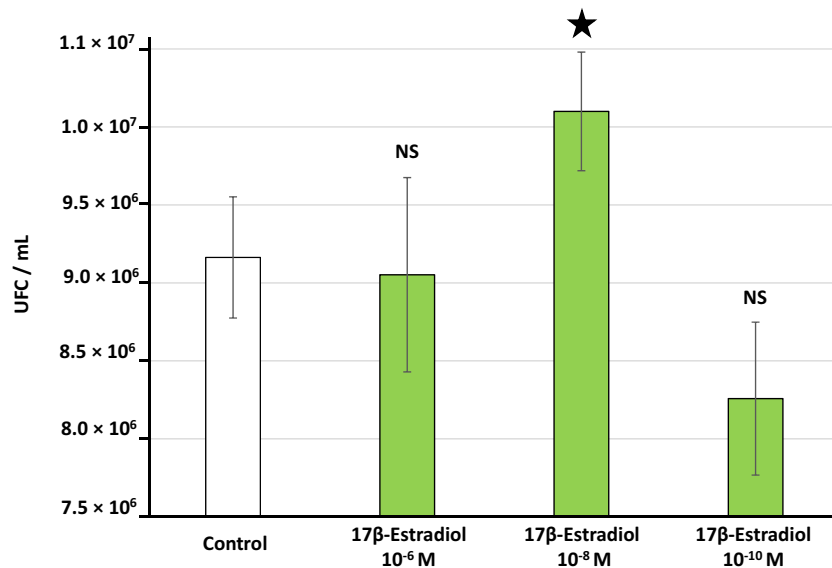


Figure 5. Effect of 17 β -estradiol on the adhesion potential to VK2/E6E7 human vaginal cells of *Lactobacillus crispatus* CIP104459 grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium. Values are the means \pm SEM of three independent studies. (NS not significant; * = $p < 0.05$).

Bioinformatic study of the potential *L. crispatus* CIP104459 17 β -estradiol receptor. As shown here, 17 β -estradiol affects on the physiology of *L. crispatus* CIP104459 at concentrations as low as 10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M for some phenotypes, suggesting the existence of a putative sensor for estradiol in this bacterium. The potential binding site for 17 β -estradiol was investigated by a bioinformatic approach based on the draft genome of *L. crispatus* CIP104459³⁴, which was compared with the recently annotated genome of *L. crispatus* CO3MRS11⁴³. The putative translated ORFs were compared to the published sequences of nine eukaryotic 17 β -estradiol binding proteins identified in previous studies (Table 2). Two of these proteins, estrogen-related receptor gamma (ERR3, UniProtKB—P62508) and the prohibitin-2 (PHB2, UniProtKB—Q99623) displayed significant identity (33 and 24%, respectively) and similarity (55 and 46%, respectively) to a *L. crispatus* CIP104459 protein, the SPFH domain-containing protein (NCBI Reference Sequence: WP_013086692.1). Based on the structure of the binding site in eukaryotic proteins, the potential association between 17 β -estradiol and the *L. crispatus* SPFH domain-containing protein was studied with AutoDock 4.2⁴⁴. This 293 amino acids protein contains two domains, an N-terminal domain between amino acids 1 and 40 corresponding to a short extracellular sequence (amino acids 1 to 9), and a transmembrane helix (amino acids 10 to 25) with a long C-terminal submembrane domain organized as an α helix and a β -sheet, respectively. A potential binding site for 17 β -estradiol was identified in the submembrane domain, in a region before the α -helix and β -sheet folds (Fig. 7A). The principal amino acids involved in interactions between 17 β -estradiol and the SPFH protein appear to be a glycine 45 and serine 94 (Fig. 7B). The binding value obtained (-7.8 kcal/mol) was particularly high and was significant, as it was identical in 53% of the calculated clusters.

Discussion

There is now ample evidence that the response of human commensal bacteria to peptide hormones and neurohormones is essential for skin homeostasis⁴⁵. Cutaneous bacteria, such as *C. acnes*, have been shown to express sensors for catecholamines (norepinephrine and epinephrine), suggesting that *C. acnes* acts as a relay between stress and acne⁴⁶. Bacteria even produce small eukaryotic communication molecules, such as histamine, glutamine and, γ -aminobutyric acid (GABA) in particular⁴⁵. GABA is even considered to be the universal inter-kingdom communication factor⁴⁷. Conversely, sterols are rare in bacteria⁴⁸, and the influence of steroids on bacterial physiology remains poorly documented, despite the development of bacteria in environments in which steroid hormones have a crucial impact.

The absence of an effect of 17 β -estradiol on the growth of *L. crispatus* CIP104459 is consistent with previous studies showing that human neurohormones and neurotransmitters, including substance P, calcitonin gene related peptide (CGRP), natriuretic peptides, GABA and catecholamines, generally have no effect on the cultivability of commensal bacteria⁴⁵. Conversely, steroid hormones, such as estradiol and androstenedione, inhibit the growth of *Helicobacter pylori*⁴⁹. In this species, progesterone and other cholesterol derivatives may even have lethal effects, which have been attributed to membrane damage^{49,50}. However, these effects were observed only at high concentrations (> 50 μ M)⁴⁹ and, at these non-physiological doses, many eukaryotic hormones, including the aforementioned peptides, can also have non-specific anti-microbial activities²⁶. Moreover, this antimicrobial activity of steroids is species dependent, as sterols have been shown to have limited effects on viability of the Gram-negative spirochete *Borrelia burgdorferi*, with effects membrane permeability⁵¹. *Helicobacter* and *Borrelia*

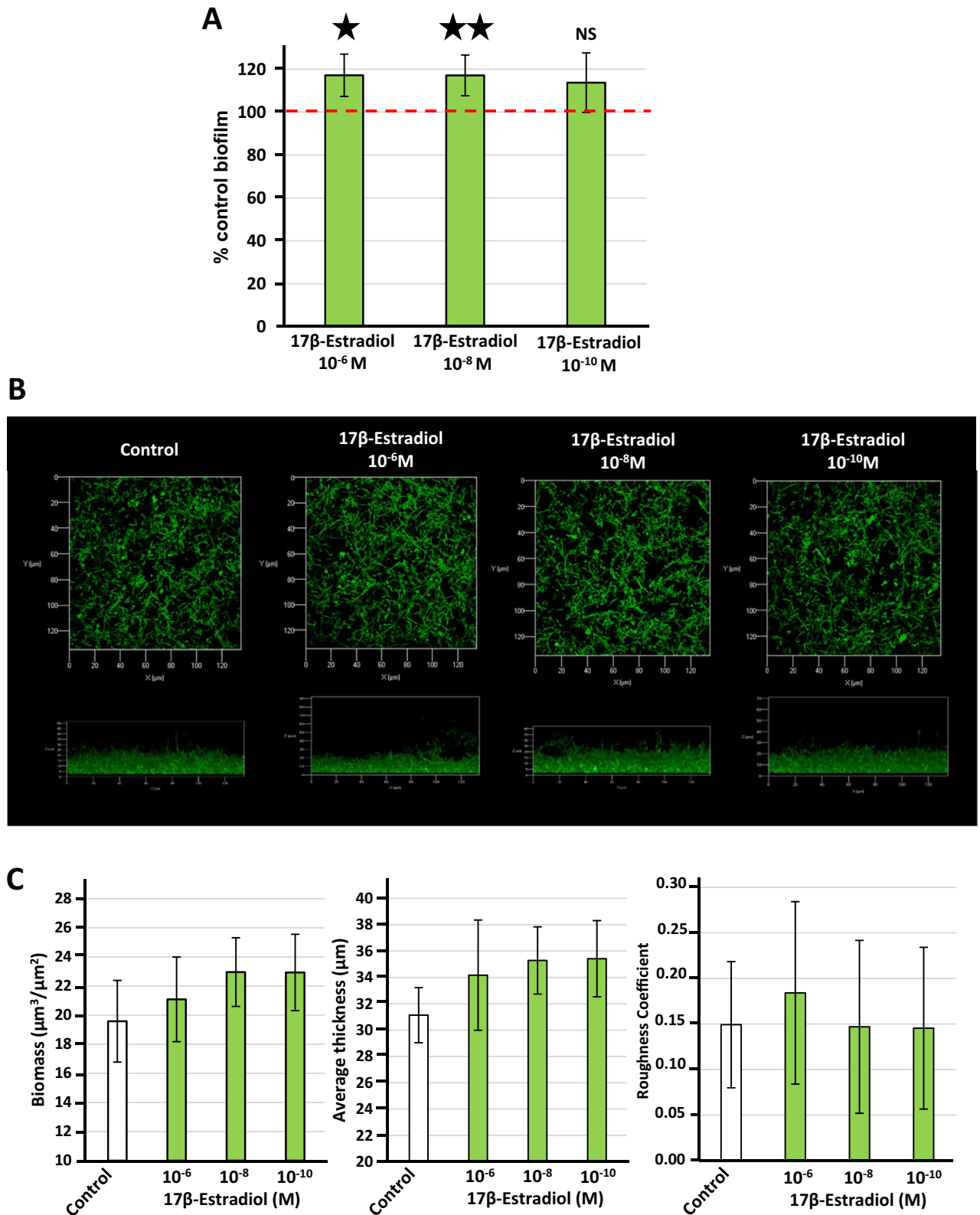


Figure 6. Effect of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) on the biofilm formation activity of *Lactobacillus crispatus* CIP104459. (A) Biofilm formation of bacteria grown in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium in the presence or absence of 17β-estradiol studied by the crystal violet technique. The dotted line indicates the control level (100%). (B) Structure of *Lactobacillus crispatus* CIP104459 biofilm formed in simulating genital tract secretion (SGTS) medium and visualized by confocal laser scanning microscopy. All figures are represented at the same scale and show top views (x/y) and lateral views (x/z mean thickness) of the biofilms formed in the presence or absence of 17β-estradiol. (C) Effect of 17β-estradiol on the calculated means biofilm biomass, thickness and roughness. Results are representative of three independent experiments. (NS not significant; * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$).

Component	Final concentration (g/L)
Part 1^a	
NaCl	3.5
KCl	1.5
K ₂ HPO ₄	1.74
KH ₂ PO ₄	1.36
Dextrose	10.8
Cysteine HCl	0.5
Part 2^b	
Glycogen	1
Mucin	0.25
Tween 20	0.2
Urea	0.5
Hemin	0.5
Albumine	0.2
MgSO ₄ *	0.3
NaHCO ₃ *	0.04
Part 3	
Vitamin mix ^d	5 mL of 100X solution

Table 1. Composition of the simulating genital tract secretion (SGTS) medium. *Solutions were sterilized by passage through a membrane filter (pore size, 0.22 µm). ^aPrepared by dissolving the components in pure 18.2 MΩ water. After adjustment of the pH to 7.2 with NaOH, the solution was autoclaved for 15 min at 121 °C and then cooled to room temperature. ^bPart 2 consisted of eight components prepared separately. Components 1 to 5 were prepared as concentrated solutions and autoclaved for 15 min at 121 °C.

UniProtKB accession number	Human gene	Name
P03372	ESR1	ESR1_HUMAN Estrogen receptor
O95718	ESRRB	ERR2_HUMAN Steroid hormone receptor ERR2
Q99527	GPER1	GPER1_HUMAN G-protein-coupled estrogen receptor 1
P62508	ESRRG	ERR3_HUMAN Estrogen-related receptor gamma
Q92731	ESR2	ESR2_HUMAN Estrogen receptor beta
Q99623	PHB2	PHB2_HUMAN Prohibitin-2
Q8NI08	NCOA7	NCOA7_HUMAN Nuclear receptor coactivator 7
P49888	SULT1E1	ST1E1_HUMAN Estrogen sulfotransferase
Q86YN6	PPARGC1B	PRGC2_HUMAN Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta

Table 2. List and references of the nine eukaryotic 17β-estradiol binding proteins tested for potential homology to *Lactobacillus crispatus* CIP104459 proteins.

are representative of a small group of bacteria with large amounts of cholesterol in their membranes, whereas *Lactobacillus crispatus* is a Gram-positive Firmicute with only small amounts of sterols in its membrane⁴⁸.

We assessed the effect of 17β-estradiol on *L. crispatus* membrane fluidity by measuring membrane anisotropy. A decrease in membrane anisotropy was observed after continuous exposure of the bacteria to 17β-estradiol, indicating greater fluidity³⁵, consistent with changes in membrane homeostasis. Many bacteria use the sterol-like molecules hopanoids to regulate their membrane fluidity in response to changes in environmental conditions, such as temperature shifts^{52,53}, which suggests that 17β-estradiol may be able to insert into *L. crispatus* membranes. We investigated this mechanism further by analyzing membrane fluidity following short-term exposure to 17β-estradiol. Minor differences in fluorescence anisotropy index were observed in bacteria grown to mid-exponential growth phase (6 h of growth). Remarkably, this phenomenon was attenuated in bacteria taken to the start of stationary phase before exposure to 17β-estradiol (12 h of growth), and disappeared completely in bacteria in late stationary phase exposed to 17β-estradiol. Our data therefore suggest that the increase in membrane fluidity resulting from continuous bacterial exposure to 17β-estradiol may be due to an adaptive response of the bacteria involving hormone signal transduction, rather than steroid insertion into the membrane. This hypothesis is also supported by the conservation of the response to 17β-estradiol at a concentration of 10⁻¹⁰ M, a concentration at which the number of steroid molecules accessible per bacterium should be very small, and insufficient for direct physico-chemical effects.

We performed MATS assay to investigate the surface polarity of *L. crispatus* exposed to 17β-estradiol. The changes observed were small, and were significant for only one solvent (ethyl acetate) and for an estradiol concentration of 10⁻⁸ M. In parallel, the Lewis acid/base properties of the bacterial surface shifted from acido-basic to

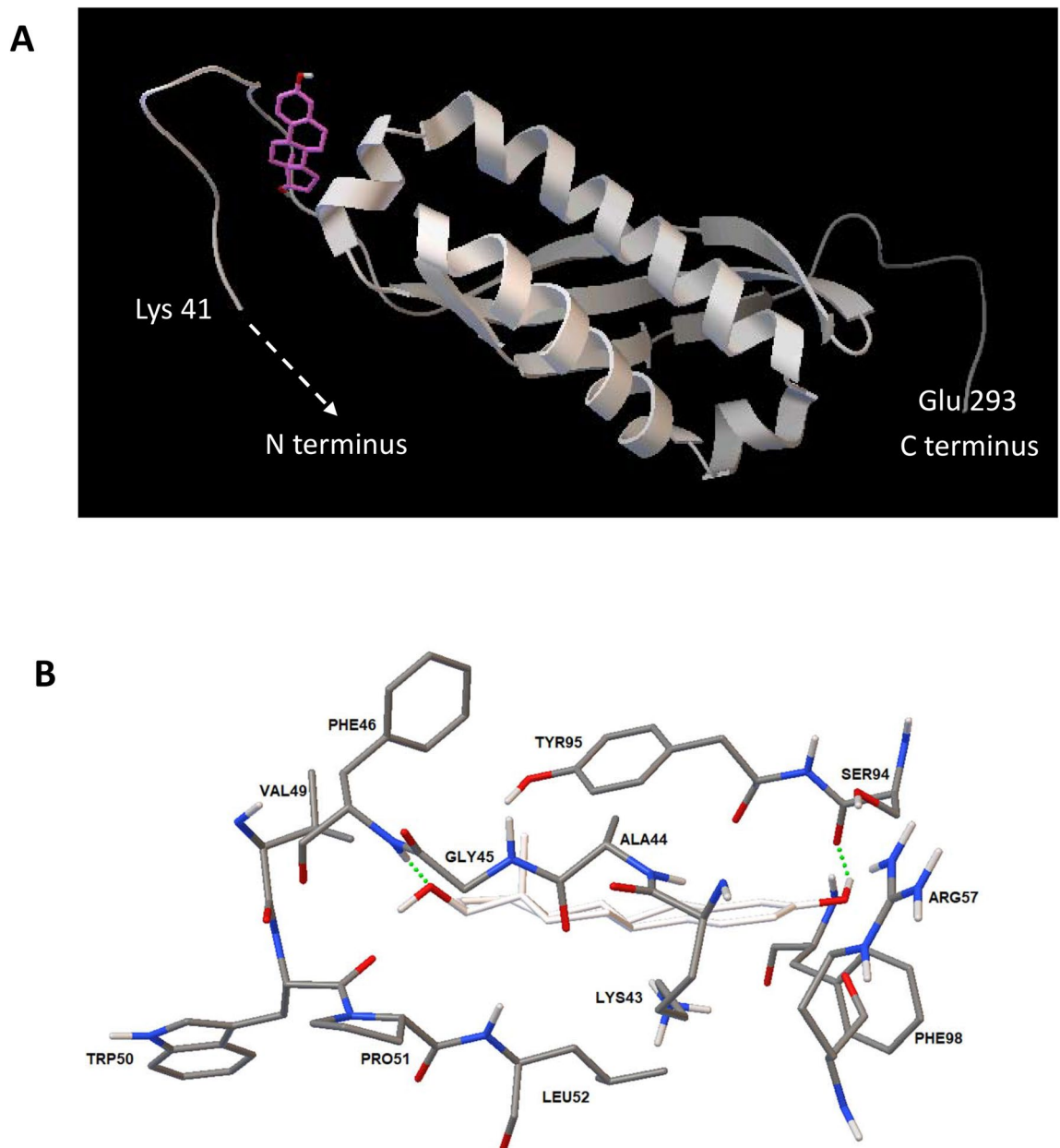


Figure 7. 3D modeling of the potential interaction of the *Lactobacillus crispatus* CIP104459 SPFH domain-containing protein (NCBI Reference Sequence: WP_013086692.1) with 17 β -estradiol. **(A)** Illustration of the sub-membrane domain of the *L. crispatus* SPFH domain-containing protein showing its potential interaction with 17 β -estradiol (pink). **(B)** Calculated 17 β -estradiol binding site on the *L. crispatus* SPFH domain-containing protein determined with AutoDock 4.2 (17 β -estradiol appears in white and the hydrogen bonds between 17 β -estradiol and amino acids are shown as green dotted lines).

basic, indicating that 17 β -estradiol treatment had little effect on cell surface polarity. In addition, flow cytometry studies showed that the surface heterogeneity of the bacteria exposed to 17 β -estradiol remained similar to that observed in control conditions. Conversely, the mean size of the particles detected by flow cytometry tended to decrease after exposure. All lactobacilli can aggregate and *L. crispatus* is one of the species in which this potential is greatest⁵⁴. However, SEM observations of *L. crispatus* revealed that 17 β -estradiol induced a significant decrease in the mean size of bacteria, suggesting that the smaller particle observed on flow cytometry were due to the presence of smaller *L. crispatus* cells rather than a difference in aggregation potential. Consistent with this hypothesis, the aggregation potential of lactobacilli has been shown to depend on outer surface S-layer proteins⁵⁵, and we found here that the physico-chemical properties of the bacterial surface were little affected by 17 β -estradiol exposure. Nonetheless, this study reveals that the response of *L. crispatus* to 17 β -estradiol involves a complex process leading to changes in the bacterial size.

L. crispatus CIP104459 colonies exposed to 17β -estradiol have flattened, leaky phenotypes on Petri dishes. These observations suggested an increase in biosurfactant production. Biosurfactants are surface-active molecules that can decrease air/water surface tension to low levels, but can also insert into biotic or abiotic interfaces. Some biosurfactants can insert into bacterial membranes and modify membrane fluidity⁴⁰. The observed decrease in surface tension was dose related but significant only in the presence of 10^{-6} M estradiol. Many lactobacilli are known to produce molecules with biosurfactant activity, including glycoproteins, such as surlactin⁵⁶. Vaginal *L. crispatus* has recently been shown to produce biosurfactant⁵⁷. The molecule concerned appears to be a complex non-homogeneous lipopeptide, because sophisticated chemical techniques, including Fourier-transformed infrared spectroscopy and electron spray mass spectrometry were unable to determine its complete structure⁵⁷. This *L. crispatus* biosurfactant has interesting properties, including low cytotoxicity, the stimulation of mucoadhesion and antagonism to the adhesion of *Candida* spp⁵⁷. The effect of 17β -estradiol on *L. crispatus* biosurfactant production is of interest because this species is one of the major species of the vaginal microbiota^{4, 5, 10, 12}, with potential direct consequences for the preservation of vaginal homeostasis. This hypothesis is supported by the observation that 10^{-8} M 17β -estradiol increased the adhesion of *L. crispatus* CIP104459 to VK2/E6E7 vaginal cells. Unexpectedly, higher or lower concentrations of 17β -estradiol had no significant effect. However, this may be accounted for by differences in biosurfactant behavior at different concentrations. Indeed, the surfactant behavior related to their amphiphilic character varies with concentrations, up to a specific limit, known as the critical micellar concentration, but biosurfactants can saturate any interface, and micelle formation modifies interactions with the environment⁵⁸. Biosurfactants must, thus, be present at an optimal concentration to exert their activity, and a concentration of 10^{-8} M should be in the range within which 17β -estradiol stimulates *L. crispatus* biosurfactant production optimally.

Biofilm formation also depends on bacterial adhesive properties, and other parameters, including the secretory activity and matrix composition, may also play essential roles. Here, crystal violet staining assays showed that 17β -estradiol induced a limited, but generally significant, increase in biofilm formation. Crystal violet is not specific and labels both bacterial bodies and the matrix. We then characterized the effect of 17β -estradiol more precisely, by studying the structure of the *L. crispatus* biofilm by confocal microscopy. No difference in biofilm structure or mean thickness was observed. For crystal violet assays, the bacteria were grown in MRS medium and biofilm formation was studied in polystyrene tubes. By contrast, for confocal microscopy, bacteria had to be grown in another medium (SGTS), and the biofilm was formed on a glass surface. These technical differences may account for the absence of an effect of 17β -estradiol on biofilm formation by confocal microscopy. Nevertheless, estradiol appears to have a marginal impact on biofilm formation.

We used a bioinformatic approach based on the published draft genome of *L. crispatus* CIP104459³⁴ to identify the potential 17β -estradiol binding protein. For reference, we selected a series of nine molecules identified as estradiol-binding proteins in eukaryotes. Two of these proteins, estrogen-related receptor gamma (ERR3) and prohibitin-2 (PHB2), displayed significant similarity and identity to a *L. crispatus* CIP104459 protein, the SPFH domain-containing protein. SPFH stand for “stomatin, prohibitin, flotillin and HflK/C” and proteins of the SPFH family are associated with membrane lipid rafts⁵⁹. The values obtained for binding between 17β -estradiol and the SPFH domain containing protein were particularly high (-7.8 kcal/mol), indicating a strong probability of interaction. The presence of the 17β -estradiol binding site in the submembrane region of the SPFH protein is consistent with the ability of 17β -estradiol to cross membranes freely, due to its amphiphilic structure. Experimental studies in the Gram-negative bacterium *B. burgdorferi* also suggested an association of sterols with lipid rafts⁴⁸. Moreover, it has been shown that these membrane microdomains should have functions that are more than simply structural in bacteria, with at least one of these functions based on signal transduction⁶⁰. Collectively, our data therefore suggest a putative association of 17β -estradiol with the SPFH domain containing protein in *L. crispatus* membrane lipid rafts, serving as the first step in the induction of the bacterial response.

Taken together, our findings reveal that 17β -estradiol can exert direct effects on *L. crispatus* by modifying its morphology and inducing biosurfactant production. This process may be important in the physiology of the vaginal environment, promoting the adhesion of *L. crispatus* to the mucosa. It is also consistent with the mean normal concentration of estradiol in vaginal fluid (135 pg/mL, i.e. 5×10^{-7} M/L)⁶¹. The antimicrobial activity of *L. crispatus* and the protection it provides appears to be strain dependent, as shown in a previous study⁶², and these results require confirmation in unrelated strains, and even other *Lactobacillus* species. Our results suggest that it may be possible to act on lactobacilli through estrogen or estrogen-like compounds as part of a potential new strategy for preserving or restoring vaginal homeostasis.

Methods

Bacterial strain and culture conditions. *Lactobacillus crispatus* CIP104459 was obtained from the Institut Pasteur Collection (CRBIP-Microorganism biobank catalogue, Paris, France). It was isolated in 1955 from a vaginal swab from a non-menopausal woman at the “La Croix-Rousse” maternity center (Lyon, France). In our laboratory, this strain was stored at -140 °C in a cryofreezer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The draft genome sequence of *L. crispatus* CIP 104459 has recently been determined and deposited in the DDBJ/ENA/GenBank under accession number VOMA00000000³⁴. This bacterium was grown in anoxic conditions in conical 15 mL tubes (Corning, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) containing (filled to maximal capacity) De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), at 37 °C, without shaking. Stock cultures in glycerol 30% (v/v) MRS were prepared and stored at -80 °C before use. Precultures in stationary phase ($OD_{600\text{ nm}} = 1.1 \pm 0.1$) were prepared in MRS in anoxic conditions, at 37 °C for 48 h. The density of the bacterial suspensions was determined by measuring optical density at 600 nm with a spectrophotometer (ThermoSpectronics, Cambridge, UK). The absence of contamination was checked by plat-

ing onto MRS agar in Petri dishes (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). The growth of *L. crispatus* CIP104459 was monitored over a period of 48 h.

For the monitoring of growth kinetics, bacteria were layered in microplates, at an initial OD_{600 nm} of 0.08 and incubated in anoxic conditions for 48 h at 37 °C with shaking (360 rpm) for 10 s before each measurement with a multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Growth curves were plotted from automatic measurement taken every 30 min. Generation time and lag phase were calculated with the software of the microplate reader. All growth kinetics studies were performed in quadruplicate.

Tested molecule. 17β-estradiol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) is poorly soluble in aqueous media. We therefore first produced a stock solution in 100% ethanol. For bacterial treatment, this solution was diluted in MRS such that the final concentration of ethanol in the MRS was fixed at 0.1% v/v. Controls were performed with the same percentage of ethanol in MRS, but without estradiol. Preliminary studies were performed to check that 0.1% ethanol in MRS had no effect on *L. crispatus* CIP104459 (Suppl Fig. 3).

Evaluation of bacterial membrane fluidity. *L. crispatus* CIP104459 was cultured in the presence or absence of 17β-estradiol over the entire course of the experiment (18 h). The bacteria were then collected by centrifugation (7500 × g, 10 min) and washed twice at room temperature in 10 mM MgSO₄. The pellets were resuspended in the same solution and the OD_{600 nm} was adjusted to 0.1. We added 1 μL of 4 mM 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) in tetrahydrofuran (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) to each 1 mL aliquot of the bacterial suspension. Aliquots were then incubated in the dark for 30 min at 37 °C, for incorporation of the probe into the bacterial membrane. The probe was not removed, to make it possible to visualize any change in membrane fluidity. Fluorescence polarization was measured with a Spark 20 M multimode microplate reader, equipped with an active temperature regulation system (Te-Cool, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). The excitation and emission wavelengths were set at 365 and 425 nm, respectively. Each measurement was performed in triplicate. Membrane anisotropy (r value) was calculated as described by Lakowicz⁶³. Data were analyzed with SparkControl software 2.1 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Fluorescence polarization is inversely related to membrane fluidity. Increases in anisotropy indicate a decrease of membrane fluidity, and vice versa. In a second series of experiments, the bacteria were cultured for 6, 12 or 24 h in normal MRS medium, collected and exposed immediately to 17β-estradiol and to the fluorescent probe. Changes in fluorescence polarization were measured over a period of 3 h, with the same equipment.

Determination of bacterial surface polarity. The surface polarity and Lewis acid–base properties of *L. crispatus* CIP104459 with and without exposure to 17β-estradiol were studied by microbial adhesion to solvents (MATS) assays⁶⁴. Bacteria were cultured in MRS for 18 h and harvested by centrifugation (7500 × g, 10 min) after 18 h of incubation. The pellets were washed twice in phosphate buffered saline (PBS) (Lonza, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) to remove all traces of the culture medium. Two pairs of solvents were used: chloroform/hexadecane and ethyl acetate/n-decane were employed. For each condition, 1.2 mL of bacterial suspension at OD_{400 nm} = 0.8 was mixed for 60 s with 0.2 mL of each solvent. After incubation for 15 min and separation of the aqueous and organic phases, the OD_{400 nm} of the aqueous phase was measured. The percentage of bacteria accumulating in each organic compartment (solvent phase) was calculated with the following equation, where [AO] = OD_{400 nm} of the aqueous phase without solvent and [A] = OD_{400 nm} of the aqueous phase after exposure to the solvent:

$$\% \text{ solvent affinity} = (1 - A)/AO \times 100$$

All experiments were performed at least in triplicate.

Investigation of bacterial aggregation and morphology. We assessed the formation of aggregates by *L. crispatus* CIP104459 by the sedimentation technique described by Vandevoorde et al.³⁸. Briefly, *L. crispatus* CIP104459 cultured in MRS for 18 h at 37 °C, in the presence or absence of 17β-estradiol, under anoxic conditions, without shaking, was harvested by centrifugation (7500 × g, 10 min, room temperature), washed twice in PBS, and resuspended in 10 mL of the same medium. After 1.5 min of agitation (vortexing), defined as T = 0 for this experiment, the change in OD_{600 nm} of the suspension was monitored over a period of 30 min with a spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The percentage of auto-aggregation after 30 min was calculated as follows:

$$\% \text{ auto-aggregation} = ((OD0 \text{ min} - OD30 \text{ min})/OD0 \text{ min})/OD0 \text{ min} \times 100$$

where OD0 min is the initial OD_{600 nm} at T = 0 and OD30 min is the final OD_{600 nm} after 30 min.

The potential auto-aggregation and structure of *L. crispatus* CIP104459 was also studied by flow cytometry with a CytoFlex S flow cytometer (Beckman coulter Life science, Indianapolis, USA) and the CytExpert software. After 18 h of culture in the presence or absence of 17β-estradiol, the bacterial suspension was harvested by centrifugation as previously described and resuspended in PBS. Bacteria were not stained and aliquots (200 μL) were distributed into 96-well microplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). After incubation in static condition for 30 min, the samples were subjected to flow cytometry. At least 10,000 events at OD_{488 ± 4 nm} (SSC channel) and OD_{525 ± 20 nm} (FSC channel) were recorded at a flow rate of 10 μL.min⁻¹ for each treatment. Data were analyzed with Cytexpert software. The percentage of the population forming aggregates corresponded to the fraction of events appearing in the Q1-UR quarter of the graph (red zone). Size is given by the FSC-A (horizontal) axis and the percentage of small bacteria appearing in the Q1-UL and Q1-LL zones.

Surface granulometry is plotted on the SSC-A (vertical) axis. Increases in complexity appear in the Q1-UL and Q1-UR areas of the graph. Measurements were performed in triplicate.

The precise morphology of *L. crispatus* CIP104459 was studied by scanning electron microscopy with a TENE0 VolumeScope microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) running at 10 kV. *L. crispatus* cultured for 18 h in the absence (control) or presence of 17 β -estradiol was collected by centrifugation (7500 \times g, 10 min). For fixation, bacterial pellets were immersed in 1 mL 2.5% glutaraldehyde in 1 M phosphate buffer, pH 7.1 for 1 h. Samples were prepared as previously described⁶⁵. After treatment with HMDS (hexamethyldisilazane), the surface of the filter was coated with an electrically conductive 25 nm thick layer of platinum alloy coating in a sputter-coater vacuum chamber (LEICA EM ACE600 sputter coater, Wetzlar, Germany).

Evaluation of biosurfactant production. Cultures on MRS agar in Petri dishes showed that *L. crispatus* CIP104459 grew in the presence of 17 β -estradiol, spreading out and flowing over the surface of the culture medium, consistent with biosurfactant production. Petri dishes containing MRS agar were then inoculated by spreading 100 μ L of control or 17 β -estradiol treated bacterial suspensions over the surface to obtain a continuous bacterial lawn. As described by Meylheuc et al.⁴¹, we gently scraped the bacterial lawn formed after 24 h of anoxic culture at 37 °C in the presence or absence of 17 β -estradiol off the plate and resuspended it in 15 mL Volvic water. The suspension was vortexed for 3 min to solubilize the biosurfactant molecules and centrifuged twice, for 30 min each, at 4 °C and 10,000 \times g to remove all bacteria and bacterial fragments. Control solutions were generated by scraping and rinsing the surface of sterile MRS agar Petri dishes, with or without 17 β -estradiol supplementation. The supernatant was collected and stored at 4 °C.

The presence of biosurfactant in the solution was first investigated by the sessile drop technique⁶⁶, by depositing 20 μ L drops of supernatant on a polystyrene surface and visualizing the angle of contact with the surface. The measurement of this contact angle can be used to calculate the surface tension between the solution and the surface. However, this value is influenced by the properties of the surface, and we therefore preferred to use another approach: the pendant drop method. The shape of the drops of supernatant was analyzed with a drop shape analyzer, a DSA30 controlled temperature tensiometer equipped with a video camera (Kruss, Hamburg, Germany). The surface tension, or interfacial tension, was calculated with the drop shape analysis software of the tensiometer, according to the Young–Laplace equation⁶⁷. Potential variations due to the bacterial biomass collected were taken into account, by calculating the correlation between surface tension values and the OD_{600 nm} of the bacterial suspension measured immediately after the scrapping of the bacterial lawn off the Petri dishes. 17 β -estradiol had no influence on the surface tension of pure water.

Measurement of bacterial adhesion to vaginal cells. The adhesion of *L. crispatus* CIP104459 to vaginal cells was studied in vitro with the VK2/E6E7 cells line (ATCC CRL-2616). This vaginal cell line was developed from the vaginal mucosal tissue of a healthy pre-menopausal woman. It was maintained and propagated in keratinocyte serum-free medium (KSFM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), supplemented with 0.05 mg/mL bovine pituitary extract, 0.1 ng/mL human recombinant EGF and additional calcium chloride (44.1 mg/mL), as recommended by the manufacturer. Cells were transferred to fresh medium every three days after reaching confluence. For the evaluation of bacterial adhesion, VK2/E6E7 cells were exposed to *L. crispatus* CIP104459 cultured for 18 h in MRS medium with or without 17 β -estradiol at an MOI of 100 bacterial/cell. Experiments were performed with antibiotic free KSFM and VK2/E6E7 cells grown to at least 80% confluence. After 1 h of bacterial interactions, the medium was gently removed to withdraw the planktonic bacteria and the surface of the plate was rinsed carefully with antibiotic free KSFM. The attached VK2/E6E7 cells were disrupted by adding of 0.1% Triton X-100 in PBS. The lysate was diluted in MRS medium and plated on MRS agar Petri dishes. The number of bacteria adhering to cells was deduced directly by counting the number of *L. crispatus* colonies after 48 h of culture at 37 °C in anoxic conditions.

Determination of biofilm formation activity and structure. Biofilm formation by *L. crispatus* CIP104459 was initially studied with the crystal violet technique according to a procedure adapted from that of O’Toole⁶⁸. The OD_{600 nm} of bacteria grown in MRS medium for 48 h was adjusted to 0.1 in a final volume of 1 mL, and the bacterial suspension was dispensed into sterile 24-well polystyrene plates (Falcon, Durham, USA). The plates were incubated in anoxic conditions at 37 °C without shaking for 48 h in a Whitley A85 Workstation. At the end of the incubation period, the OD_{600 nm} was measured, to determine the culture biomass. The medium was removed by aspiration and non-adherent bacteria were eliminated by washing twice in physiologic water (PW, NaCl 0.9%). Biofilms were stained by incubation with crystal violet (CV, 0.1% w/v in sterile pure 18.2 M Ω water) for 10 min at room temperature. Excess dye was removed by three washes in pure 18.2 M Ω water. The crystal violet adsorbed by the biofilm matrix and the bacteria was dissolved in absolute ethanol (1 mL/well, 10 min incubation) and the OD_{595 nm} of the solution was determined with an automated plate reader (Te-Cool, Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Results are expressed as a percentage of the amount of biofilm formed in control conditions, as follows:

$$\% \text{ control biofilm} = \left[\frac{(\text{AssayOD}_{595 \text{ nm}} / \text{AssayOD}_{600 \text{ nm}})}{(\text{ControlOD}_{595 \text{ nm}} / \text{Control OD}_{600 \text{ nm}})} \right] \times 100$$

where “AssayOD_{595 nm}” is the OD_{595 nm} of the test CV solution, “AssayOD_{600 nm}” is the initial OD_{600 nm} of the assay culture, “ControlOD_{595 nm}” is the OD_{595 nm} of the Control CV solution and “ControlOD_{600 nm}” is the initial OD_{600 nm} of the control culture.

L. crispatus CIP104459 cultured in MRS medium was unable to adhere and form biofilms on glass, as required for optical microscopy. A more complete medium, specific for microorganisms of the vaginal microflora,

“simulating genital tract secretion” (SGTS) medium, was therefore used, as described by Geshnizgani and Onderdonk⁴² (Table 1). *L. crispatus* CIP104459 was precultured in MRS and then transferred to SGTS medium for biofilm studies. 17 β -estradiol, or an equivalent amount of ethanol in water, was added to the medium from the start of the biofilm formation study. We checked that 17 β -estradiol had no effect on *L. crispatus* CIP104459 growth in SGTS medium in preliminary studies (Suppl. Fig. 4). For confocal microscopy, bacteria were harvested by centrifugation (7500 \times g, 10 min) and resuspended in SGTS medium at an OD_{600 nm} of 0.1. Aliquots (1 mL) of suspension, with or without 17 β -estradiol, were added to 24-well microplates with flat glass bottoms (Sensoplate, Greiner Bio-One, Germany), which were incubated for 48 h in anoxic conditions, without shaking, for biofilm formation. Wells were washed twice with PW to remove the remaining planktonic bacteria, and biofilms were stained with SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Stained samples were examined under an LSM 710 inverted confocal laser scanning microscope (Zeiss, Marly-le-Roi, France) with the Zen 2009 software package (version 12.0.1.362). Images were reconstructed and analyzed with COMSTAT2 software. The mean thickness (μ m), biomass volume (μ m³/ μ m²) and roughness coefficient of the biofilm were calculated for a least 30 observations per treatment. All experiments were performed at least of three times.

Bioinformatic studies. As a steroid, 17 β -estradiol is an amphiphilic molecule with no reactive groups capable of directly forming covalent conjugates with dyes or tracers. Furthermore, minor chemical modifications can greatly affect its functions, due to its small size. Isotope incorporation remains the only available technique for experimental assessment of its binding to potential receptors, but this technique is subject to heavy regulatory constraints. We therefore used bioinformatics approaches to investigate potential 17 β -estradiol binding site(s) in *L. crispatus*. We used BLASTp on ExPASy (<https://web.expasy.org/blast>) to align the draft genome of *L. crispatus* CIP104459³⁴ with the annotated sequence of *L. crispatus* CO3MRS1⁴³, to improve its definition. The FASTA amino-acid sequence of the *L. crispatus* CIP104459 genome was then aligned with the sequences of the known human estrogens receptors listed in Table 2. A bacterial protein displaying high similarity and identity to human estrogens receptors was identified and subjected to molecular docking in silico with 17 β -estradiol as potential ligand. We generated 3D models of *L. crispatus* proteins with RaptorX Structure⁶⁹ and visualized them with Python Molecular Viewer V1.5.6. Predictions were based on alignments with the crystalized structure of the corresponding eukaryotic ortholog. The potential binding of 17 β -estradiol to the identified sensor protein was studied with AutoDock 4.2⁴⁴. Binding values were generated with the Lamarckian Genetic Algorithm of AutoDock 4.2. All calculations were performed with a DELL Precision T7610 computer equipped with four hard disks (4 Tb each, giving a total of 12 Tb under RAID5).

Statistical analysis. Statistical significance was evaluated with Prism GraphPad online tool (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). Data were analyzed in unpaired (two sample) two-tailed *t* tests. Means and the standard error of the mean (SEM) were calculated and plotted.

Ethics approval and consent to participate. Not applicable, as this study did not involve a clinical trial.

Consent for publication. All the authors have read and approved the manuscript. LMSM agrees to be responsible for paying the publication fees.

Data availability

All experimental raw data are available, upon simple demand from the authors.

Received: 23 November 2020; Accepted: 18 March 2021

Published online: 30 March 2021

References

- Blum, H. E. The human microbiome. *Adv. Med. Sci.* **62**, 414–420 (2017).
- Spor, A., Koren, O. & Ley, R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 279–290 (2011).
- Costello, E. K., Stagaman, K., Dethlefsen, L., Bohannan, B. J. & Relman, D. A. The application of ecological theory toward an understanding of the human microbiome. *Science* **336**, 1255–1262 (2012).
- The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **486**, 207–214 (2012).
- Buchta, V. Vaginal microbiome. *Ceska Gynekol.* **83**, 371–379 (2018).
- Myhre, A. K., Bevanger, L. S., Berntzen, K. & Bratlid, D. Anogenital bacteriology in non-abused preschool children: a descriptive study of the aerobic genital flora and the isolation of anogenital *Gardnerella vaginalis*. *Acta Paediatr.* **91**, 885–891 (2002).
- Hickey, R. J. *et al.* Vaginal microbiota of adolescent girls prior to the onset of menarche resemble those of reproductive-age women. *mBio* **6**, e00097–15 (2015).
- Borges, S., Silva, J. & Teixeira, P. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch. Gynecol. Obst.* **289**, 479–489 (2014).
- Ravel, J. *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **108**(Suppl 1), 4680–4687 (2011).
- Rampersaud, R., Randis, T. M. & Ratner, A. J. Microbiota of the upper and lower genital tract. *Sem. Fetal Neonat. Med.* **17**, 51–57 (2012).
- Brotman, R. M. *et al.* Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause* **21**, 450–458 (2014).
- Cauci, S. *et al.* Prevalence of bacterial vaginosis and vaginal flora changes in peri- and postmenopausal women. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2147–2152 (2002).

13. Farage, M. A. & Maibach, H. I. Morphology and physiological changes of genital skin and mucosa. *Curr. Prob. Dermatol.* **40**, 9–19 (2011).
14. O'Hanlon, D. E., Moench, T. R. & Cone, R. A. Vaginal pH and microbicidal lactic acid when lactobacilli dominate the microbiota. *PLoS ONE* **8**, e80074 (2013).
15. Cone, R. A. Vaginal microbiota and sexually transmitted infections that may influence transmission of cell-associated HIV. *J. Infect. Dis.* **210**(Suppl 3), S616–S621 (2014).
16. Aldunate, M. *et al.* Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* **6**, 164 (2015).
17. Boris, S. & Barbes, C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microb. Infect.* **2**, 543–546 (2000).
18. Ceresa, C. *et al.* Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *J. Appl. Microbiol.* **118**, 1116–1125 (2015).
19. Zakaria Gomaa, E. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **59**, 425–436 (2013).
20. Famularo, G., Perluigi, M., Coccia, R., Mastroiacovo, P. & De Simone, C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Med. Hypotheses* **56**, 421–430 (2001).
21. Buggio, L., Somigliana, E., Borghi, A. & Vercellini, P. Probiotics and vaginal microecology: fact or fancy?. *BMC Women Health* **19**, 25 (2019).
22. Farage, M. & Maibach, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch. Gynecol. Obstet.* **273**, 195–202 (2006).
23. Shen, J. *et al.* Effects of low dose estrogen therapy on the vaginal microbiomes of women with atrophic vaginitis. *Sci. Rep.* **6**, 24380 (2016).
24. Amabebe, E. & Anumba, D. O. C. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. *Front. Med.* **5**, 181 (2018).
25. Lyte, M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol.* **12**, 14–20 (2004).
26. Lesouhaitier, O. *et al.* Gram negative bacterial sensors for eukaryotic signal molecules. *Sensors* **9**, 6967–6990 (2009).
27. Lesouhaitier, O. *et al.* Host peptidic hormones affecting bacterial biofilm formation and virulence. *J. Innate Immun.* **11**, 227–241 (2019).
28. Király, L., Alén, M., Korvola, J. & Horsmanheimo, M. The effect of testosterone and anabolic steroids on the skin surface lipids and the population of *Propionibacteria acnes* in young postpubertal men. *Acta Derm. Venereol.* **68**, 21–26 (1988).
29. Kaliannan, K. *et al.* Estrogen-mediated gut microbiome alterations influence sexual dimorphism in metabolic syndrome in mice. *Microbiome* **6**, 205 (2018).
30. Beury-Cirou, A. *et al.* At a supra-physiological concentration, human sexual hormones act as quorum-sensing inhibitors. *PLoS ONE* **8**, e83564 (2013).
31. Tyrrell, J. & Harvey, B. J. Sexual dimorphism in the microbiology of the CF gender gap: estrogen modulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Steroids* **156**, 108575 (2020).
32. Fteita, D., Könönen, E., Söderling, E. & Gürsoy, U. K. Effect of estradiol on planktonic growth, coaggregation, and biofilm formation of the *Prevotella intermedia* group bacteria. *Anaerobe* **27**, 7–13 (2014).
33. Wang, X. *et al.* Estradiol stimulates the growth and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **96**, 3083–3089 (2016).
34. Clabaut, M. *et al.* Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 isolated from a vaginal swab. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, e01373-e1419 (2020).
35. Fléchar, M. *et al.* The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **8**, 17212 (2018).
36. Dubois-Brissonnet, E., Trotier, E. & Briandet, R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front. Microbiol.* **7**, 1673 (2016).
37. Burlando, B., Marchi, B., Panfoli, I. & Viarengo, A. Essential role of Ca²⁺-dependent phospholipase A2 in estradiol-induced lysosome activation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C1461–C1468 (2002).
38. Vandevoorde, L., Christiaens, H. & Verstraete, W. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 214–219 (1992).
39. Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P. & Oulahal, N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front. Microbiol.* **7**, 1225 (2016).
40. Otzen, D. E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: same but different?. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 639–649 (2017).
41. Meylheuc, T., Van Oss, C. J. & Bellon-Fontaine, M.-N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 822–832 (2001).
42. Geshnizgani, A. M. & Onderdonk, A. B. Defined medium simulating genital tract secretions for growth of vaginal microflora. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1323–1326 (1992).
43. McComb, E., Holm, J., Ma, B. & Ravel, J. Complete genome sequence of *Lactobacillus crispatus* CO3MRS11. *Microbiol. Resour. Announc.* **8**, e01538-e1618 (2019).
44. Morris, G. M. *et al.* Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* **16**, 2785–2791 (2009).
45. Racine, P.-J. *et al.* Dialog between skin and its microbiota: emergence of “Cutaneous bacterial endocrinology”. *Exp. Dermatol.* **29**, 1–11 (2020).
46. Borrel, V. *et al.* Acne and stress: impact of catecholamines on *Cutibacterium acnes*. *Front. Med.* **6**, 155 (2019).
47. Strandwitz, P. *et al.* GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **4**, 396–403 (2019).
48. Huang, Z. & London, E. Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chem Phys. Lipids* **199**, 11–16 (2016).
49. Hosoda, K., Shimomura, H., Hayashi, S., Yokota, K. & Hirai, Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. *FEBS Microbiol. Lett.* **318**, 68–75 (2011).
50. Shimomura, H. *et al.* Detoxification of 7-dehydrocholesterol fatal to *Helicobacter pylori* is a novel role of cholesterol glucosylation. *J. Bacteriol.* **195**, 359–367 (2013).
51. LaRocca, T. J. *et al.* Proving lipid rafts exist: membrane domains in the prokaryote *Borrelia burgdorferi* have the same properties as eukaryotic lipid rafts. *PLoS Pathog.* **9**, e1003353 (2013).
52. López-Lara, I. M. & Geiger, O. Bacterial lipid diversity. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1287–1299 (2017).
53. Borcik, C. G., Versteeg, D. B. & Wylie, B. J. An inward-rectifier potassium channel coordinates the properties of biologically derived membranes. *Biophys. J.* **116**, 1701–1718 (2019).
54. Gil, N. F., Martinez, R. C., Gomes, B. C., Nomizo, A. & De Martinis, E. C. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 6–14 (2010).
55. Chen, X. *et al.* The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 307–312 (2007).
56. Satpute, S. K. *et al.* Biosurfactants from lactobacilli species: properties, challenges and potential biomedical applications. *J. Basic Microbiol.* **56**, 1140–1158 (2016).

57. De Gregorio, P. R. *et al.* Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. *Microb. Cell Fact.* **19**, 133 (2020).
58. Raza, Z. A. *et al.* Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. *Biotechnol. Lett.* **32**, 811–816 (2010).
59. Browman, D. T., Hoegg, M. B. & Robbins, S. M. The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol.* **17**, 394–402 (2007).
60. Lopez, D. & Koch, G. Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Curr. Opin. Microbiol.* **36**, 76–84 (2017).
61. Mirmonsef, P. *et al.* Glycogen levels in undiluted genital fluid and their relationship to vaginal pH, estrogen, and progesterone. *PLoS ONE* **11**, e0153553 (2016).
62. Atassi, F., Pho Viet Ahn, D. L. & Lievin-Le Moal, V. Diverse expression of antimicrobial activities against bacterial vaginosis and urinary tract infection pathogens by cervicovaginal microbiota strains of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*. *Front. Microbiol.* **10**, 2900 (2019).
63. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy* 3rd edn (Springer, 2006). e-ISBN-13: 978-0-387-46312-4.
64. Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & Van Oss, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **7**, 47–53 (1996).
65. Verdon, J. *et al.* Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front. Microbiol.* **7**, 1484 (2016).
66. Drelich, J. Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. *Surf. Innov.* **1**, 248–254 (2013).
67. Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y. C. & Tabor, R. F. Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* **454**, 226–237 (2015).
68. O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.* **47**, 2437 (2011).
69. Källberg, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* **7**, 1511–1522 (2012).

Acknowledgements

The authors would like to thank the Cosmetic Valley world cluster and CNRS GDR CNRS 3711 Cosm'Actifs for their scientific and relational support. This work was supported by the FUI program Gynceutics (BPI, Région Normandie, Région Centre, Région Aquitaine and European Union—FEDER). We thank Julie Sappa (Alex Edelman associates) for careful review of English.

Author contributions

M.C., A.S., P.-J.R., J.V., M.B. and O.M. contributed to the conception of the approach and conducted experiments. A.T., A.L.T., M.K., G.R. and C.D.-P. contributed to the analysis of the data. C.K., C.P., S.C. and M.G.J.F. coordinated the study. M.C., S.C. and M.G.J.F. designed and wrote the manuscript.

Competing interests

The authors have the following interests: Agathe Le Tirant is a member of the Seqens laboratory, Madina Karsybyeva manages the Remedials laboratory, Coralie Kremser works for GyomoPharm, and Gérard Redziniak is the Director of Cosmetic Inventions society. There no product or marketing interest to declare. This disclosure does not alter the authors' adherence to all policies on sharing data and materials, as detailed online in the guidelines for authors. The other authors have no conflict of interest to declare.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86628-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to M.G.J.F.

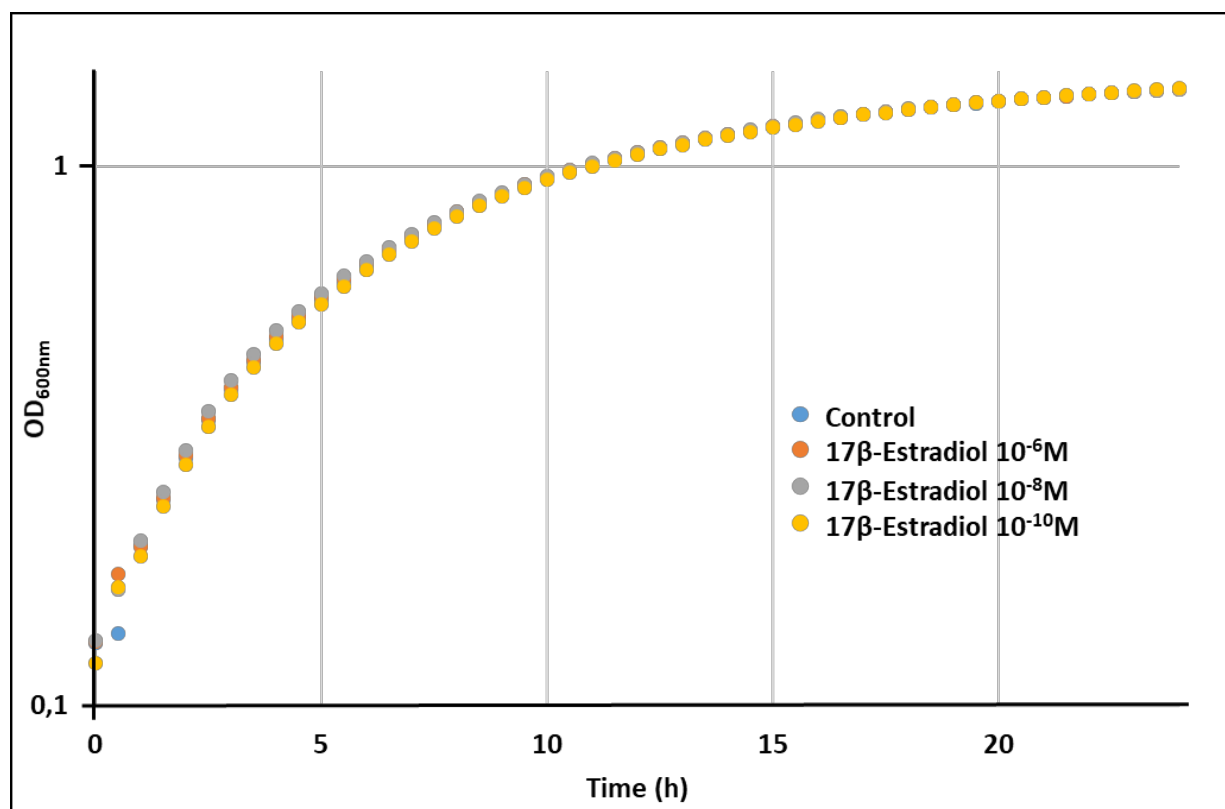
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

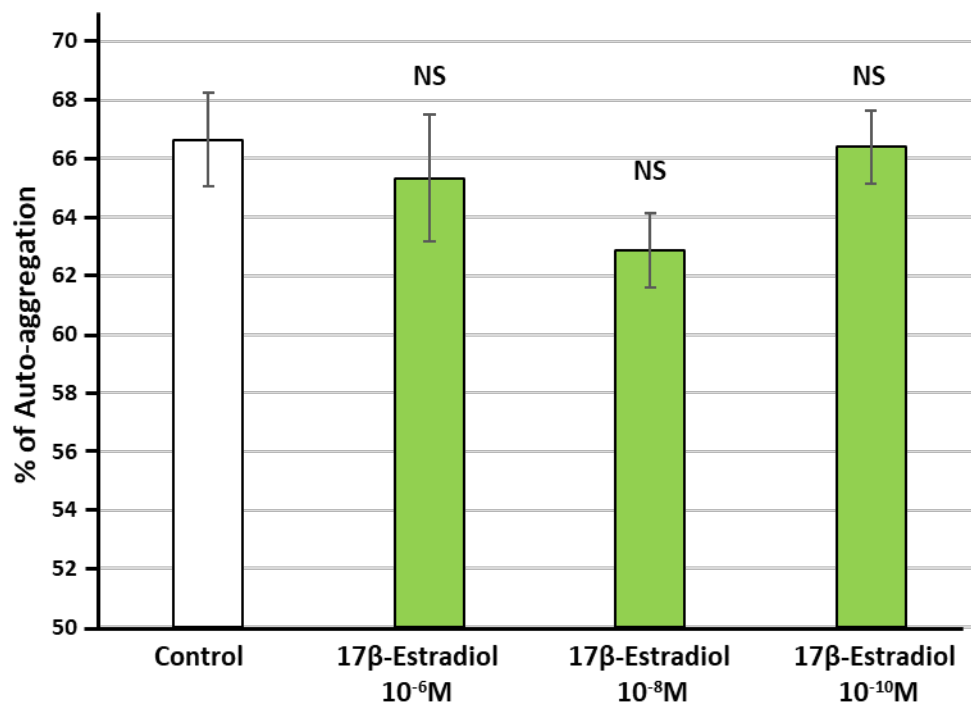


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

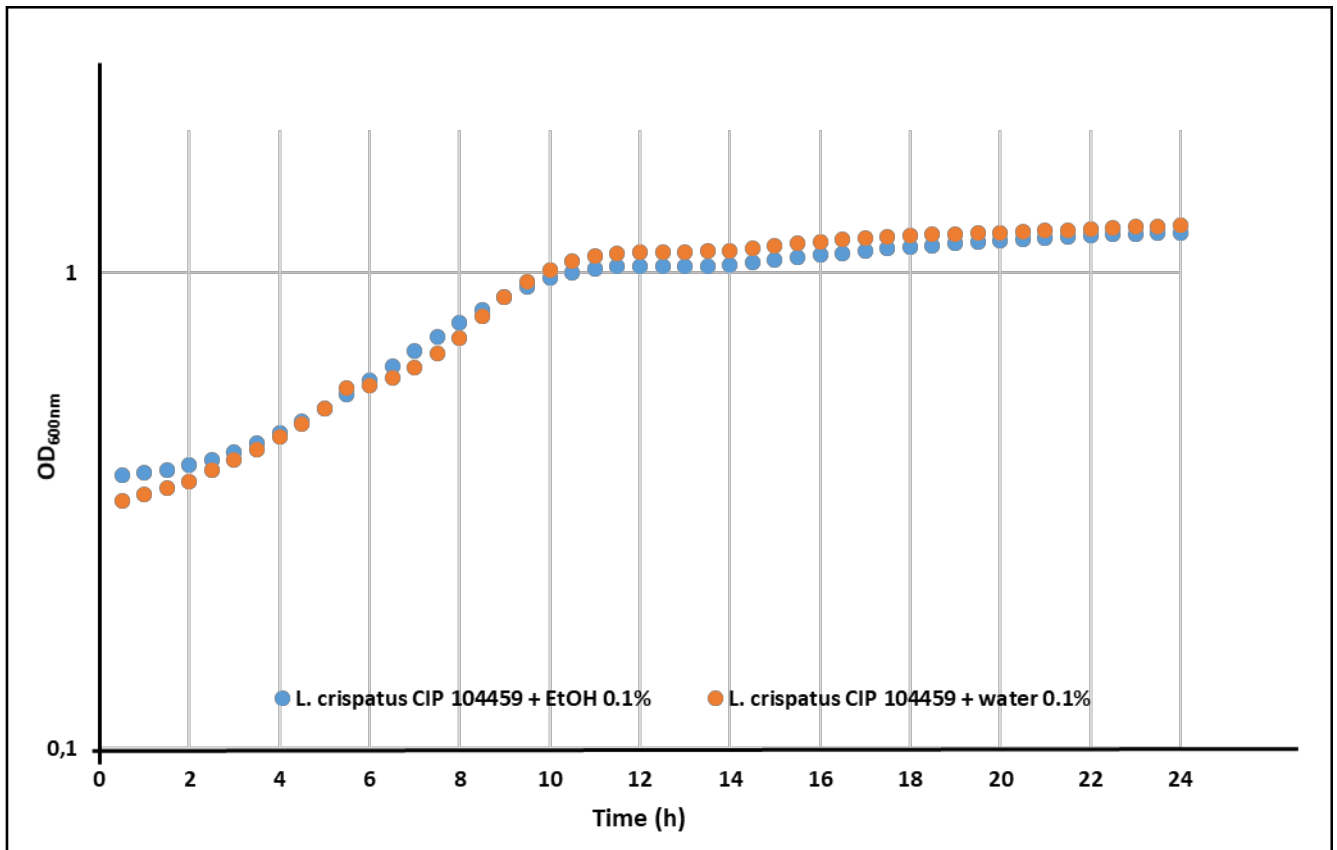
© The Author(s) 2021



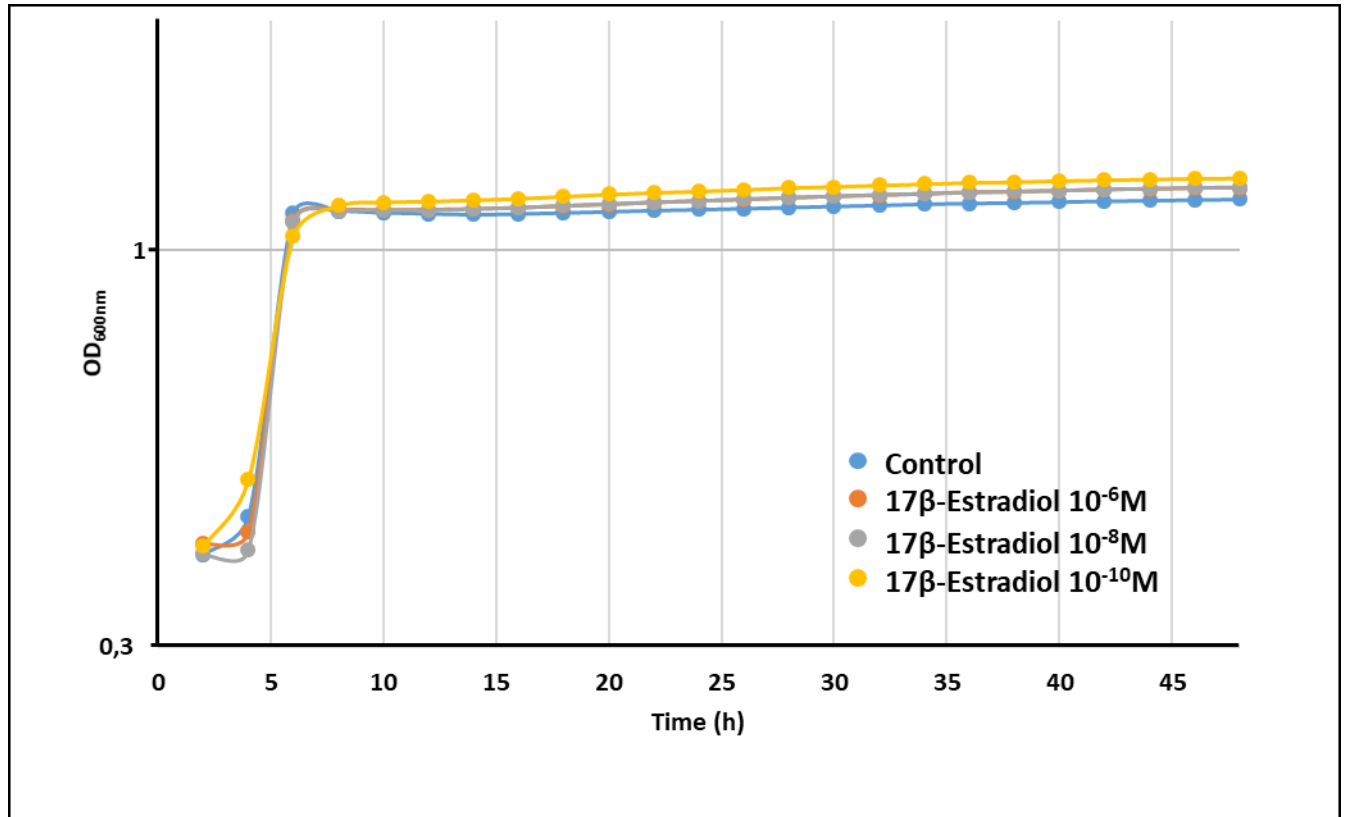
Supplementary Figure 1. Growth kinetics of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 in the presence or absence 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M 17β-estradiol. Bacteria were cultured in MRS broth, in anoxic conditions, at 37°C, for 24h. OD_{600nm} was measured every 15 min, with an automated microplate reader. All data are the mean ± SEM of four independent experiments.



Supplementary Figure 2. Influence of 10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M 17β -estradiol on *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 aggregation potential. The percentage aggregation was measured 30 minutes after pellet resuspension. All data shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. (NS: not significant).



Supplementary Figure 3. Growth kinetics of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 cultured in MRS medium in the presence or absence of ethanol 0.1 %. All data are the mean \pm SEM of four independent experiments.



Supplementary Figure 4. Growth kinetics of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 in simulating genital tract secretion (SGTS) medium in the presence or absence 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M 17β-estradiol. All data are the mean ± SEM of four independent experiments.


Article 3**Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* Strain V4, Isolated from a Vaginal Swab from a Young Healthy Nonmenopausal Woman**

L. crispatus V4 a été isolée en 2018 à partir d'un écouvillon vaginal d'une jeune femme de 35 ans non ménopausée en bonne santé. Ces bactéries ont été collectées sous le contrôle de la CRO Bio-EC (Longjumeau, France). Cet article permet de présenter le séquençage du génome de cette souche, constitué de 2 091 889 pb, avec une teneur moyenne en G+C de 37,02 %.

Clabaut M, Boukerb AM, Racine PJ, Pichon C, Kremser C, Queiroz A, Karsybayeva M, Redziniak G, Chevalier S, Feuilloley MGJ. Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* Strain V4, Isolated from a Vaginal Swab from a Young Healthy Nonmenopausal Woman. *Microbiol Resour Announc.* 2019 Sep 19;8(38):e00856-19. doi: 10.1128/MRA.00856-19. PMID: 31537667; PMCID: PMC6753271.



Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* Strain V4, Isolated from a Vaginal Swab from a Young Healthy Nonmenopausal Woman

Maximilien Clabaut,^a Amine M. Boukerb,^a Pierre-Jean Racine,^a Chantal Pichon,^b Coralie Kremser,^c Aïna Queiroz,^d Madina Karsybayeva,^e Gérard Redziniak,^f Sylvie Chevalier,^a  Marc G. J. Feuilloy^a

^aLaboratoire de Microbiologie Signaux et Microenvironnement (LMSM) EA 4312, Université de Rouen Normandie, Normandie Université, Évreux, France

^bCentre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

^cGimoPharm, Longjumeau, France

^dSeqens, Limoges, France

^eRemedials Laboratoire, Paris, France

^fCosmetic Inventions, Antony, France

ABSTRACT *Lactobacillus crispatus* strain V4 was isolated from a vaginal swab from a healthy nonmenopausal 35-year-old French woman. We report here its draft genome sequence of 2,091,889 bp, with an average G+C content of 37.02%.

Lactobacillus crispatus is one of the dominant lactic acid bacteria (LAB) colonizing the healthy vagina. This bacterium is essential in the maintenance of a healthy vaginal epithelium (1). *L. crispatus* is known to produce antimicrobial compounds, including organic acids, hydrogen peroxide, bacteriocins, and biosurfactants (2). It is also able to modulate the secretion of cytokines and chemokines that enhance the immune response of vaginal epithelial cells (3). Adhesion and establishment of *L. crispatus* on the human vaginal epithelium are prerequisites for its protective role (4). In the first step, *L. crispatus* autoaggregates, leading to the formation of microcolonies on the vaginal epithelium, which then evolve into biofilms, covering the whole ecological niche and providing protection against pathogens (5).

L. crispatus V4 was isolated from a vaginal swab from a young healthy nonmenopausal woman in 2018. These bacteria were collected under the control of the CRO Bio-EC (Longjumeau, France) in agreement with French and European Union ethics guidelines (ARS Biomedical Research agreement 2012-12-010 and Bioethical agreement DC-2008-542). Bacterial isolates were grown anaerobically onto de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) agar plates overnight at 37°C (ISO, VWR reference 84607.0500). Purified bacterial strains were obtained by single-colony isolation. V4 isolates were cultured and later maintained at –80°C using MRS with 20% glycerol.

In the first step, *L. crispatus* strain V4 was identified with total proteome analysis using a Bruker Autoflex III matrix-assisted laser desorption ionization–tandem time of flight (MALDI-TOF/TOF) mass spectrometry instrument coupled to the Biotyper software (6). Subsequently, 16S rRNA sequencing was performed, and the BLAST algorithm allowed sequence comparison with other *L. crispatus* strains reported in the NCBI 16S RefSeq database. Since the 16S rRNA sequence of strain V4 displayed 100% sequence identity with those of *L. crispatus* strains CO3MRS11 and AB70 (GenBank accession numbers CP033426 and CP026503, respectively), strain V4 was identified as belonging to the *L. crispatus* species.

Genomic DNA was extracted from MRS broth *L. crispatus* V4 culture by treating cells with a lysozyme solution (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 2 mM EDTA, 1.2% Triton X-100, 20 mg/ml lysozyme), followed by treatment with a GeneJET genomic DNA purification

Citation Clabaut M, Boukerb AM, Racine P-J, Pichon C, Kremser C, Queiroz A, Karsybayeva M, Redziniak G, Chevalier S, Feuilloy MGJ. 2019. Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* strain V4, isolated from a vaginal swab from a young healthy nonmenopausal woman. *Microbiol Resour Anounc* 8:e00856-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00856-19>.

Editor Catherine Putonti, Loyola University Chicago

Copyright © 2019 Clabaut et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Marc G. J. Feuilloy, marc.feuilloy@univ-rouen.fr.

M.C. and A.M.B. contributed equally to this study.

Received 17 July 2019

Accepted 27 August 2019

Published 19 September 2019

kit (catalog number K0721; Thermo Fisher Scientific). Genomic libraries were prepared with the Nextera XT DNA sample preparation kit (Illumina) and sequenced using v3 chemistry and 2 × 250-bp paired ends on an Illumina MiSeq platform following the manufacturer's instructions (LMSM Évreux, Rouen Normandy University).

Trimmomatic v.0.36 (7) was used to trim the 2,316,108 generated reads. FastQC v.0.11.6 (8) was used to check their quality. Genome assembly was achieved *de novo* with Unicycler v.0.4.7 (9) with default parameters. Quast v.5.0.0 (10) was used to check the consistency of the obtained assembly (i.e., genome size, number of contigs, N_{50} , and G+C content). The final assembly was annotated using Prokka v.1.13.4 (11).

The assembled genome consisted of 252 contigs (coverage, 553×) with a genome size of 2,091,889 bp and an average G+C content of 37.02%, which was consistent with already published *L. crispatus* genome sequences. The largest contig size was 102,546 bp, with an N_{50} value of 18,575 bp. The draft genome harbors 2,177 protein-coding sequences, 65 tRNAs, and 3 rRNA gene clusters. The annotated sequences allowed the identification of putative virulence and antibiotic resistance genes relevant to *Lactobacillus* spp. (12). Subsequent analyses involving comparative genomics will be undertaken in an upcoming study.

Altogether, the availability of the genomic information from strain V4 will improve our understanding of the genetic diversity within the species and the mechanisms involved in microbiome-vaginal health interactions.

Data availability. The draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* V4 has been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under the accession number [SRLG00000000](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/SRLG00000000). The version described in this paper is the first version, SRLG01000000. The raw sequencing data have been deposited in the same database under the accession number [SRR8842498](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/SRR8842498).

ACKNOWLEDGMENTS

M.C. is the recipient of a doctoral grant financed by the FUI GYNCEUTICS program (Region Normandy, BPI). A.M.B. is the recipient of a postdoctoral grant from the Region Normandy and the European Union (FEDER).

The LMSM is a member of the industrial cluster Cosmetic Valley and of CNRS GDR 3711 Cosm'Actifs.

REFERENCES

- Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. 2011. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(Suppl 1):4680–4687. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>.
- Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. 2015. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol* 6:81. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00081>.
- Wessels JM, Felker AM, Dupont HA, Kaushic C. 2018. The relationship between sex hormones, the vaginal microbiome and immunity in HIV-1 susceptibility in women. *Dis Model Mech* 11:dmm035147. <https://doi.org/10.1242/dmm.035147>.
- Borges S, Silva J, Teixeira P. 2014. The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Arch Gynecol Obstet* 289:479–489. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-3064-9>.
- Leccese Terraf MC, Mendoza LM, Juárez Tomás MS, Silva C, Nader-Macias MEF. 2014. Phenotypic surface properties (aggregation, adhesion and biofilm formation) and presence of related genes in beneficial vaginal lactobacilli. *J Appl Microbiol* 117:1761–1772. <https://doi.org/10.1111/jam.12642>.
- Hillion M, Mijouin L, Jaouen T, Barreau M, Meunier P, Lefevvre L, Lati E, Chevalier S, Feuilloley M. 2013. Comparative study of normal and sensitive skin aerobic bacterial populations. *MicrobiologyOpen* 2:953–961. <https://doi.org/10.1002/mbo3.138>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. 2017. Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13:e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>.
- Mikheenko A, Pribelski A, Saveliev V, Antipov D, Gurevich A. 2018. Versatile genome assembly evaluation with QAST-LG. *Bioinformatics* 34:i142–i150. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty266>.
- Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
- Campedelli I, Mathur H, Salvetti E, Clarke S, Rea MC, Torriani S, Ross RP, Hill C, O'Toole PW. 2019. Genus-wide assessment of antibiotic resistance in *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* 85:e01738-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.01738-18>.

Article 4**Variability of human vaginal *Lactobacillus crispatus* response to 17 β -estradiol**

Comme le montrent les séquençages des génomes réalisés, les différentes souches de *L. crispatus* semblent appartenir à un seul groupe phylogénétiquement très hétérogène. Les *L. crispatus*, sont reconnus comme des micro-organismes concurrents d'un large éventail de pathogènes mais, comme cela a été récemment démontré, cette activité antimicrobienne est également dépendante de la souche. Ces différences pourraient expliquer, en partie tout du moins, la variabilité de la protection offerte par *L. crispatus* contre les vaginoses bactériennes. Ces observations sont essentielles et doivent être comprises davantage pour développer des stratégies visant à maintenir ou réimplanter les *L. crispatus* dans l'environnement vaginal, en particulier chez les femmes ménopausées. L'implantation et le maintien de cette espèce sur le long terme, pourraient être favorisés au moins partiellement par l'effet de l'estradiol sur *L. crispatus*, comme nous l'avons montré précédemment pour la souche CIP 104459. En effet, des concentrations sub-micromolaires de 17 β -estradiol peuvent affecter l'homéostasie de la membrane bactérienne et favoriser la production de biosurfactants et l'adhérence aux cellules de la muqueuse de l'épithélium vaginal. L'effet du 17 β -estradiol sur ces phénotypes ne semble pas lié majoritairement à une intégration aspécifique dans la membrane bactérienne, mais plutôt à une réponse adaptative. Toutefois, nos connaissances sur l'impact direct de l'estradiol sur la physiologie des lactobacilles restent très limitées. En outre, les différents effets potentiels de l'hormone sur différentes souches de *L. crispatus* n'ont jamais été étudiés. Cela peut être d'une grande importance puisque les souches vaginales de *L. crispatus* ont des comportements physiologiques différents, ce qui pourrait affecter profondément leur affinité avec la muqueuse vaginale.

Dans la présente étude, nous avons comparé les génomes de souches de *L. crispatus* d'origine vaginale. La réponse de *L. crispatus* V4 vis à vis du 17 β -estradiol a été étudiée en utilisant des approches protéomiques, physiologiques, physicochimiques et morphologiques.

Variability of human vaginal *Lactobacillus crispatus* response to 17 β -estradiol

Maximilien CLABAUT¹, Amine M. BOUKERB¹, Amine Ben MLOUKA², Amandine SUET³, Ali TAHRIOUI¹, Julien VERDON⁴, Magalie BARREAU¹, Olivier MAILLOT¹, Agathe LE TIRANT⁵, Madina KARSYBAYEVA⁶, Coralie KREMSE⁷, Gérard REDZINIAK⁸, Cécile DUCLAIROIR-POC¹, Chantal PICHON³, Julie HARDOUIN², Pascal COSETTE², Sylvie CHEVALIER¹, Marc G.J. FEUILLOLEY^{1*}

¹ Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM EA4312), University of Rouen Normandy, Evreux, France

² Laboratory «Polymères, Biopolymères, Surfaces» (UMR 6270 CNRS), Proteomic Platform PISSARO University of Rouen Normandy, Mont-Saint-Aignan, France

³ Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France

⁴ Laboratoire EBI, UMR CNRS 7267, Université de Poitiers, Poitiers, France

⁵ Seqens' Lab, Porcheville, France

⁶ Remedials Laboratory, Paris, France,

⁷ GymoPharm, Longjumeau, France,

⁸ Cosmetic Inventions, Antony, France

* Correspondence: Marc G.J. Feuilloley, Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironment (LMSM EA 4312), Rouen Normandie Université, 55 rue Saint-Germain 27000 Evreux, France.

Tel: 00 332 32 29 15 42 Fax: 00 332 32 29 15 50 E-mail: marc.feuilloy@univ-rouen.fr

Short title: Variability of 17 β -estradiol activity on vaginal *Lactobacillus crispatus* strains

Key words: Host-bacteria communication – Vaginal homeostasis – Bacterial adhesion – Bacterial virulence – Estrogens – Microbial endocrinology

Key points: We show that the effect of 17 β -estradiol on biosurfactant production and adhesion to vaginal cells by *Lactobacillus crispatus* is preserved in genetically distant strains. These results suggest that 17 β -estradiol agonists should be valuable tools to stabilize *L. crispatus* in the vaginal mucosa.

ABSTRACT

17 β -estradiol was shown to modulate the membrane dynamic and adhesion phenotype of the *Lactobacillus crispatus* strain CIP104459. However, *L. crispatus* is a heterogeneous species and in the present study we investigated the effect of 17 β -estradiol on the recently isolated *L. crispatus* vaginal strain V4. As shown by genomic analysis, *L. crispatus* V4 and CIP104459 are related to different clusters and at the limit of being different subspecies. However, grown in a same medium they express a quite similar pool of proteins. At the opposite of CIP104459, *L. crispatus* V4 was showing a high auto-aggregation phenotype and 17 β -estradiol promoted its aggregation of V4. This effect was associated to important variations of cell surface polarity and Lewis acid/base properties. Also at the opposite of CIP104459, no effect on the membrane dynamic was noted. These results appeared related to the differences of *L. crispatus* S-layer properties and organization. However, as in CIP104459, 17 β -estradiol increased biosurfactant production and adhesion to vaginal cells by *L. crispatus* V4. These results indicate that 17 β -estradiol agonists should be valuable tools to favor a stable re-implantation of *L. crispatus* in the vaginal mucosa.

Introduction

The vaginal microbiota of healthy non-pregnant reproductive aged women is characterized by a limited number of bacterial species, most of which belong to the *Lactobacillus* genus¹, including *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* and *Lactobacillus jensenii*². Among these species, *L. crispatus* is mostly represented³. However, the *L. crispatus* species is itself very heterogeneous, as shown by whole genome sequencing⁴. In addition, there seems to be a competition exerted between *L. crispatus* variants, resulting into a mutual exclusion, leading consequently to a highly homogeneous population of the same cluster in a vaginal niche⁴. *Lactobacillus*, and particularly *L. crispatus*, are known as beneficial microorganisms able to antagonize a large range of pathogens but, as recently demonstrated, this antimicrobial activity is also strain dependent⁵. These differences could explain the variability of the protection provided by *L. crispatus* against bacterial vaginosis⁶.

These observations are essential since different strategies have been developed to maintain or re-implant *L. crispatus* in the vaginal microbiota, particularly in post-menopausal women, but are difficultly successful over a long time⁷. A possible reason is the direct effect of estradiol on *L. crispatus*. As recently demonstrated using the Pasteur reference strain *L. crispatus* CIP104459 from the Pasteur Institute Collection, sub-micromolar concentrations of 17 β -estradiol can affect the bacterial membrane homeostasis and promote biosurfactant production leading to an increased adhesion to vaginal epithelium mucosa cells⁸. The effect of 17 β -estradiol on these phenotypes was not due to an aspecific integration in the bacterial membrane but rather to signal transduction and adaptive response. The membrane lipid rafts-associated SPFH domain containing protein, showing homology with the eukaryotic estrogen-related receptor gamma (ERR3) and the estradiol binding protein prohibitin-2 (PHB2), was even identified as a putative 17 β -estradiol bacterial sensor using a bio-informatic approach based on *L. crispatus* CIP104459 genome⁸. However, our knowledge of the direct impact of estradiol on *Lactobacillus* physiology

remains very limited and particularly the potential differences of responses of *L. crispatus* variants was never investigated. This is can be of high importance since vaginal *L. crispatus* variants express different glycosyltransferase genes, which could deeply affect their affinity to glycogen and vaginal mucosa⁹. In addition, as demonstrated for skin associated bacteria, their response to host factors can be very different between strains and even ribotypes¹⁰.

In the present study, we took advantage of the identification and availability of the draft genome sequence of a new vaginal strain of *L. crispatus*, designated as V4¹¹, to compare its genome to that of other *L. crispatus* strains from vaginal origin, and particularly to the *L. crispatus* CIP104459 Pasteur reference strain¹². The response of *L. crispatus* V4 to 17 β -estradiol was subsequently studied using proteomic, physiological, physicochemical, and morphological and cell binding approaches.

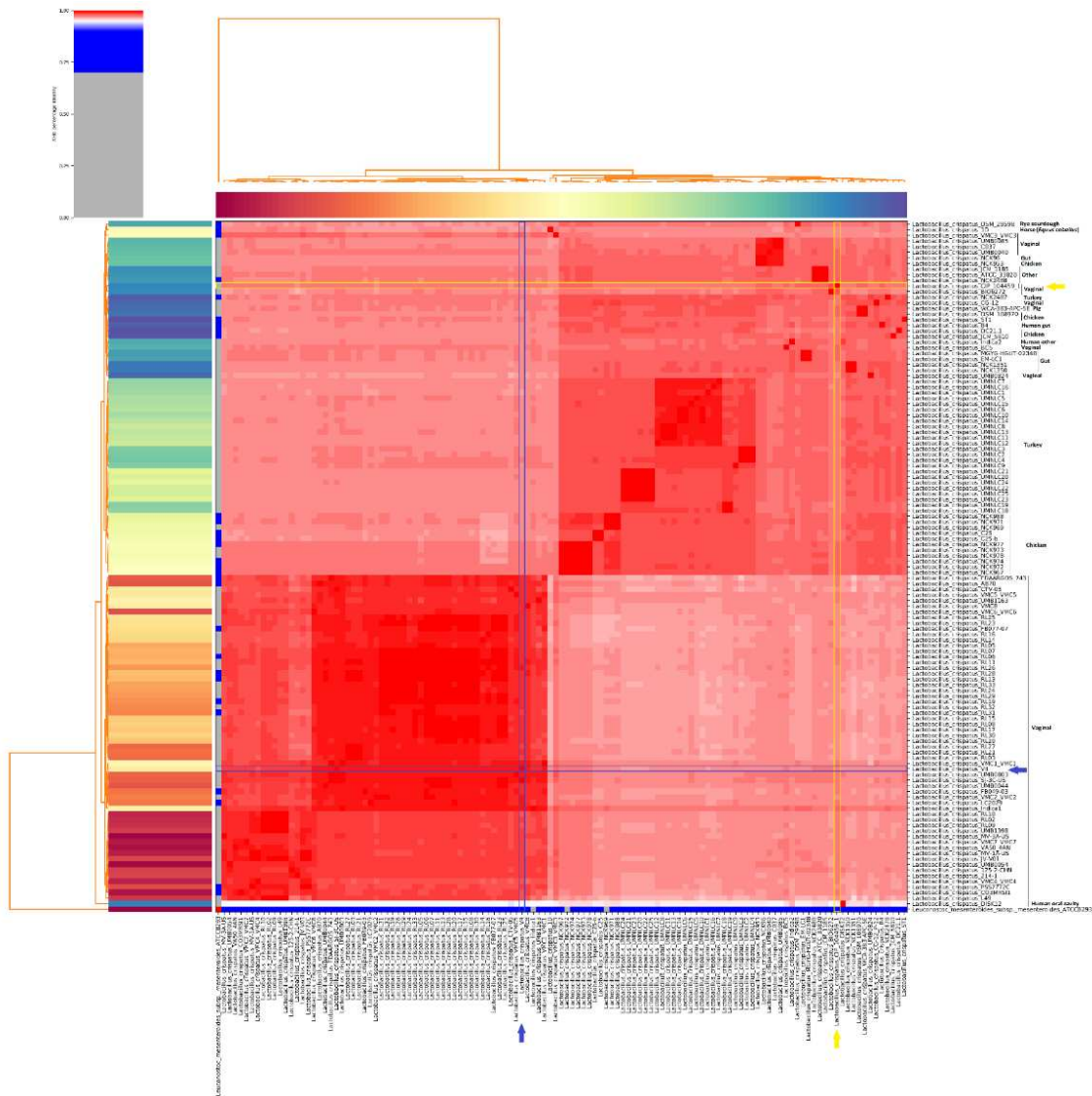


Figure 1. Heatmap and dendrogram of average nucleotide identity (ANI) illustrating the phylogenetic relationships based on the percentage identity (high red to low blue/grey) shared between *Lactobacillus crispatus* V4 whole genome sequence (blue boxes and arrows) and 122 other vaginal *Lactobacilli* whose genome sequences were accessible in the NCBI RefSeq database (accessed on 3rd November, 2020) including the *Lactobacillus crispatus* CIP104459 from Clabaut *et al.*¹² (yellow boxes and arrows). The phylogenetic tree was rooted using the genome sequence of an unrelated bacterial species, presently *Leuconostoc mesenteroides* subspecies *mesenteroides* ATCC8293.

Results

Phylogenetic relationships of *L. crispatus* V4 with other vaginal *Lactobacillus*.

The sequenced genome of *L. crispatus* V4¹¹ was compared to that of 122 *L. crispatus* strains from whose genomes were accessible in the RefSeq NCBI Reference Sequence Database (accessed on November 3rd, 2020). The percentage of shared average identity of *L. crispatus* V4 core genome with that of the strain *L. crispatus* CIP104459, whose response to 17 β -estradiol was previously studied⁸, reached only 97.42 % (**Suppl. Table 1**). The Genome-to-Genome Distance Calculator analysis indicated an in silico DNA-DNA hybridization (isDDH) at 78.70%. Both results suggest a quite distant genomes but located within the same bacterial species. As shown in **Figure 1**, the two strains were separated by a marked distance and were related to different phylogenetic clusters. While *L. crispatus* CIP104459 was close to human and animal strains from diverse origins, *L. crispatus* V4 appeared related to typical human vaginal strains. Whole genomes alignments of *L. crispatus* V4 and *L. crispatus* CIP104459 strains, that contain 2178 and 2034 open reading frames (ORF), respectively (**Figure 2**), was performed. The core genome shared by the two strains was limited to 1638 ORF (corresponding to 77.96 % of the average complete genomes), while a high number of genes were unique to *L. crispatus* V4 or CIP104459 (540 and 386, respectively). Noticeably, full-length copies of gene sequences similar to the *glgX* gene encoding a glycogen debranching enzyme designated as a type 1 pullulanase, were present in the genome sequence of *L. crispatus* V4 and CIP104459. After Prokka-based genome annotation and manual curation, the genome sequence of both strains also contains genes encoding other putative glycosyltransferases, sharing *csbB*, *epsH* and *glyD* in addition to *epsF* in *L. crispatus* V4 and *epsE1* in *L. crispatus* CIP104459.

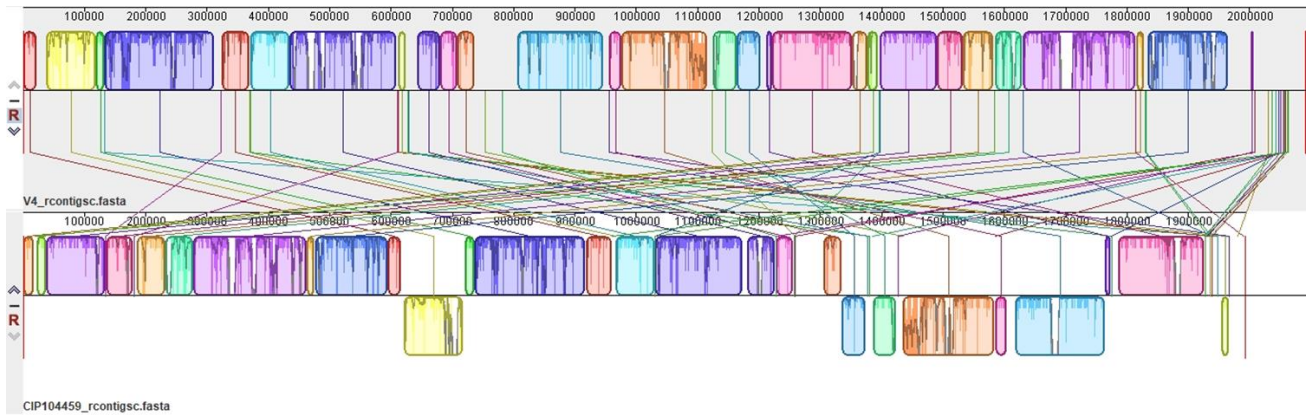


Figure 2. Comparative genome synteny between *Lactobacillus crispatus* V4 and *Lactobacillus crispatus* CIP104459. Homologous regions are identified as locally collinear blocks (LCBs). White regions correspond to sequences that are not aligned and probably contain sequence elements specific of a particular genome. Flipped blocks indicates a reverse complement (inverse) orientation.

***L. crispatus* V4 proteome analysis**

A proteomic analysis was performed by nano LC-MS/MS on total proteins produced by bacteria. In our experimental conditions, 420 ± 6 different proteins were identified from *L. crispatus* V4 extracts. Proteins identified in the *L. crispatus* V4 core proteome (374) were related to 14 different functions, including DNA synthesis, transcription and regulation (25), translation, ribosomal structure and biogenesis (73), posttranslational modification, protein turnover and chaperones (32), energy production and conversion (21), carbohydrate transport and metabolism (56), amino-acid transport and metabolism (46), nucleotide transport and metabolism (15), inorganic ion transport and metabolism (3), fatty acid and phospholipid metabolism (11), secretion and export (1), membrane function (1), S layer, cell wall and envelope biogenesis (16), adaptation and protection (32). Hypothetical proteins (42) were also detected (**Suppl. Table 2**). The total number of proteins extracted from *L. crispatus* CIP104459 was quite similar (409 ± 4). However, looking in details to these proteins revealed that only 246 (out of 420, *i.e.* 58.5 %) of proteins identified in *L. crispatus* V4 were found in *L. crispatus* CIP104459 proteome whereas 332 proteins of CIP104459 (81.1 %) were detected in the V4 proteome. Important differences of expression level were noted between proteins identified in V4 and CIP. On the 332 proteins of V4 proteome common to V4 and CIP104459, 226 showed a fold change >2 . The majority of these proteins (80.5 %) were overexpressed in V4 (**Suppl Table 3**). Remarkably, only one protein involved in protein secretion, the dipeptide-binding protein DppE was differently expressed in V4 (x6.41). Two membrane proteins were overexpressed, and particularly the oligopeptide-binding protein OppA (x242.12). Envelope associated proteins, such as FtsZ, also appeared up-regulated in V4. Quantification of proteins expressed by *L. crispatus* V4 in the absence or presence of 17β -estradiol revealed very limited differences. No variation of protein expression over 2 folds, considered as the significance limit, was observed between *L. crispatus* V4 exposed or not to 17β -estradiol 10^{-8}

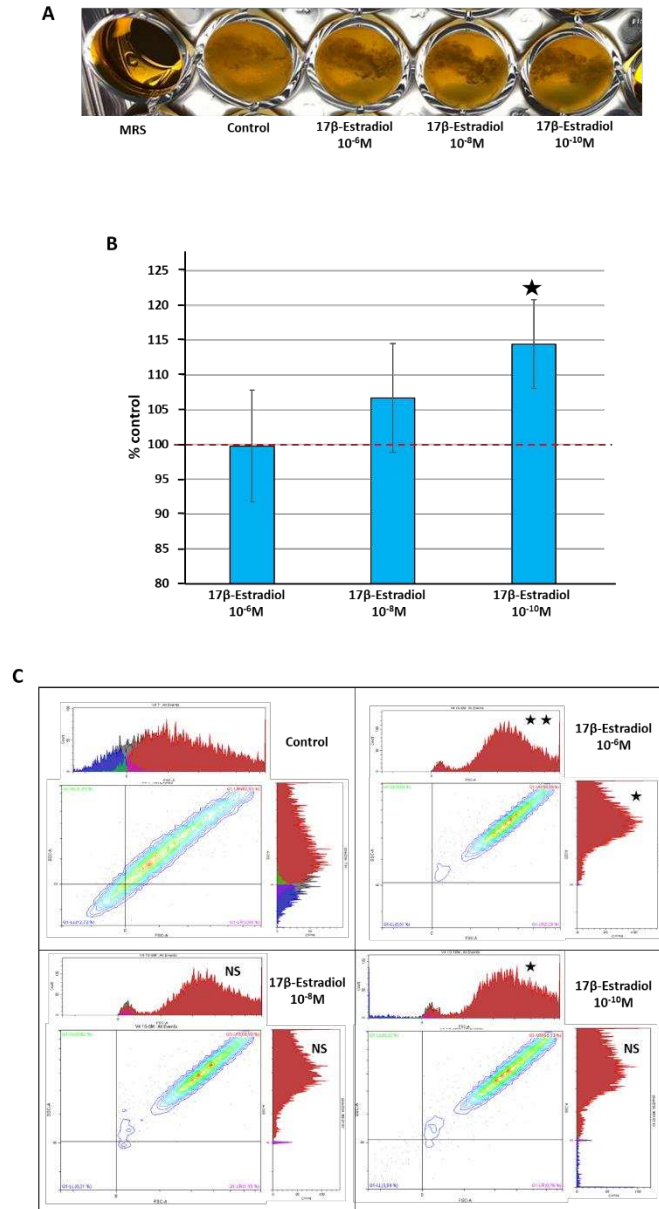


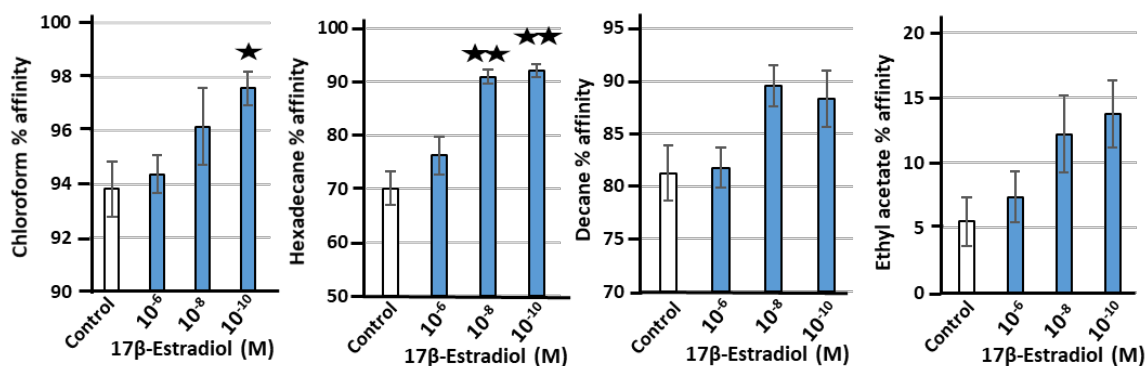
Figure 3. Effect of 17β-estradiol on the aggregation potential of *Lactobacillus crispatus* V4. (A) Typical aspect of *L. crispatus* V4 cultures showing the formation of dense aggregates in the presence of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M). (B) Quantification of aggregates formation by *L. crispatus* V4 grown in the presence of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M), by the sedimentation technique. The red dotted line represents aggregates formation in control MRS medium. (C) Flow cytometry diagrams illustrating the effect of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) on the mean size and aggregation (X axis = forward scattering fraction (FSC)) and surface heterogeneity (Y axis = side scatter (SSC)) of the bacteria. Values are the means ± SEM of a minimum of three independent studies. (NS: not significant; ★ = $p < 0.05$; ★★ = $p < 0.01$).

M and only one protein, the elongation factor G (MHJPMHAL_00289), showed an increase >2 after exposure to 17 β -estradiol 10⁻¹⁰ M (+2.079).

17 β -estradiol affects *L. crispatus* V4 aggregation phenotype.

Preliminary studies showed that 17 β -estradiol at 10⁻⁶ to 10⁻¹⁰ M did not affect the growth kinetic of *L. crispatus* V4 (**Suppl Fig. 1A**). *Lactobacillus* can spontaneously form aggregates and *L. crispatus* is one of the species with the highest potential¹³. As shown in **Figure 3A**, the aggregation potential of *L. crispatus* V4 was visibly increased after exposure to 17 β -estradiol. This aggregation phenotype was quantified using the sedimentation technic¹⁴ (**Fig. 3B**). An inversed dose related effect of 17 β -estradiol was observed. Whereas 17 β -estradiol at 10⁻⁶ M had no detectable effect, a non-significant increase of the aggregation phenotype was observed with bacteria exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁸ M. 17 β -estradiol at 10⁻¹⁰ M led to a significant stimulation of *L. crispatus* V4 aggregation that reached 114.4 \pm 6 % of the control ($p < 0.05$). The aggregation phenotype of *L. crispatus* V4 was investigated further by flow cytometry analysis (**Fig 3C**). The detected structures mean size is plotted on the horizontal axis (forward scattering fraction of the light, FSC) whereas the surface heterogeneity (granularity) given by the light side scatter (SSC) appears on the vertical axis¹⁵. When bacteria were exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁶ M a significant increase of particles mean size was observed (+ 20.76 \pm 0.5 % of the control; $p < 0.01$). It is interesting to note that the signal was cleaved into two peaks, the smaller one corresponding probably to isolated bacteria. In parallel, the surface heterogeneity of detected particles increased in comparison to the control ($p < 0.05$). A same tendency was observed with bacteria exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁸ M. As previously observed, the FSC signal was found splitting in two peaks while the surface heterogeneity resumed to a unique group, while the differences were statistically not significant. Bacteria treated with 17 β -estradiol at 10⁻¹⁰ M showed a same phenotype. In addition as observed with 17 β -estradiol at 10⁻⁶ M, the increase of high size particles (aggregates) was significant ($p < 0.05$).

A



B

	Control	17β-Estradiol 10 ⁻⁶ M	17β-Estradiol 10 ⁻⁸ M	17β-Estradiol 10 ⁻¹⁰ M
$\Delta_{\text{basicity}} \pm \text{SEM}$	24 ± 3.13	18 ± 3.57	5 ± 1.43 ★★	5 ± 1.25 ★★
$\Delta_{\text{acidity}} \pm \text{SEM}$	76 ± 2.62	74 ± 1.98	77 ± 2.97	75 ± 2.70
Lewis acid/base properties	Basic	Basic	Strongly acid	Strongly acid

Figure 4. Effect of 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M) on the affinity to solvents and Lewis acid/base surface properties of *Lactobacillus crispatus* V4. (A) Partition between water and chloroform. (B) Partition between water and hexadecane. (C) Partition between water and decane. (D) Partition between water and ethyl acetate. (E) Lewis acid/base behavior of *L. crispatus* V4 with the two solvents couples hexadecane (HD)/chloroform (CH) and decane (DE)/ethyl acetate (EA). Values are the means ± SEM of three independent studies. (★ = $p < 0.05$; ★★ = $p < 0.01$).

17 β -estradiol affects the surface polarity and Lewis acid/base behavior of *L. crispatus* V4.

Considering the key role of *Lactobacilli* ultra-surface in the aggregation phenotype¹⁶, the surface polarity of *L. crispatus* V4 was studied by the microbial affinity to solvents (MATS) assay. This bacterium showed high affinity to apolar solvents, particularly to chloroform (94.0 ± 1.0 %) and decane (81.0 ± 2.6 %). Conversely, its affinity to ethyl acetate, a more polar solvent, remained limited (6.0 ± 1.9 %) (**Fig. 4A**). Exposure to 17 β -estradiol induced a general increase of *Lactobacilli* affinity to solvents. This was particularly the case for the affinity to hexadecane and chloroforme, which showed a significant increase. As previously observed studying the aggregation phenotype, the dose related effect of 17 β -estradiol was inverted in most of the cases and 17 β -estradiol at 10^{-10} had the most important effect on *L. crispatus* V4 surface polarity. Calculation of the Lewis acid/base ratio using the two solvent couples hexadecane/chloroform and decane/ethyl acetate revealed that these evolution of bacterial surface hydrophobicity were associated to major variations of the electron donor/acceptor character. While the surface of control bacteria was basic, a 17 β -estradiol exposure made this surface was highly acid ($p < 0.01$) (**Fig. 4B**).

17 β -estradiol displays no effect on *L. crispatus* V4 membrane fluidity.

To go further into the potential effects of 17 β -estradiol on the surface of *L. crispatus* V4, the impact of the steroid on membrane integrity was studied by fluorescence anisotropy. Membrane anisotropy can be measured after incorporation of a fluorescent probe within the cell membrane and reflects its degree of organization. In a first set of experiment, this parameter was assessed in *L. crispatus* V4 exposed for 18 h to 17 β -estradiol (at 10^{-6} , 10^{-8} or 10^{-10} M) from the onset of the experiment to the beginning of the stationary growth phase (**Fig. 5A**). Minor variations were observed, but the overall organization degree of *Lactobacilli* membrane remained apparently unchanged. . In *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa*, the bacterial membrane was shown to evolve during growth in planktonic cultures in particular in terms of fatty acids composition, which may lead to membrane fluidity variations¹⁷. Since 17 β -estradiol could integrate into phospholipid membranes as an amphiphilic molecule, it may affect

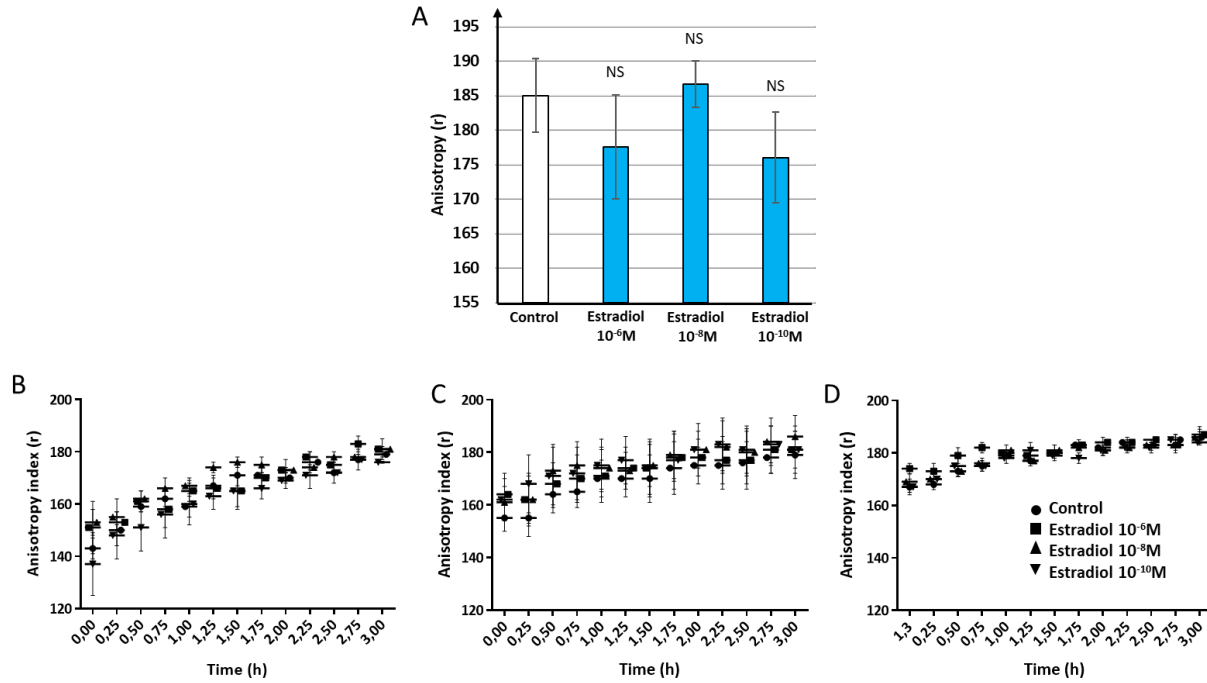
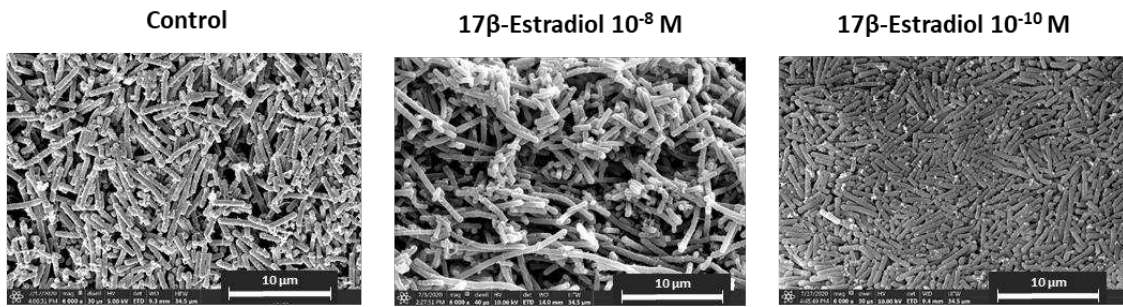


Figure 5. Effect of 17 β -estradiol on *Lactobacillus crispatus* V4 membrane fluidity. (A) Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* V4 grown for 18 h in the absence (control) or presence of 17 β -estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M). (B-C-D) Membrane fluidity (anisotropy index) of *L. crispatus* V4 exposed to 17 β -estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M) after prior growth in MRS for (B) 6 h, (C) 12 h or (D) 24 h. Values and curves are the means \pm SEM of three independent studies. (NS: not significant).

membrane integrity¹⁸. Thus, the effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* V4 membrane fluidity was studied after 6, 12 or 24 h growth before being exposed to 17 β -estradiol, using the DPH fluorescent probe¹⁹⁻²⁰. The evolution of fluorescence anisotropy was subsequently monitored over 3 h. As shown in **Figure 5B**, membrane fluidity of bacteria collected in late exponential growth phase (6h of growth) evolved during the 3 h of measure from a mean “r” anisotropy index of 143 \pm 4 to 179 \pm 1. However, at any studied concentration, 17 β -estradiol remained without effect on variation of fluorescence anisotropy and therefore on membrane integrity. Similar data were obtained for 12 h or 24 h old early to late stationary phase grown *L. crispatus* V4 (**Figs 5C and 5D**). However, an increased membrane stiffness was observed before 17 β -estradiol was added, for bacteria grown to 6, 12 and to lesser extend 24h, as evaluated by the anisotropy index of 143 \pm 4, 155 \pm 5 and 167 \pm 2, respectively (**Figure 5**, compare the time 0 in each panel).

A**B**

Bacterial size (μm)	Control (%)	17β-Estradiol 10 ⁻⁸ M (%)	17β-Estradiol 10 ⁻¹⁰ M (%)
< 1	1,72	8,97	7,48
1 to 2	48,28	47,44	45,58
2 to 3	37,93	32,05	34,01
> 3	12,07	11,54	12,93

★★★

Figure 6. Effect of 17β-estradiol on the morphology of *Lactobacillus crispatus* V4. (A) Scanning electron microscope observations of *L. crispatus* V4 grown in the absence or presence of 17β-estradiol (10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M). Scale bar = 10 μm. (B) Table showing the relative percentage of bacteria classified by size after culture in the absence or presence of 17β-estradiol (10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M). (★★★= *p* < 0.01).

17 β -estradiol alters *L. crispatus* V4 cells mean size distribution.

Scanning electron microscopy (SEM) observations of *L. crispatus* V4 revealed that 17 β -estradiol had a limited impact on the general morphology of the bacteria (**Fig. 6A**). In order to quantify the potential effect of 17 β -estradiol, the mean size of *Lactobacilli* was measured over 60 microorganisms in each condition and classified from small (< 1 μ m) to large (> 3 μ m) bacteria. Interestingly, the percentage of medium to large size microorganisms remained unchanged whereas the percentage of small size *Lactobacilli* significantly increased (+ 7.25 \pm 0.06 % and + 5.76 \pm 0.043 %) after treatment with 17 β -estradiol 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M, respectively (p < 0.001) (**Fig. 6B**).

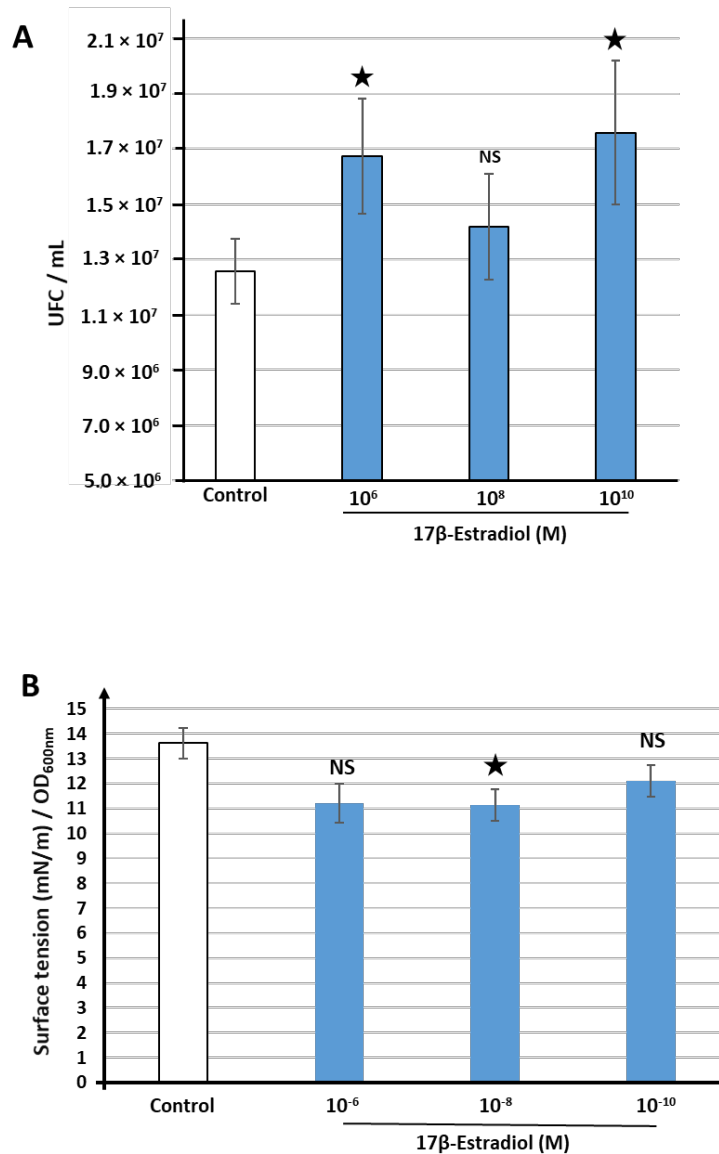


Figure 7. Effect of 17β-estradiol on *Lactobacillus crispatus* V4 adhesion to VK2/E6E7 human vaginal cells and biosurfactant production. (A) Effect of 17β-estradiol on the adhesion potential to VK2/E6E7 human vaginal cells of *Lactobacillus crispatus* V4 grown in MRS medium. (B) Surface tension of water solution extracted from *L. crispatus* V4 cultures exposed or not to 17β-estradiol (10⁻⁶, 10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M) calculated from analysis of pendant drops curvature. The absence of effect of 17β-estradiol on surface tension was controlled in preliminary studies. Values are the means ± SEM of three independent studies. (NS: not significant; ★ = $p < 0.05$).

17 β -estradiol increases adhesion to vaginal mucosa epithelial cells and promotes biosurfactant production by *L. crispatus* V4.

The effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* V4 adhesion to vaginal mucosa epithelial cells was investigated using the human vaginal VK2/E6E7 cell line. A significant increase of adhesion to VK2/E6E7 cells was observed with bacteria exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁶ and 10⁻¹⁰ M (+ 33.22 \pm 12.46 and + 40.09 \pm 14.75 %, respectively (**Fig. 7A**)). A same tendency was noted with bacteria exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁸ M, while the difference was statistically not significant.

Bacterial adhesion properties depends on their envelope composition but also of secreted molecules, such as biosurfactants, which can adsorb or insert into the bacterial membranes and modify their surface²¹. In order to investigate the effect of 17 β -estradiol on biosurfactant production, *L. crispatus* V4 colonies grown on MRS-agar grown in the absence or presence of the steroid were delicately scrapped and the obtained biomass was submitted to extraction in water. The solution, containing potential biosurfactant, was subsequently tested by the pendant drop method and the mean surface tension was calculated from analysis of the drops curvature. As shown in **Fig. 7B**, no dose response effect of 17 β -estradiol on the surface tension of extracted solutions was observed but a tendency to a decreased surface tension was noted. This effect was statistically significant for the solution extracted from *L. crispatus* V4 exposed to 17 β -estradiol at 10⁻⁸ M.

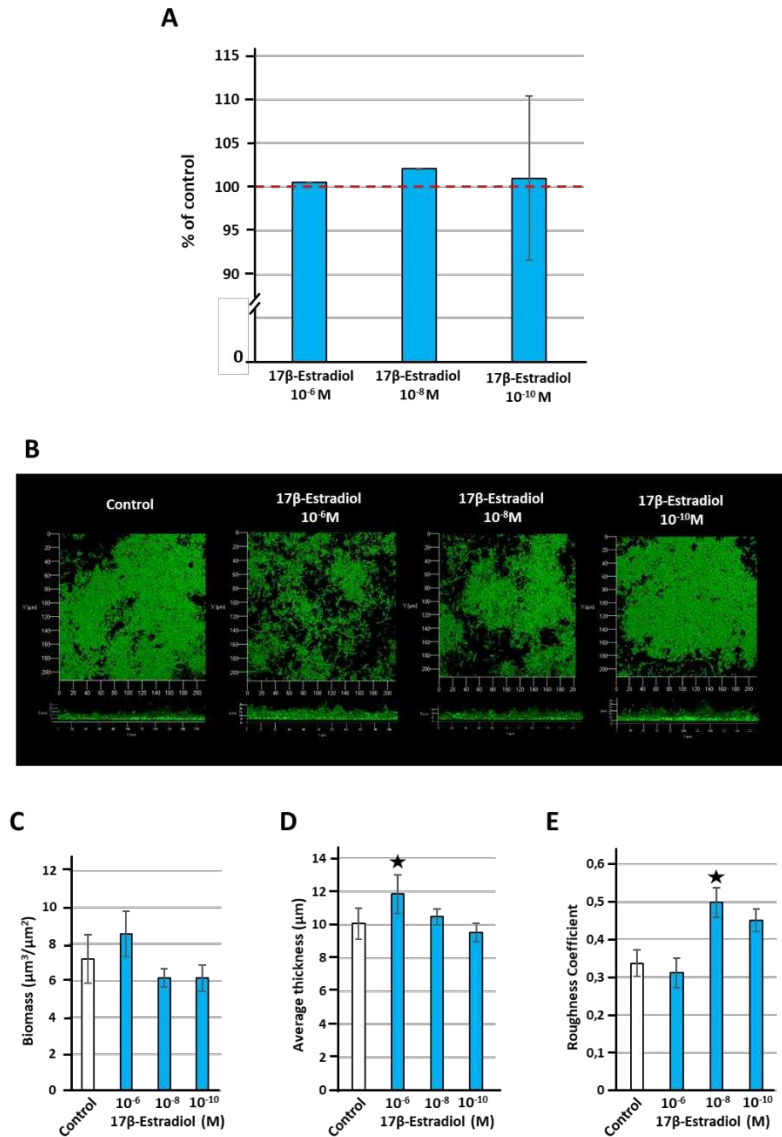


Figure 8. Effect of 17β-estradiol (10^{-6} , 10^{-8} and 10^{-10} M) on the biofilm formation activity of *Lactobacillus crispatus* V4. (A) Biofilm formation of bacteria grown in MRS medium in the absence or presence of 17β-estradiol studied by the crystal violet staining assay. (B) Structure of *Lactobacillus crispatus* CIP104459 biofilm formed in simulating genital tract secretion (SGTS) medium and visualized by confocal laser scanning microscopy. All figures are represented at the same scale and show (X/Y top views) and lateral views (X/Z mean thickness) of the biofilms formed in the absence or presence of 17β-estradiol. (C) Effect of 17β-estradiol on the calculated means biofilm biomass, thickness and roughness. Results are representative of three independent experiments. (★ = $p < 0.05$).

17 β -estradiol has a minor effect on *L. crispatus* V4 biofilm formation

Biofilm formation by *L. crispatus* V4 was studied by the crystal violet staining assay and confocal microscopy. No effect of 17 β -estradiol on the biofilm formation activity of *L. crispatus* V4 was observed using the crystal violet staining assay (**Fig. 8A**). In order to investigate a potential effect of 17 β -estradiol on the biofilm architecture, *L. crispatus* V4 biofilm formation was visualized by confocal laser scanning microscopy. Biofilm development in flat glass bottom microtiter plates required to grow the bacteria in “simulating genital tract secretion” (SGTS) medium²² as previously described⁸. In these conditions, *L. crispatus* V4 was capable to form a thin and heterogeneous biofilm (**Fig. 8B**). Treatment of bacteria with 17 β -estradiol had no visible effect on the biofilm structure. Biofilm images were then analyzed using the COMSTAT2 software. This analysis revealed that no significant variation of biomass were detectable (**Fig. 8C**). However, 17 β -estradiol at 10⁻⁶ M induced a minor (+ 17.54 \pm 9.85 %) but significant increase of the mean biofilm thickness ($p < 0.05$) (**Fig. 8D**) but no variations were observed at lower concentrations. The roughness coefficient of the biofilm also appeared increased after exposure of bacteria to 17 β -estradiol 10⁻⁸ M, but the reality of this increase remains uncertain because of the biofilm heterogeneity (**Fig. 8E**).

Discussion

Considering the effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* CIP104459 adhesion to vaginal mucosa cells⁸, and the need for the development of new solutions to re-equilibrate the vaginal microbiota, it was necessary to verify if this property was shared by distinct strains. Indeed, generally the vaginal microbiota is composed of a single and almost clonal population of *Lactobacillus* and *L. crispatus* CIP104459 could have been an exception. Indeed, this strain was isolated in 1955 from a nonmenopausal women, but bacteria including *L. crispatus*, rapidly evolve in response to host²³ and environmental²⁴ factors, especially by the occurrence of rearrangements in its genomic structure.

In the present study, we took advantage of the recent collect and draft genome sequencing of the vaginal strain *L. crispatus* V4 isolated in 2018 from a vaginal swab from a young healthy nonmenopausal woman¹¹. As shown by comparison of the core genome of *L. crispatus* V4 with that of 122 *L. crispatus* strains, *L. crispatus* V4 and CIP104459 are related to distinct and separated clusters and *L. crispatus* V4 appeared as a more typical vaginal strain. The core genomes of *L. crispatus* V4 and CIP104459 only showed 97.42 % average nucleotide identity and 78.70 % genome-to-genome distance. The two strains are therefore close to the limit of 96.8 % from which they should be considered as different sub-species or even species²⁵. In addition, alignment of the two whole genome sequences revealed that this core genome is limited to 77.96 % of the total genome and a high number the ORFs encode for proteins specific to one of the two bacterial strains. Important genomic variations exist in *L. crispatus* for genes encoding for glycosylation and glycogen degradation enzymes and essential for interaction with the vaginal mucosa⁹. Thus, potential differences were examined in our two strains. Principal genes involved in glycogen metabolism, including *glgX* encoding for pullulanase type 1, were highly conserved in

both strains. Considering the genomic distance between the two strains we were surprised to observe that, in our experimental conditions *i.e.* when bacteria were grown in MRS medium, they expressed a quite similar number of proteins. However, the pool of protein expressed by *L. crispatus* V4 and CIP104459 was noticeably different. In fact, V4 appeared to express a high number of proteins also produced by CIP104459 (81.1 %) but also a series of strain specific proteins. In addition, the expression level of common proteins was generally higher in V4 than in CIP104459 suggesting a higher metabolic activity in V4. However, none of the typical glycogen degradation enzymes essential for interaction with the vaginal mucus, was detected in the proteome of both strains using the present method. Medium composition, pH and temperature deeply affect *L. crispatus* enzymes expression²⁶. MRS medium employed in the present study and classically used for *Lactobacillus* culture, contains yeast and meat extracts but probably not enough glycogen to induce expression of specific degradation enzymes.

Proteomic analysis also revealed that 17 β -estradiol had very minor effects on protein expression by *L. crispatus* V4. This result is coherent with the absence of effect of 17 β -estradiol on the growth kinetic of this strain, as previously observed with *L. crispatus* CIP104459⁸. In fact, human hormones and neurohormones have rarely an impact on the growth kinetic of human microbiota bacteria²⁷. This is also coherent with clinical studies which showed that the composition of the vaginal microbiota of women treated with estradiol containing contraceptives was not significantly altered²⁸. All *Lactobacillus*, and particularly *L. crispatus*, have the property to spontaneously form aggregates¹³. At the opposite of strain CIP104459, which showed a limited auto-aggregation potential⁸, *L. crispatus* V4 was capable to form dense aggregates, a phenotype that was increased by 17 β -estradiol. Aggregation potential essentially depends on bacterial outer surface properties and particularly of S-layer composition¹⁶. Most *Lactobacillus* possesses an S-layer, while encoding-genes presence and sequence variabilities appears to be strain-specific²⁹. This appears as a very likely reason explaining significant strain differential behavior in biological activities including aggregation and adhesion. Interestingly, flow cytometry studies indicated that the effect

of 17 β -estradiol was correlated to an increased bacterial surface heterogeneity, *i.e.* presumably to S-layer re-arrangement. These observations are coherent with MATS studies, which showed that 17 β -estradiol induced significant variations of *L. crispatus* V4 surface polarity. The affinity of *L. crispatus* V4 to all solvents, and particularly to decane and hexadecane was markedly increased, revealing a global higher surface hydrophobicity of the bacterium. In parallel, the Lewis acid/base properties of *L. crispatus* V4 evolved from basic to strongly acid. S-layer proteins are generally hydrophobic³⁰ and this result suggests a reinforcement of the bacterial crystalline envelope. This behavior of *L. crispatus* V4 is totally different from that observed with the strain CIP104459 where 17 β -estradiol had no, or very limited, impact on aggregation and surface polarity⁸. However, it should be noticed that, at the opposite of V4, CIP104459 has low affinity to solvents and its surface is much more polar suggesting that the composition of its S-layer is different or that it has incomplete or absent S-layer. The impact of 17 β -estradiol on bacterial membrane fluidity was also very different. In the case of *L. crispatus* V4, minor variations were observed after exposure to 17 β -estradiol, whereas *L. crispatus* CIP104459 reacted by a significant decrease of the anisotropy index indicating membrane alterations⁸. As an amphiphilic molecule, 17 β -estradiol can integrate in membranes and destabilize their structure¹⁸. This phenomenon was particularly observed in Gram-negative bacteria such as *Helicobacter pylori*¹⁸ and *Pseudomonas aeruginosa*³¹. In this regard, the absence of effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* V4 membrane integrity could be explained by the higher protection conferred by a complete outer S-layer envelope. Nevertheless, the lack of effect on membrane fluidity of 17 β -estradiol, administered during the whole growth phase or at different periods of the growth kinetics, reinforces the hypothesis that, as previously suggested⁸, 17 β -estradiol should act on the physiology of *L. crispatus* through a signal transduction dependent mechanism and not by non-specific membrane integration, at least at the studied concentrations. *L. crispatus* V4 exposed to 17 β -estradiol showed, as noted with CIP104459, a decrease of the mean cell size. An increase of *L. crispatus* V4 adhesion to VK2/E6E7 human vaginal cells was also observed. In addition to aggregation, S-

layer plays a central role in bacterial morphology and adhesion to different targets³²⁻³³. However, S-layer composition was not the unique parameter affected by 17 β -estradiol. As revealed by measurement of the surface tension of aqueous extracts of *L. crispatus* V4 colonies grown in the presence of 17 β -estradiol, a limited decrease of surface tension was observed, suggesting an increase of biosurfactant production. Unexpectedly, the effect of 17 β -estradiol on cell adhesion and biosurfactant activity was not no dose-related. That was also the case of *L. crispatus* V4 aggregation which showed an inverted dose-related evolution in regard to 17 β -estradiol. A potential explanation is that the surfactive activity of biosurfactants is not directly correlated to their concentration. Indeed, under or above the critical micellar concentration, their properties and interactions with the environment are different³⁴. Added to the fact that 17 β -estradiol must be at the optimal concentration to favor biosurfactant release and aggregation or adhesion to the target cells, as suggested in *L. crispatus* CIP104459⁸, the bacterial phenotype should not be correlated to the dose by a linear relation. As previously observed, the impact of 17 β -estradiol on *L. crispatus* V4 biofilm formation activity was marginal. However, the vaginal epithelium is covered by the cervicovaginal mucus³⁵ and *Lactobacillus* should not have need to synthesize extracellular matrix to implant. Pathogens involved in bacterial vaginosis develop in biofilms³⁶, conversely the installation and persistence of *L. crispatus* in mucosa appears to depend essentially on its aggregating phenotype³⁷ and, as demonstrated herein, 17 β -estradiol is stimulating this process. These results are of importance since they show that whereas *L. crispatus* V4 and CIP104459 strains belong to different genetic clusters and have not the same surface properties, the effect of 17 β -estradiol on the adhesion phenotype in regard of vaginal mucosa cells is preserved. Then, we can speculate that 17 β -estradiol could have a similar effect on all *L. crispatus* strains by promoting adhesion on/in the vaginal mucosa without modifying the population dynamic. These observations are coherent with clinical studies showing that under treatment with 17 β -estradiol, as administered during *in vitro* fertilization protocols, the vaginal microflora tends to re-equilibrate

in favor of *L. crispatus* and other normal flora *Lactobacillus*³⁸. Considering the risk inherent to the carcinogenic activity of estradiol³⁹, 17 β -estradiol is not the best candidate drug for development of a product capable to re-equilibrate the vaginal microbiota, but many phytoestrogens exist and could have a more specific activity on *Lactobacillus*.

Methods

Bacterial strain and culture conditions.

Vaginal *Lactobacillus crispatus* V4 was obtained from swabbing of a nonmenopausal woman. The sample was obtained under control of the CRO Bio-EC (Longjumeau, France) and in agreement with the French and EU Ethic guidelines (ARS Biomedical Research Agreement N°2012-12-010, Bioethic Agreement DC-2008-542). This strain was characterized by total proteome identification using a Bruker Autoflex III MALDI-TOF/TOF mass spectrometer coupled to the algorithmic Biotyper® analysis software. The draft genome sequence of *L. crispatus* V4 was determined on an Illumina MiSeq platform and deposited in the DDBJ/ENA/GenBank under accession number SRLG00000000¹¹. This bacterium was grown anaerobically in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) medium (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) at 37°C under static conditions. Pre-cultures were prepared anaerobically in the same medium for 48 h to reach the stationary growth phase. Suspensions bacterial density was determined by measure of OD_{600nm} using a ThermoSpectronics spectrophotometer (Cambridge, UK). Absence of contamination was controlled by plating on Petri dishess of MRS-Agar (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). For growth kinetic studies, bacteria were grown in microplates in anoxic conditions over 48 h at 37°C with shaking (360 rpm) for 10 sec before each measurement using a Tecan multimode microplate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Growth curves were generated by automatic measure of OD_{600 nm} every 30 min.

Tested molecule.

17β-estradiol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) is poorly soluble in water. For that reason, a stock solution was prepared in ethanol 100% and used to prepare final dilutions in MRS. The final concentration of ethanol in MRS was always kept at 0.1% v/v. Controls were made by addition of the same percentage of ethanol in MRS. The absence of effect of ethanol 0.1% on *L. crispatus* V4 growth kinetic was controlled in preliminary studies.

Genomic analysis.

Genome sequences of *L. crispatus* V4 and 122 other *L. crispatus* strains originated from vaginal origin (including CIP104459), in addition to *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC8293 (used as an outlier to root the phylogenetic tree), were retrieved from RefSeq on November 3rd, 2020. The average nucleotide identity (ANI) and *in silico* DNA-DNA hybridization (*is*DDH; using GGDC formula 2 and *is*DDH estimates based on identities/high-scoring segment pairs length) approaches were used to determine the genetic relationship between the 124 genome sequences using Pyani v.0.2.7⁴⁰ and GGDC v. 2.1 (Genome- to- Genome Distance Calculator ; <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>). MAUVE v.2.4.0⁴¹ was used to align V4 and CIP104459. Pangenome analysis was conducted on V4 and CIP104459 genome sequences using Roary v.3.13⁴².

Proteomic analysis.

Bacteria were collected by centrifugation (7,500 x g, 10min) in early stationary phase (18 h culture), rinsed three times with Tris-HCl pH 7,4 buffer (20mM) and resuspended in the same buffer. Prior to the lysis step, a protease inhibitor solution was added (final concentration 1X, cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). For lysis, a same volume of bacterial suspension (1 mL) was distributed in 2 mL tubes containing 0.1 mm diameter glass beads (VK01-2 mL, P000914-LYSK0-A, Precellys, Bertin Technologies Montigny-le-Bretonneux, France). The cells were mechanically lysed three times by agitation at 6,800 rpm for 30 seconds with a break of 30 sec between each cycle, using a homogenizer (Precellys 24, Bertin Technologies Montigny-le-Bretonneux, France). During cell lysis, the temperature was kept at 4°C using an integrated dry ice cooling module (Cryolys® Evolution). The samples were then treated with benzonase (Benzonase Nuclease E1014-5KU, Sigma aldrich, Darmstadt, Germany) and 2 mM of MgCl₂ (REF 036226, Alfa Aesar) for 30 minutes at 4°C. The beads were removed by a first centrifugation run (13,000 x g, 2 min, 4°C) and the

cellular debris by a second run (13,000 x *g*, 18 min, 4°C). Proteins concentration in the supernatant was estimated by the Bradford's method. For that, 50 µL of sample were mixed with 1.2 mL of Bradford's solution (Pierce Coomassie Plus Protein Assay Reagent 23238 Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts) and incubated for 15 min in the dark at room temperature before measurement of OD_{595nm}. A standard curve was realized using bovine serum albumin.

The sample preparation and protein digestion were performed as previously described⁴³. For each extract, 25 µg of proteins were loaded into a 7% polyacrylamide gel (Acrylamide/Bis-Acrylamide 30% [29:1], Sigma-Aldrich) and a migration was performed for a short period (90 min at 10–20 mA/gel). After Coomassie blue staining, the revealed protein bands were excised and immersed for the first time in a reductive buffer (5 mM DTT, Sigma-Aldrich), and in a second time, in an alkylated buffer (20 mM iodoacetamide, Sigma-Aldrich). After the washing steps, gel bands were submitted to protein digestion by 1 µg of trypsin (Promega, Madison, WI). After overnight incubation at 37 °C, several steps of peptide extraction were performed using acetonitrile (Fisher, Hampton, NH). Then, peptides were dried and stored at -20°C before MS study.

All experiments were performed on an LTQ-Orbitrap Elite mass spectrometer coupled to an Easy nLC II system (both from Thermo Scientific). Samples were injected onto an enrichment column (Acclaim PepMap100, Thermo Scientific). The separation was achieved with an analytical column needle (NTCC-360/100-5-153, NikkyoTechnos). The mobile phase consisted of H₂O/fluorhydric acid (FA) 0.1% (buffer A) and acetonitrile (CAN)/FA 0.1% (buffer B). Tryptic peptides were eluted at a flow rate of 300 nL/min using a three-step linear gradient: from 2 to 40% B over 76 min, from 40 to 80% B in 4 min, and at 100% B for 10 min. The mass spectrometer was operated in positive ionization mode with capillary voltage and source temperature set at 1.7 kV and 275 °C, respectively. The samples were analyzed using CID (collision-induced dissociation) method. The first scan (MS spectra) was recorded in the Orbitrap analyzer (R = 60 000) with the mass range *m/z* 400–1800. Then, the 20 most intense ions were selected for MS2 experiments. Singly charged species were excluded for MS2 experiments. Dynamic exclusion of already fragmented precursor

ions was applied for 30 s, with a repeat count of 2, a repeat duration of 30 s, and an exclusion mass width of ± 5 ppm. The precursor isolation width was 2 m/z. Fragmentation occurred in the linear ion trap analyzer with normalized collision energy of 35. All measurements in the Orbitrap analyzer were performed with on-the-fly internal recalibration (lock mass) at m/z 445.12002 (polydimethylcyclsiloxane).

Raw data files were processed using Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Scientific). Peak lists were searched using the MASCOT search software (Matrix Science) against the database Uniprot . Database searches were performed with the following parameters: two missed trypsin cleavage sites allowed; variable modifications: carbamidomethylation on cysteine, and oxidation on methionine. The parent-ion and daughter-ion tolerances were 5 ppm and 0.35 Da, respectively. False discovery rate (FDR) threshold for identifications was specified at 1% (for proteins and peptides).

For protein quantification, a label-free experiment was performed as previously described by Kentache *et al.*⁴⁴. Briefly, after MS analysis, raw data were imported in Progenesis LC-MS software (Nonlinear Dynamics, version 4.0.4441.29989, Newcastle, UK). For comparison, one sample was set as a reference and the retention times of all other samples within the experiment were aligned. After alignment and normalization, statistical analysis was performed for one-way ANOVA calculations. For quantitation, peptide features presenting a p value and a q-value less than 0.05, and a power greater than 0.8, were retained. MS/MS spectra from selected peptides were exported for peptide identification with Mascot (Matrix Science, version 2.2.04). Database searches were performed with the following parameters: 1 missed trypsin cleavage site allowed; variable modifications: carbamidomethylation of cysteine and oxidation of methionine. Mass tolerances for precursor and fragment ions were set at 5 ppm and 0.35 Da, respectively. False discovery rates were calculated using a decoy-fusion approach in Mascot (version 2.2.04). Identified peptide-spectrum matches with $-10\log P$ value of 13 or higher were kept. Mascot search results were imported into Progenesis. For each growth condition, the total cumulative abundance

of the protein was calculated by summing the abundances of peptides. Proteins identified with less than 2 peptides were discarded. Analysis were realized in triplicate on independently prepared samples.

Bacterial aggregation studies.

L. crispatus V4 grown in microplates showed the formation of dense aggregates. The aggregation potential of *L. crispatus* V4 was quantified by the sedimentation technique¹⁴. For that, bacteria grown in MRS at 37°C for 18 h under anoxic static conditions and in the absence or presence of 17β-estradiol, were harvested by centrifugation (7,500 x g, 10 min, 20°C). After washing twice in phosphate buffer saline (PBS, Lonza™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), and resuspension in 10 mL of the same medium the bacterial suspension was vortexed for 1.5 min. The OD_{600nm} of the suspension was measured 30 min later on a Thermo Fisher Scientific spectrophotometer (Waltham, Massachusetts, USA). The percentage of auto-aggregation was calculated as:

$$\% \text{ auto-aggregation} = [(OD_{0\text{min}} - OD_{30\text{min}})/OD_{0\text{min}}]/OD_{0\text{min}} \times 100$$

Where OD_{0min} is the initial OD_{600nm} at T = 0 and OD_{30min} is the final OD_{600nm} after 30 min.

The aggregation potential and morphology of *L. crispatus* V4 were further studied by flow cytometry using a CytoFlex S flow cytometer (Beckman Coulter Life science, Indianapolis, USA) and the CytExpert software. Control and 17β-estradiol treated 18 h bacterial cultures were harvested by centrifugation (7,500 x g, 10 min, 20°C) and resuspended in PBS. Bacteria were immediately aliquoted, distributed in 96 wells microplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) and kept in static conditions for 30 min before flow cytometry analyses. A minimum of 10,000 events at OD_{488 ± 4 nm} (SSC channel) and OD_{525 ± 20 nm} (FSC channel) was recorded at a flow rate of 10 μL.min⁻¹ in each condition. Data were analyzed using the Cytexpert software. The aggregates were corresponding to the fraction of events appearing in the Q1-UR quarter of the graph (red zone). The particles size is given by the FSC-A (horizontal) axis. Isolated bacteria appear in the Q1-UL and Q1-LL zones. Granulometry (surface heterogeneity) is plotted

in the SSC-A (vertical) axis. Increase of granulometry appears in the Q1-UL and Q1-UR areas of the graph. Measures were realized in triplicate.

Investigation of bacterial ultra-surface properties.

L. crispatus V4 ultra-surface properties were investigated by determination of surface polarity and Lewis acid-base characteristics using the microbial adhesion to solvents (MATS) technic⁴⁵. Bacteria grown for 18 h in the absence or presence of 17 β -estradiol were collected as previously described. Traces of culture medium were removed by rinsing twice in PBS. Four solvents were used chloroform, hexadecane, decane and ethyl acetate. For each test, 1.2 mL of bacterial suspension at OD_{400nm} = 0.8 was mixed with 0.2 mL of solvent. After incubation for 15 min and separation of the two phases, the OD_{400nm} of the aqueous phase was measured. Bacteria distribute in the two compartments following their surface affinity with water or organic solvents. This affinity was calculated using the equation:

$$\% \text{ solvent affinity} = (1-A) / A_0 \times 100$$

[A₀] is the OD_{400nm} of the aqueous phase without solvent and [A] the OD_{400nm} of the aqueous phase after exposure to the solvent. All experiments were conducted in triplicate or more.

Evaluation of bacterial membrane organization degree.

Bacterial membrane fluidity, and therefore organization degree, was investigated by measurement of the fluorescence anisotropy, as previously described¹⁹. In these experiments, *L. crispatus* V4 grown in the absence or presence of 17 β -estradiol over 18 h were harvested by centrifugation (7,500 \times g, 10 min), washed twice in 10 mM MgSO₄ and stained with the fluorescent probe 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) 4 mM in tetrahydrofuran using a probe to sample ratio of 1 / 1000. The probe was allowed to incorporate in membranes by incubating for 30 min in the dark at 37 °C. Then fluorescence polarization was measured in continuous using a temperature-controlled Spark 20 M multimode microplate reader. The excitation and emission wavelengths of the probe were 365 and 425 nm, respectively. Each measure was realized in triplicate. Membrane anisotropy (r) was calculated

according to Lakowicz⁴⁶. Data were analyzed using the SparkControl™ software 2.1 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland). Increases of anisotropy values indicate a decrease of membrane fluidity and *vice versa*. In a second series of experiments, bacteria grown for 6, 18 or 24 h in the absence of treatment were collected and subsequently exposed to 17 β -estradiol or control medium in parallel to incorporation of the fluorescent probe. The anisotropy index was then monitored in continuous over 3 h.

Scanning electron microscopy.

L. crispatus V4 morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM) using a TENE0 VolumeScope microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA). Bacteria grown for 18 h in the absence or presence of 17 β -estradiol were harvested by centrifugation (7,500 x *g*, 10 min) and fixed by immersion in 1 mL of 2.5% glutaraldehyde in 1 M PBS, pH 7.1 for 1 h. Samples were prepared by hexamethyldisilazane treatment and coating in a LEICA EM ACE600 sputter coater (Wetzlar, Germany) with a 25 nm thick layer of platinum alloy, as previously described⁴⁷. The SEM was operated under 10 kV.

Bacterial adhesion to vaginal cells.

Adhesion of *L. crispatus* V4 was studied using the VK2/E6E7 mucosa vaginal cells line (ATCC CRL-2616). These cells were originally collected from the vaginal mucosal of a healthy pre-menopausal women. They were grown and propagated using keratinocyte serum-free medium (KSFM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), supplemented with 0.05 mg/mL bovine pituitary extract, 0.1 ng/mL human recombinant EGF and calcium chloride 44.1 mg/mL, as recommended by the provider.

VK2/E6E7 cells (80% confluence) were exposed to *L. crispatus* V4 at a multiplicity of index (MOI) of 100 bacteria/cell. Prior infection, bacteria grown in the absence or presence of 17 β -estradiol for 18h were collected by centrifugation, rinsed twice with PBS to remove any trace of the steroid and resuspended in KSFM without antibiotics. After 1 h of interaction with bacteria, the medium was removed and VK2/E6E7 cells were rinsed carefully with KSFM without antibiotics to

withdraw all planktonic bacteria. Then, vaginal cells were lysed by addition of 0.1% triton X-100 in PBS. Preliminary studies showed that the cultivability of *L. crispatus* V4 is not affected by this treatment. The bacterial solution was then diluted in MRS medium and plated on MRS agar Petri dishes. The number of cells adherent bacteria was determined from direct counting of *L. crispatus* colonies grown after 48 h at 37°C in anoxic conditions.

Investigation of biosurfactant production.

Detection of *L. crispatus* V4 biosurfactant production was studied using the pendant drop method. As described by Meylheuc *et al.*⁴⁸, the bacterial mat of *L. crispatus* V4 grown on normal or 17 β -estradiol supplemented MRS-Agar Petri dishes was scraped and resuspended in 15 mL Volvic water (selected for its neutral surface tension value). The solution was homogenized by vortex for 3 min and centrifuged twice for 30 min (10,000 xg ; 4°C) to remove all debris. The biosurfactant containing supernatant was collected and stored at 4°C. Measures were realized using a drop shape analyser DSA30 tensiometer temperature controlled (Kruss, Hamburg, Germany). The surface tension was calculated from the drop shape curvature analysis based on the Young-Laplace equation using the tensiometer drop shape analysis software⁴⁹. In order to take in consideration variations due to the biomass collected, surface tension values were merged using the OD_{600nm} of the bacterial suspension collected by scrapping of the Petri dishes.

Biofilm formation study.

The impact of 17 β -estradiol on the biofilm formation potential of *L. crispatus* V4 was evaluated by the crystal violet staining assay and confocal laser scanning microscopy. Crystal violet studies were realized following a procedure adapted from O'Toole⁵⁰. After pre-culture for 48 h in MRS medium, the bacterial solution was adjusted to OD_{600nm} = 0.1 and supplemented with 17 β -estradiol to reach a final concentration of 10⁻⁶, 10⁻⁸ or 10⁻¹⁰ M. A same volume (1 mL) was distributed into each well of flat glass bottom 24-well polystyrene plates (Falcon®, Durham, USA). Plates were incubated at 37°C without agitation for 48 hours in a Whitley A85 anaerobic Workstation. After incubation, non-adhered bacteria were removed by aspiration of the medium

and rinsing with physiologic water (NaCl 0.9%). The crystal violet solution (0.1% w/v in sterile pure 18.2M Ω water) was distributed in microwells and allowed to stain the biofilm for 10 minutes. Then, the excess of dye was removed by washing with pure 18.2M Ω water washing. Absolute ethanol was added in order to dissolve the crystal violet adsorbed in the biofilm matrix and on bacteria and the OD_{595nm} of the solution was measured using an automated Te-Cool™ plate reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland).

While *L. crispatus* V4 being unable to form biofilms on glass bottom microplates in MRS medium, and in order to visualize the biofilm structure by confocal microscopy, *L. crispatus* V4 was grown in a special medium for vaginal microflora lactobacilli, designated as “simulating genital tract secretion” (SGTS) medium²⁰ (**Table 1**). 17 β -estradiol, or an equivalent volume of ethanol in water, was added from the onset of the culture to the end of the experiment. The absence of effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* V4 growth in SGTS medium was verified in preliminary studies (**Suppl Fig. 1B**). For confocal microscopy, pre-cultures were realized in normal MRS medium. At the end, bacteria were collected by centrifugation (7,500 x g, 10 min), re-suspended in normal (control) or 17 β -estradiol supplemented SGTS medium at OD_{600nm} = 0.1 and distributed (1 mL aliquots) in 24-well glass flat bottom microplates (Sensoplate, Greiner Bio-One, Germany). Biofilm was allowed to develop for 48 h in static condition in an anoxic chamber (DW scientific, Bingley, UK). Non adherent bacteria were removed by rinsing twice with PW and the biofilms were stained with SYTO 9 Green Fluorescent Nucleic Acid Stain (Thermofisher, Waltham, Massachusetts, USA). Biofilms were visualized under an LSM 710 inverted confocal laser scanning microscope (Zeiss, Marly-le-Roi, France) equipped the Zen 2009 software package (version 12.0.1.362). Biofilm average thickness (μm), mean biomass volume ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2$) and roughness coefficient were calculated over a minimum of 30 observations in each condition using the COMSTAT2 software. All experiments were repeated at least of three times.

Statistical analysis.

Statistical significance of experimental values was evaluated using the Prism GraphPad online tool (<https://www.graphpad.com/quickcalcs/ttest1/>). Data were analyzed using unpaired (two sample) two-tailed *t* test to calculate *p* values.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Cosmetic Valley world cluster and CNRS GDR CNRS 3711 Cosm'Actifs for their scientific and relational support. This work was supported by the FUI program Gynceutics (BPI, Région Normandie, Région Centre, Région Aquitaine, European Union - FEDER) and the Research Federation "Sécurité Sanitaire, Bien être, Aliment Durable".

Authors' contributions

M.C, A.M.B., A.B.M., A.S., J.V., M.B. and O.M. contributed to the conception of the approach and conducted experiments. A.T., A.LT, M.K., C.K., G.R., C D-P and J.H. contributed to the analysis of the data. C.K, C.P., P.C. , S.C. and M.G.J.F coordinated the study. M.C, S.C and M.G.J.F designed and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing interests. The authors have the following interests: Agathe Le Tirant is member of Sequen's Lab, Madina Karsybayeva is managing Remedials Laboratory, Coralie Kremser belongs to GymoPharm, Gérard Redziniak is head of Cosmetic Inventions society. There no product or marketing interest to declare. This does not alter the authors' adherence to all policies on sharing data and materials, as detailed online in the guidelines for authors. Other authors have no conflict of interest to declare.

Ethics approval and consent to participate. Not applicable, this study did not involve clinical trial.

Consent for publication. All authors have read and approved the manuscript. LMSM accepts to be responsible for the publication fees.

Availability of data and material. All experimental raw data are available upon simple demand to the authors.

References

1. Buchta, V. Vaginal microbiome. *Ceska. Gynekol.* **83**, 371-379 (2018).
2. Petrova, M.I., Lievens, E., Malik, S., Imholz, N. & Lebeer, S. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front. Physiol.* **6**, 81 (2015).
3. Freitas, A.C., Bocking, A., Hill, J.E., Money, D.M. & the VOGUE Research Group. Increased richness and diversity of the vaginal microbiota and spontaneous preterm birth. *Microbiome* **6**, 117 (2018).
4. Callahan, B.J. *et al.* DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods.* **13**, 581-583 (2016).
5. Atassi, F., Pho Viet Ahn, D.L. & Lievin-Le Moal, V. Diverse expression of antimicrobial activities against bacterial vaginosis and urinary tract infection pathogens by cervicovaginal microbiota strains of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*. *Front. Microbiol.* **10**, 2900 (2019).
6. Abdelmaksoud, A.A. *et al.* Comparison of *Lactobacillus crispatus* isolates from *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiomes with isolates from microbiomes containing bacterial vaginosis-associated bacteria. *Microbiology* **162**, 466-475 (2016).
7. Buggio, L., Somigliana, E., Borghi, A. & Vercellini P. Probiotics and vaginal microecology: fact or fancy? *BMC Women Health* **19**, 25 (2019).
8. Clabaut, M. *et al.* Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain. *Sci. Rep.* submitted (2020)
9. van der Veer, C. *et al.* Comparative genomics of human *Lactobacillus crispatus* isolates reveals genes for glycosylation and glycogen degradation: implications for *in vivo* dominance of the vaginal microbiota. *Microbiome* **7**, 49 (2019).
10. Borrel, V. *et al.* Acne and Stress: Impact of catecholamines on *Cutibacterium acnes*. *Front. Med.* **6**, 155 (2019).
11. Clabaut, M. *et al.* Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* strain V4, isolated from a vaginal swab from a young healthy nonmenopausal woman. *Microbiol. Resour. Announc.* **8**, e00856-19 (2019).
12. Clabaut, M. *et al.* Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, isolated from a vaginal swab. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, 2 (2020).
13. Gil, N.F., Martinez, R.C., Gomes, B.C., Nomizo, A. & De Martinis, E.C. Vaginal lactobacilli as potential probiotics against *Candida* spp. *Braz. J. Microbiol.* **41**, 6-14 (2010).
14. Vandevoorde, L., Christiaens, H. & Verstraete, W. Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* **72**, 214-219 (1992).

15. Léonard, L., Bouarab Chibane, L., Ouled Bouhedda, B., Degraeve, P. & Oulahal, N. Recent advances on multi-parameter flow cytometry to characterize antimicrobial treatments. *Front. Microbiol.* **7**, 1225 (2016).
16. Chen, X. *et al.* The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int. J. Food Microbiol.* **115**, 307-312. (2007).
17. Dubois-Brissonnet, F., Trotier; E. & Briandet R. The biofilm lifestyle involves an increase in bacterial membrane saturated fatty acids. *Front. Microbiol.* **7**, 1673 (2016).
18. Hosoda, K., Shimomura, H., Hayashi, S., Yokota, K. & Hirai, Y. Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**, 68–75 (2011).
19. Fléchar, M. *et al.* The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* **8**, 17212. (2018).
20. Tahrioui A. *et al.* Membrane-interactive compounds from *Pistacia lentiscus* L. thwart *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Front. Microbiol.* **11**, 1068 (2020).
21. Otzen, D.E. Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? *Biochim. Biophys. Acta. Biomembr.* **1859**, 639- 649 (2017).
22. Geshnizgani A M & Onderdonk A.B. Defined medium simulating genital tract secretions for growth of vaginal microflora. *J. Clin. Microbiol.* **30**, 1323-1326 (1992).
23. Zhang, Q. *et al.* Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* from the gut and vagina reveals genetic diversity and lifestyle adaptation. *Genes* **11**, 360 (2020).
24. Gillings, M.R. Lateral gene transfer, bacterial genome evolution, and the anthropocene. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1389**, 20–36 (2017).
25. Chung, M., Munro, J.B., Tettelin, H., Dunning Hotopp J-C. Using core genome alignments to assign bacterial species. *mSystems* **3**, e00236-18 (2018).
26. Kim, J.W. & Rajagopal, S.N. Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol.* **45**, 29-34 (2000).
27. Racine, P-J. *et al.* Dialog between skin and its microbiota: Emergence of “Cutaneous Bacterial Endocrinology”. *Exp. Dermatol.* **29**, 1-11 (2020).
28. Achilles, S.L. *et al.* Impact of contraceptive initiation on vaginal microbiota. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **218**, 622.e1-622.e10 (2018).
29. Boot, H.J., Kolen, C.P., Pot, B., Kersters, K. & Pouwels, P.H. The presence of two S-layer-protein-encoding genes is conserved among species related to *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology* **142**, 2375-2384 (1996).
30. Vilen, H. *et al.* Surface location of individual residues of SlpA provides insight into the *Lactobacillus brevis* S-layer. *J. Bacteriol.* **191**, 3339–3349 (2009).
31. Vidailac, C. *et al.* Sex steroids induce membrane stress responses and virulence properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* **11**, e01774-20 (2020).

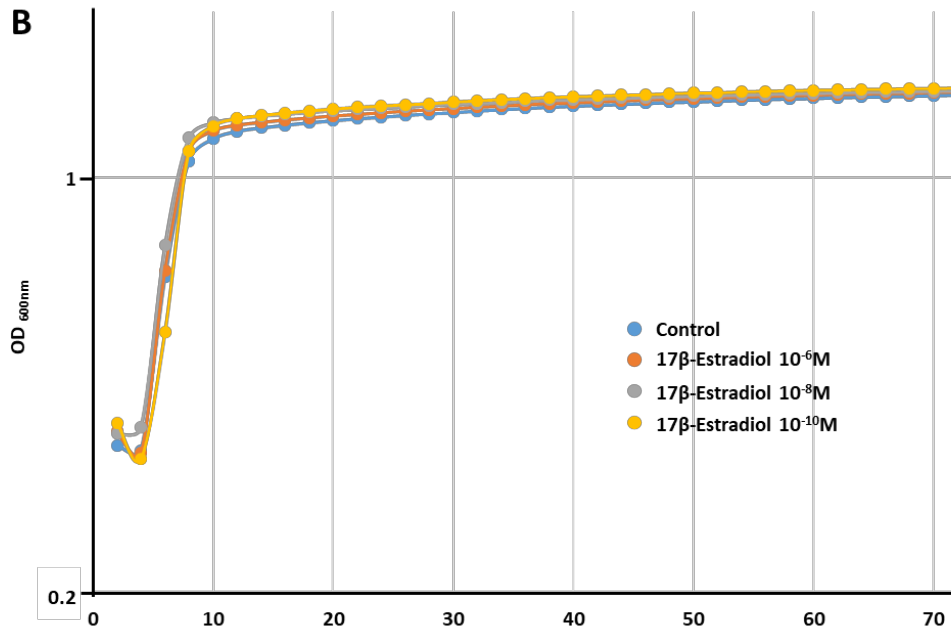
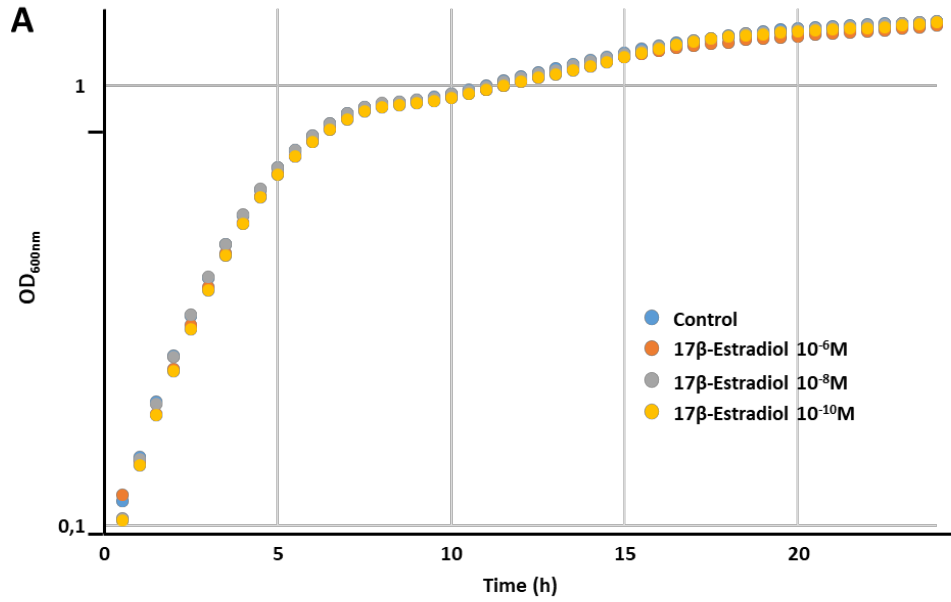
32. Hynönen, U. & Palva, A. *Lactobacillus* surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* **97**, 5225–5243 (2013).
33. Fagan, R.P. & Fairweather, N.F. Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat.Rev. Microbiol.* **12**, 211–222 (2014).
34. Raza, Z.A. *et al.* Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. *Biotechnol. Lett.* **32**, 811-816 (2010).
35. Lacroix, G., Gouyer, V., Gottrand, F. & Desseyn, J.L. The cervicovaginal mucus barrier. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, E8266 (2020).
36. Campisciano, G. *et al.* Vaginal microbiota dysmicrobism and role of biofilm-forming bacteria. *Front. Biosci.* **10**, 528-536 (2018).
37. Voltan, S. *et al.* Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin. Vaccine. Immunol.* **14**, 1138-1148 (2007).
38. Jakobsson, T. & Forsum, U. Changes in the predominant human *Lactobacillus* flora during *in vitro* fertilisation. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **7**, 14 (2008).
39. Russo, J. & Russo, I.H. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **102**, 89-96 (2006).
40. Pritchard, L. PYANI : Python module for average nucleotide identity analyses. <https://github.com/widdowquinn/pyani/releases/tag/v0.2.7> (2017).
41. Darling, A.C., Mau, B., Blattner, F.R. & Perna, N.T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res.* **14**, 1394-403 (2004).
42. Page, A.J. *et al.* Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics* **31**, 3691-3693 (2015).
43. Chalfouh, C. *et al.* The regenerative effect of trans-spinal magnetic stimulation after spinal cord injury: Mechanisms and pathways underlying the effect. *Neurotherapeutics* [https://doi.org/ 10.1007/s13311-020-00915-5](https://doi.org/10.1007/s13311-020-00915-5) (2020).
44. Kentache, T. *et al.* Global dynamic proteome study of a pellicle-forming *Acinetobacter baumannii* strain. *Mol. Cell. Proteomics.* **16**, 100–112 (2017).
45. Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J. & van Oss, C. J. Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Coll. Surf. B Biointerfaces* **7**, 47–53 (1996).
46. Lakowicz, J. R. Principles of fluorescence spectroscopy 3rd Edition, Springer, New-York, e-ISBN-13: 978-0-387-46312-4 (2006).
47. Verdon, J. *et al.* Armadillidin H, a glycine-rich peptide from the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare*, displays an unexpected wide antimicrobial spectrum with membranolytic activity. *Front. Microbiol.* **7**, 1484 (2016)

- 48 Meylheuc, T., van Oss, C.J. & Bellon-Fontaine, M.N. Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 822-832 (2001).
- 49 Berry, J.D. *et al.* Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *J. Colloid Interface Sci.* **454**, 226-237, (2015).
- 50 O'Toole, G.A. Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visual. Exp.* **47**, 2437 (2011).

SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Table 1. Complete list of proteins identified in *Lactobacillus crispatus* V4 total proteome classified by functions.

Supplementary Table 2. List of proteins expressed by *Lactobacillus crispatus* V4 and *Lactobacillus crispatus* CIP104459 with a fold change > 2 and classified by function. Up-regulated proteins in *L. crispatus* V4 in comparison to CIP104459 are indicated by a green box. Proteins down-regulated are marked with a red box.



Supplementary Figure 1. Growth kinetics of *Lactobacillus crispatus* V4 in the absence or presence 17β-estradiol at 10⁻⁶, 10⁻⁸ and 10⁻¹⁰ M. (A) Bacteria grown in anaerobic conditions at 37°C for 24h in MRS broth. (B). Bacteria grown in anaerobic conditions at 37°C for 24h in SGTS medium. All data are the mean ± SEM of four independent experiments.

Discussion générale

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre du projet GYNCEUTICS, qui a pour finalité le développement d'une gamme de produits permettant le rétablissement durable d'une microflore intime saine sans affecter l'équilibre endocrinien et ce même en cas de carence hormonale. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés au rôle du 17 β -estradiol sur la microflore vaginale et l'hôte, et en particulier sur l'espèce majoritaire *L. crispatus*. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont ainsi été orientés autour de la connaissance de la microflore vaginale, ainsi qu'à l'effet de cette hormone sur deux souches de *L. crispatus* CIP 104459 et V4.

I. Prélèvement et sélections des souches de *L. crispatus*

Dans un premier temps, et afin de disposer de souches de *L. crispatus* cultivables, une analyse de la flore vaginale a été réalisée suite à une campagne de prélèvements par écouvillonnages sur des femmes volontaires adultes ménopausées et non-ménopausées. En effet, d'après la littérature, d'importantes variations des populations bactériennes sont observées au niveau vaginal, notamment en fonction de l'âge et du statut hormonal de l'individu (Farage and Maibach, 2006). Ces variations peuvent jouer un rôle primordial lors de pathologies vaginales telles que les vaginoses (Reid and Burton, 2002). Suite à la récupération des écouvillons, la flore présente a été mise en culture dans un milieu de culture liquide MRS. Ce milieu est utilisé couramment pour les cultures de lactobacilles. C'est un milieu semi-sélectif permettant de s'affranchir de germes tels qu'*E. coli* potentiellement présents sur les écouvillons. Par la suite, tous les isolats bactériens collectés ont été identifiés par une analyse du protéome total *via* la technologie MALDI-TOF/TOF couplée au logiciel algorithmique Biotyper® (Bruker Daltonics). Cette technique présente de nombreux avantages, notamment en matière de temps et de coûts, puisqu'elle peut être appliquée directement sur une colonie bactérienne isolée ou si nécessaire après extraction protéique. Pour cette raison, cette technique est aujourd'hui employée par de nombreux centres médicaux pour l'identification rapide de germes (Carbonnelle *et al.*, 2011). Une souche de *L. crispatus* a été identifiée dans le quatrième prélèvement (correspondant à celui réalisé chez une femme non ménopausée de 35 ans) et a été isolée et stockée à -140°C dans un mélange MRS/glycérol et nommée V4. Afin de s'assurer que cette souche a été correctement identifiée par cette technique, les résultats ont été validés par une approche moléculaire (PCR, séquençage des ARN ribosomiaux 16s). D'autre part, il apparaît que la corrélation entre les techniques classiques et l'approche protéomique est élevée, à plus de 80 % (Marko *et al.*, 2012). Aucune souche de *L. crispatus* n'a été retrouvée dans les deux prélèvements de femmes ménopausées, confortant ainsi le fait que cette espèce n'est plus majoritairement présente au niveau vaginal lors de cette période de la vie (Muhleisen and Herbst-Kralovetz, 2016). Du fait de

la grande variabilité physiologique entre les différentes souches de *L. crispatus* nous avons choisi une souche de référence commandée à la biobanque de la Collection de l'Institut Pasteur, la souche CIP 104459 d'origine vaginale prélevée en 1955 à Lyon. Aucune des souches de *L. crispatus* d'origine vaginale n'était disponible avec un génome partiellement ou totalement séquencé.

II. Séquençage et comparaison génomique des souches CIP 104459 et V4

Dans le but de séquencer le génome des deux souches CIP 104459 et V4, une extraction de l'ADN génomique a été réalisée. Il n'existait au début de cette thèse que 3 génomes complets séquencés de *L. crispatus* d'origine vaginale référencés sur le site du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>), les souches FDAARGOS_743, AB70 et CO3MRSI1. Pour la souche CIP 104459, nous avons obtenu une couverture de 428 et 124 contigs, avec un contenu en G+C de 36,8 %, et une taille de génome de 1 993 673 pb. L'analyse du génome a permis de prédire 2 024 gènes codant des protéines hypothétiques. Pour la souche V4, le génome assemblé est constitué de 252 contigs (couverture de 553) avec une taille de génome de 2 091 889 pb et un contenu en G+C moyen de 37,02 %, correspondant à 2 177 séquences codant des protéines hypothétiques. Les résultats obtenus sont cohérents avec les séquences de génome de *L. crispatus* déjà publiées (Tableau 6).

Souches	FDAARGOS_743	AB70	CO3MRSI1	CIP 104459	V4
Taille du génome (pb)	2 386 960	2 367 925	2 345 902	1 993 673	2 091 889
% G+C	37,09	37,29	37,1	36,8	37,02
Plasmides	Non	Oui	Oui	Non	Non

Tableau 6 : Comparaison des souches V4 et CIP 104459 avec les génomes complets des souches vaginales de *L. crispatus*.

Le microbiote vaginal est généralement composé d'une seule population de *Lactobacillus* et l'espèce *crispatus* CIP 104459 aurait pu être une exception. En effet, cette souche a été isolée en 1955 chez une femme non ménopausée, mais les bactéries, dont *L. crispatus*, évoluent rapidement en réponse à des facteurs liés à l'hôte (Shen *et al.*, 2016) et à l'environnement (Amabebe and Anumba, 2018), notamment par l'apparition de réarrangements dans sa structure génomique.

Dans une seconde partie de ces travaux, nous avons tiré parti du séquençage du génome des souches vaginales *L. crispatus* CIP 104459 et V4 (Clabaut *et al.*, 2019, 2020) et de l'existence d'un grand nombre d'autres souches de *L. crispatus* d'origines diverses disponibles au sein de la banque NCBI. Comme le montre la comparaison du génome de *L. crispatus* V4 avec celui de 122 souches de *L. crispatus*, les souches V4 et CIP 104459 sont liées à des groupes distincts et séparés. Les génomes de *L. crispatus* V4 et CIP 104459 ne présentaient qu'une identité nucléotidique moyenne de 97,42 % et une distance génomique de 21,3 %. Les deux souches sont donc proches de la limite de 96,8 % à partir de laquelle elles devraient être considérées comme des sous-espèces ou même des espèces différentes (Chung *et al.*, 2018). En outre, l'alignement des deux séquences du génome assemblé et annoté a révélé que le core génome commun à ces souches est limité à 77,96 % du génome total et un nombre élevé d'ORF (Open Reading Frame) codent des protéines spécifiques à l'une ou l'autre des souches bactériennes. D'importantes variations génomiques existent chez *L. crispatus* pour les gènes codant les enzymes de glycosylation et de dégradation du glycogène et elles sont essentielles pour l'interaction avec la muqueuse vaginale (van der Veer *et al.*, 2019). Cette information pourrait être une clé dans la compréhension de l'adaptation favorisée dans l'environnement vaginale d'une souche par rapport à l'autre. Ainsi, cette étude génomique nous a permis d'examiner les différences potentielles dans nos deux souches. C'est par exemple le cas des principaux gènes impliqués dans le métabolisme du glycogène, dont *glgX* codant la pullulanase de type 1, qui était fortement conservé dans les deux souches.

III. Effet du 17 β -estradiol sur la physiologie des *L. crispatus* V4 et CIP 104459

Il est maintenant prouvé que la réponse des bactéries commensales humaines aux hormones peptidiques et aux neurohormones est essentielle à l'homéostasie de la peau (Racine *et al.*, 2020). Il a également été démontré que des bactéries cutanées telles que *C. acnes* expriment des senseurs pour les catécholamines (noradrénaline et adrénaline), ce qui suggère que *C. acnes* agit comme un relais entre le stress et l'acné (Borrel *et al.*, 2019). Les bactéries produisent même de petites molécules de communication eucaryotes telles que l'histamine, la glutamine et en particulier l'acide γ -aminobutyrique (GABA), qui sont des molécules de communication eucaryotes (Racine *et al.*, 2020). Le GABA est ainsi considéré comme le facteur universel de la communication entre les différents règnes (Strandwitz *et al.*, 2019). À l'inverse, les stéroïdes sont rares chez les bactéries (Huang and London, 2016) et bien que les bactéries se développent dans des environnements où l'impact des hormones stéroïdiennes est essentiel, l'influence des stéroïdes sur la physiologie bactérienne a été jusqu'à présent mal documentée.

1. Effet du 17 β -estradiol sur la croissance

La molécule testée dans cette étude est le 17 β -estradiol car c'est l'hormone stéroïdienne circulante majeure retrouvée dans l'environnement vaginal. Expérimentalement, le solvant utilisé pour solubiliser le 17 β -estradiol est l'éthanol pur. Afin de mettre en contact les bactéries avec l'hormone, l'éthanol a été incorporé à une dilution directe au 1/1000^{ème} dans les milieux de culture utilisés. L'effet de l'éthanol à sa concentration finale d'étude (0,1%) a été vérifié sur la cinétique de croissance de *L. crispatus* V4 et CIP 104459 et n'a montré aucune différence significative sur 24 heures en milieu MRS. Le choix des concentrations de 17 β -estradiol a été réalisé suivant la concentration physiologique estimée, soit 5.10⁻⁷M (Mirmonsef *et al.*, 2016). Nous avons donc choisi une concentration supramoléculaire de 10⁻⁶M et 2 concentrations submoléculaires de 10⁻⁸ et 10⁻¹⁰M. Ce choix repose également sur le fait que de nombreuses variations en termes de concentration hormonale sont liées aux variations physiologiques propres à chaque individu, et permettent d'appréhender de potentiels effets doses-dépendantes. Le fait de choisir 3 concentrations d'étude permet également d'être dans une gamme de concentrations où théoriquement chaque bactérie devrait avoir été mise en contact de l'hormone. La quasi-totalité des tests a donc été réalisée avec ces trois concentrations et sur les deux souches.

L'absence d'effet du 17 β -estradiol sur la croissance des souches de *L. crispatus* CIP 104459 et V4 concorde avec des études antérieures montrant que les neurohormones et neurotransmetteurs humains, y compris la substance P, le CGRP, les peptides natriurétiques, le GABA et les catécholamines, sont généralement sans effet sur la croissance des bactéries commensales (Racine *et al.*, 2020). À l'inverse, il a été montré que les hormones stéroïdes, telles que l'estradiol et l'androstènedione ont un effet inhibiteur sur la croissance d'*Helicobacter pylori* (Hosoda *et al.*, 2011). Chez cette espèce, la progestérone et d'autres dérivés du cholestérol ont une activité létale qui a été attribuée à l'endommagement des membranes (Shimomura *et al.*, 2013). Toutefois, ces effets n'ont été observés qu'à des concentrations supérieures à 50 μ M (Hosoda *et al.*, 2011). A ces doses non physiologiques, de nombreuses hormones eucaryotes, y compris les peptides mentionnés précédemment, peuvent également exercer des activités antimicrobiennes non spécifiques (Lesouhaitier *et al.*, 2019). Chez *Borrelia burgdorferi*, les stérols ont un effet limité sur la viabilité et affectent la perméabilité de la membrane (LaRocca *et al.*, 2013). En fait, *Helicobacter* et *Borrelia* sont représentatifs d'un petit groupe de bactéries à Gram-négatif ayant une quantité importante de cholestérol dans leur membrane, alors que *L. crispatus* fait partie des *Firmicutes* à Gram-positif dont la membrane contient des quantités mineures de stérol (Huang and London, 2016).

2. Effet du sur la capacité d'adhérence des souches sur cellules épithéliales vaginales

L'une de nos hypothèses de départ était que le 17β -estradiol pouvait favoriser l'adhérence de *L. crispatus* sur des cellules épithéliales vaginales. Lorsque les bactéries ont été mises en culture avec 10^{-8} M de 17β -estradiol puis mises en contact avec les cellules VK2/E6E7 pendant 1 heure, une augmentation significative de l'adhérence de $+ 10,2 \pm 3,8 \%$ a été observée pour la souche CIP 104459. Une augmentation de l'adhérence de la souche V4 sur ces cellules épithéliales vaginales a également été observée aux concentrations de 10^{-6} et 10^{-10} M de 17β -estradiol, ($+ 33,22 \pm 12,46$ et $+ 40,09 \pm 14,75 \%$, respectivement). Ces résultats montrent que le 17β -estradiol favorise l'adhérence de ces deux souches. Nous pouvons également noter que dans cette étude les bactéries ont été cultivées en présence de l'hormone pendant 18 heures puis centrifugées et rincées afin de les resuspendre dans le milieu de culture des cellules VK2/E6E7 pour les tests d'adhérence. Cela suggère que l'adhérence est liée à la physiologie des bactéries et dans une moindre mesure à ce qu'elles ont sécrété. Afin de comprendre comment les bactéries sont susceptibles d'augmenter leur adhérence en présence de l'hormone, nous avons réalisé différents tests liés aux phénomènes d'adhérence, d'implantation ou de colonisation par les lactobacilles. Des études antérieures ont montré que *L. crispatus* peut atténuer la virulence de *C. albicans*, moduler la sécrétion de cytokines et de chimiokines, et renforcer la réponse immunitaire des cellules VK2/E6E7 *in vitro* (Niu *et al.*, 2017). La muqueuse vaginale a une réelle fonction dans les réponses des systèmes immunitaires locaux contre les agents pathogènes et elles peuvent être favorisées par l'adhérence de *L. crispatus*. Enfin, il a également été démontré que les protéines constitutives des couches S sont impliquées dans les interactions avec des cellules épithéliales vaginales. La couche S participe efficacement à la colonisation chez la souche vaginale *L. crispatus* LC2029. Elle est responsable de la forte affinité de liaison de la souche LC2029 au collagène de type IV, celui-ci étant l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire des cellules vaginales épithéliales VK2/E6E7 (Abramov *et al.*, 2014).

3. Effet du 17β -estradiol sur le phénomène d'auto-agrégation cellulaire

Le phénomène d'auto-agrégation bactérienne correspond à la faculté qu'ont les lactobacilles à s'agréger entre eux. Cette agrégation cellulaire est bénéfique pour l'implantation des lactobacilles dans l'environnement vaginal et peut être intéressante pour expliquer les phénomènes d'adhérence sur les cellules épithéliales. Cette agrégation est également étroitement liée à la nature des surfaces externes des bactéries, c'est le cas de la couche la plus externe chez les *L. crispatus*, la couche S. Au début de ma thèse j'ai rapidement observé une

différence visuelle entre les culots des cultures des deux souches. Cette différence est facilement observable car les deux souches sont cultivées dans des conditions statiques. La souche V4 forme un culot plus dense et plus compact que celui formé par la souche CIP 104459. De plus, *L. crispatus* V4 adhère difficilement au fond des puits de microplaques en polystyrène contrairement à la souche CIP 104459. Au lieu d'adhérer au fond des puits comme la souche CIP 104459, la souche V4 forme des agrégats en suspension dans le MRS. Suite à ces observations, nous avons décidé de quantifier cette auto-agrégation par la méthode de sédimentation au bout de 18 heures de culture en présence de 17β -estradiol. Cette technique consiste en la mise en resuspension d'un culot bactérien obtenu après centrifugation dans une solution tampon suivie d'une phase de re-sédimentation des bactéries au fond du tube. La densité optique de la partie supérieure de la suspension est ensuite mesurée à différents temps. Cette étude a permis de montrer que *L. crispatus* V4 est capable de former des agrégats denses, un phénotype accru de 14,6 % en présence de 10^{-10} M de 17β -estradiol par rapport à la condition témoin. Au contraire de la souche CIP 104459 qui présentait un potentiel d'auto-agrégation plus limité et aucun effet du 17β -estradiol n'est observé dans ces conditions expérimentales (Clabaut *et al.*, 2021).

Suite à ces résultats, nous avons décidé d'étudier ce phénomène par une analyse de cytométrie en flux. Pour ce faire, nous avons mis au point le protocole nous permettant d'appréhender l'agrégation bactérienne par l'analyse de la granulosité (associée à l'étude de la surface des cellules) et à la taille des bactéries. Nous avons effectué les tests dans les mêmes conditions que celles de la précédente technique. Nous avons pu confirmer par cette méthode qu'en présence de l'hormone, la souche V4 voit sa taille et sa granulosité augmenter. Une augmentation de la taille et de la granulosité pouvant correspondre à la formation d'agrégats formés par la souche V4. Néanmoins cette augmentation ($+ 20,76 \pm 0,5$ %) n'est significative qu'à une concentration de 10^{-6} M de 17β -estradiol. Cependant, une même tendance a été observée pour les deux autres concentrations (10^{-8} et 10^{-10} M) et se traduit également par une augmentation de la granulosité, c'est à dire de l'hétérogénéité de surface des bactéries. Toutefois cette évolution n'est pas significative. Chez la souche CIP 104459, aucune variation significative n'a été notée mais une tendance est observable quant à la diminution de la taille des bactéries en présence de 17β -estradiol. Ces résultats confirment le caractère agrégatif de la souche V4 et le 17β -estradiol accentue ce phénomène. En parallèle de cette étude, l'observation au microscope électronique au bout de 18 heures de cultures en présence ou non de l'hormone confirme ces résultats car elle nous montre que la taille des bacilles V4 est inchangée, voire diminuée, permettant de confirmer la présence d'agrégats.

Le potentiel d'agrégation dépend essentiellement des propriétés de la surface des bactéries et en particulier de la composition de la couche S (Chen *et al.*, 2007). La couche superficielle (couche S) est une monocouche cristalline composée de protéines ou de glycoprotéines recouvrant la cellule et formant l'enveloppe extérieure. La plupart des *Lactobacillus* possèdent une couche S et sa composition est variable, les gènes responsables de la production de la couche S semblant être spécifiques à chaque souche (Boot *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que les études de cytométrie en flux ont indiqué que l'effet du 17 β -estradiol était corrélé à une hétérogénéité accrue de la surface bactérienne, liée potentiellement à un réarrangement de la couche S, et/ou à une agrégation cellulaire. En plus de l'agrégation, la couche S joue un rôle central dans la morphologie bactérienne et la capacité à adhérer aux différentes cibles biotiques ou abiotique (Hynönen and Palva, 2013; Fagan and Fairweather, 2014).

4. Effet du 17 β -estradiol sur la capacité à former des biofilms

L'adhérence et la formation d'un biofilm sont des propriétés de la souche qui peuvent contribuer à l'implantation des lactobacilles dans l'environnement vaginal humain. La capacité de formation du biofilm dépend des propriétés adhésives des bactéries, mais d'autres paramètres, dont l'activité sécrétoire et la composition de la matrice, jouent également un rôle essentiel. Couramment, les techniques utilisées pour l'étude de la formation de biofilms par les souches bénéfiques (voire probiotiques) sont le marquage au cristal violet et la microscopie confocale et électronique (Leccese Terraf *et al.*, 2016). Afin de comprendre si le 17 β -estradiol pouvait moduler ce phénomène et expliquer en partie l'implantation et la colonisation de *L. crispatus* V4 et CIP 104459, nous avons réalisé dans un premier temps des tests par la méthode de coloration au cristal violet. Nous avons observé qu'une concentration de 10⁻⁶ et 10⁻⁸ M de 17 β -estradiol induisait une augmentation limitée mais significative de la formation de biofilms chez *L. crispatus* CIP 104459. Notons que le cristal violet n'est pas spécifique et marque à la fois les cellules bactériennes et la matrice. Contrairement à la souche CIP 104459, *L. crispatus* V4 cultivée dans le MRS semble adhérer difficilement sur des surfaces en polystyrène suggérant ainsi que la surface ou le milieu de culture n'était pas totalement optimaux pour cette souche. Ces premiers résultats montrent que la souche CIP 104459 forme un biofilm plus dense dans le MRS en présence de 17 β -estradiol. Celui-ci n'étant pas lié à une augmentation de la croissance des cellules, nous supposons que cette augmentation peut être liée à une meilleure adhérence de la bactérie au polystyrène. L'adhérence est importante dans les premières étapes de la formation d'un biofilm. Cette variation peut être également associée à la production d'une matrice extracellulaire plus importante, puisque le cristal violet la met en évidence.

Afin de caractériser plus précisément l'effet de 17β -estradiol, la structure du biofilm de *L. crispatus* V4 et CIP 104459 a été étudiée par microscopie confocale à balayage laser. Des plaques à fond de verre étant nécessaires pour ces études, il fallait trouver un milieu de culture adapté pour que les deux souches puissent former un biofilm sur cette surface. C'est pour cela qu'un milieu spécifique aux microorganismes de la microflore vaginale, appelé milieu « Simulating Genital Tract Secretion » (SGTS) (Geshnizgani and Onderdonk, 1992) a été utilisé, mais son coût et sa complexité de fabrication en restreignent l'utilisation. En effet, dans le cas de la technique utilisant le cristal violet, les bactéries ont été cultivées dans un milieu MRS et la formation du biofilm a été étudiée dans des plaques en polystyrène. Dans le cas des études réalisées en microscopie confocale, les bactéries ont été cultivées en milieu SGTS et le biofilm est formé sur une surface de verre (fond des microplaques). La meilleure adhérence des bactéries dans ce milieu semble être liée à la présence d'une concentration importante de mucines qui permettrait une meilleure implantation sur les surfaces en verre. En effet, il a été montré que la mucine peut être utilisée pour le cottage des puits et permet de favoriser l'étude de la formation de biofilms chez les bactéries (Shi *et al.*, 2000). La mucine présente dans notre milieu permettrait une meilleure adhérence de nos souches et d'améliorer la formation de biofilm dans les puits à fond de verre. Pour la souche CIP 104459 aucune différence n'a pu être visualisée après une exposition au 17β -estradiol de 48 h, ni en termes d'architecture, ni en termes d'épaisseur moyenne. La souche V4 quant à elle, a présenté une augmentation significative de l'épaisseur moyenne du biofilm de $+ 17,54 \pm 9,85 \%$ en présence de 10^{-6} M de 17β -estradiol ainsi qu'un coefficient de rugosité augmenté en présence de 10^{-8} M de 17β -estradiol. Cette étude montre que la souche V4 forme un biofilm plus hétérogène et plus épais. Cela peut être lié au phénotype d'agrégation qui est favorisé par le 17β -estradiol, car comme je l'ai démontré précédemment, la souche V4 forme des agrégats plus denses que la souche CIP 104459. De plus, la formation rapide d'agrégats dans les premières étapes du biofilm peut permettre une meilleure adhérence de la bactérie à la mucine et aux autres composants du milieu SGTS. Ces agrégats peuvent ainsi favoriser la formation de biofilms mais ne permettent pas de recouvrir la surface totale du fond des puits. Enfin il a été montré que la mucine permettait la formation d'agrégats plus importants dans les premières étapes de la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* par rapport à la formation sur verre (Landry *et al.*, 2006). *In vivo*, la formation de biofilm par les lactobacilles empêche la colonisation par des bactéries pathogènes par le biais de différents mécanismes, y compris l'immunomodulation. Néanmoins, les effets sont en général souche spécifique et ne peuvent pas être extrapolés à l'ensemble des *L. crispatus* ce qui nécessite une étude individuelle de chaque souche. Des souches de *L. rhamnosus* isolées de produits laitiers, telles que *L. rhamnosus* 183,

ont également montré une forte capacité à former des biofilms en milieu MRS sur du polystyrène et, en tant que biofilms, ils sont capables d'inhiber fortement les bactéries pathogènes telles que *E. coli* et *Salmonella spp.* (Salas-Jara *et al.*, 2016). Lebeer *et al.*, (2009) ont étudié le rôle spécifique des exopolysaccharides dans l'adhérence au mucus, aux cellules épithéliales et dans la formation de biofilms par *L. rhamnosus*. Ils ont démontré qu'un mutant du gène *welE*, impliqué dans la biosynthèse des exopolysaccharides, augmente la formation d'un biofilm par rapport à la souche sauvage (Lebeer *et al.*, 2010). Bien que les mécanismes impliqués restent inconnus, on peut supposer que l'absence de ces exopolysaccharides pourrait exposer les adhésines favorisant la liaison à plusieurs surfaces. Le rôle de l'acide lipotéichoïque dans la formation du biofilm a également été analysée, mais les études de Velez *et al.* (2007) ont établi que la présence de cet acide n'affecte pas la capacité de cette souche à former des biofilms (Vélez *et al.*, 2007). Leccese *et al.* (2016) ont évalué la cinétique de la formation du biofilm et la nature chimique de la matrice du biofilm formé par *L. rhamnosus* CRL 1332, démontrant que la protéase, la protéinase K et l' α -amylase détachaient la matrice du biofilm qui contient de grandes quantités de polysaccharides, de glucides et des protéines (Leccese Terraf *et al.*, 2016).

L'agrégation cellulaire contribue non seulement à la colonisation transitoire, mais aussi à fournir un bouclier protecteur lors de la formation d'un biofilm sur le tissu de l'hôte (Salas-Jara *et al.*, 2016). En revanche, la formation de biofilms n'a pas été étudiée de manière approfondie chez les bactéries non pathogènes telles que *Lactobacillus* (Lebeer *et al.*, 2007b; Vélez *et al.*, 2010). Chez *L. reuteri*, des structures ou composants qui favorisent potentiellement l'adhérence et la colonisation ultérieure ont été mises en évidence, parmi lesquelles les protéines de la couche S (Wang *et al.*, 2017), celles qui favorisent l'agrégation de *L. acidophilus* NCFM (Goh and Klaenhammer, 2010) et encore les protéines de liaison au mucus (MacKenzie *et al.*, 2010). Différentes études ont montré la présence de *pili* chez *L. rhamnosus* GG et leur implication dans l'adhérence (Lebeer *et al.*, 2012), qui pourrait également être liée à la formation d'un biofilm.

La formation d'un biofilm chez les souches de *Lactobacillus* bénéfiques est une caractéristique qui peut favoriser la colonisation bactérienne lorsqu'un probiotique est administré à l'hôte (Walter *et al.*, 2007; Vélez *et al.*, 2010). Cependant, peu de travaux ont été rapportés dans le cas d'isolats du tractus urogénital. Récemment, la formation d'un biofilm *in vivo* par les lactobacilles vaginaux a été mise en évidence (Ventolini, 2015; Ventolini *et al.*, 2015). Comme observé précédemment, l'impact de 17 β -estradiol sur l'activité de la formation du biofilm de *L. crispatus* V4 a été marginal. Cependant, l'épithélium vaginal est recouvert par le mucus (Lacroix *et al.*, 2020) et les *Lactobacillus* ne devraient pas avoir besoin de synthétiser une matrice extracellulaire pour

s'implanter. Les agents pathogènes impliqués dans la vaginose bactérienne se développent dans des biofilms (Campisciano *et al.*, 2018), à l'inverse l'installation et la persistance de *L. crispatus* dans la muqueuse semble également dépendre de son phénotype d'agrégation (Voltan *et al.*, 2007) et, comme démontré précédemment, le 17 β -estradiol stimule ce processus.

5. Effet du 17 β -estradiol sur la production de biosurfactants

Nous avons observé qu'un traitement par le 17 β -estradiol provoquait un étalement de l'inoculum bactérien de la souche CIP 104459 sur gélose MRS. L'inoculum de la souche V4 ne semblait pas s'étaler et ce, même en présence de 17 β -estradiol. Sachant que la mobilité des lactobacilles n'a jamais été montrée, nous avons soupçonné la production de biosurfactants par les souches. Les biosurfactants sont des tensioactifs qui permettent de modifier les tensions interfaciales. En modifiant les tensions de surfaces des microenvironnements colonisés, les bactéries peuvent s'implanter plus facilement selon leurs propriétés physico-chimiques de surfaces. Nous avons décidé de récupérer les tapis bactériens et de réaliser plusieurs lavages dans de l'eau de volvic afin de voir si des tensions de surfaces été modifiées suite à la sécrétion de molécules tensioactives par nos souches. L'eau de volvic est utilisée comme référence de par sa tension de surface moyenne stable et limitée. Dans un premier temps, nous avons utilisé la méthode de la goutte posée pour observer ce phénomène, ce qui nous a permis de découvrir qu'en présence 10⁻⁶ M de 17 β -estradiol, la goutte était plus étalée sur une surface en polystyrène que celle de la condition témoin. Ce résultat suggère, une fois de plus, la présence de molécules tensioactives. Enfin, pour quantifier et confirmer la présence de biosurfactants, nous avons utilisé un tensiomètre. Cette méthode nous a permis de découvrir qu'en présence de 10⁻⁶ M de 17 β -estradiol la solution de lavage du tapis bactérien de la souche CIP 104459 présentait une diminution de la tension de surface mesurée par rapport à la condition témoin. Ce résultat confirme la suspicion de la production de biosurfactants par cette souche. Dans son ensemble notre étude révèle que le 17 β -estradiol peut exercer des effets sur *L. crispatus* CIP 104459 en induisant la production de biosurfactants. Ce processus pourrait être important dans la physiologie vaginale en favorisant l'adhérence de *L. crispatus* à la muqueuse. Comme l'a révélé la mesure de la tension superficielle des extraits aqueux des colonies de *L. crispatus* V4 cultivées en présence de 10⁻⁸ M de 17 β -estradiol, une diminution limitée de la tension superficielle a été observée, ce qui suggère une légère augmentation de la production de biosurfactants. De nombreux lactobacilles sont connus pour produire des molécules ayant une activité tensioactive (surlactine, (Satpute *et al.*, 2016)). La production de biosurfactant par *L. crispatus* d'origine vaginale a été récemment démontrée (De Gregorio *et al.*, 2020). La molécule apparaît comme étant un lipopeptide complexe

non homogène, mais les techniques utilisées, notamment la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et la spectrométrie de masse, n'ont pas suffi à déterminer sa structure complète (De Gregorio *et al.*, 2020). Ce biosurfactant présente une faible cytotoxicité, stimule la muco-adhérence des mucines et antagonise l'adhésion de *Candida spp.* (De Gregorio *et al.*, 2020). À cet égard, l'effet du 17 β -estradiol sur la production de biosurfactant par *L. crispatus* est intéressante car cette espèce est l'une des principales espèces du microbiote vaginal (Cauci *et al.*, 2002; Rampersaud *et al.*, 2012) et cela pourrait avoir des conséquences directes sur la préservation de l'homéostasie vaginale. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que le 17 β -estradiol à 10⁻⁸ M augmente l'adhérence de *L. crispatus* CIP 104459 aux cellules vaginales VK2/E6E7. De manière inattendue, des concentrations plus ou moins élevées de 17 β -estradiol n'ont pas eu d'effet significatif. Cependant, cela pourrait s'expliquer par le comportement qu'on les biosurfactants selon leur concentration micellaire critique. En effet, le comportement des tensioactifs lié à leur caractère amphiphile varie en fonction de leur concentration jusqu'à une limite, désignée comme concentration micellaire critique. Au-delà, les biosurfactants saturent toute interface et forment des micelles modifiant les interactions avec l'environnement (Raza *et al.*, 2010). Enfin, les biosurfactants doivent être présents à une concentration optimale pour exercer leur activité et 10⁻⁸ M pourrait se situer dans la plage où le 17 β -estradiol est capable de stimuler la production de biosurfactants par *L. crispatus* au niveau optimal. C'est également le cas de l'agrégation de *L. crispatus* V4 qui a montré une évolution inversée liée à la dose en ce qui concerne le 17 β -estradiol. L'explication la plus plausible est que l'activité tensioactive des biosurfactants n'est pas directement corrélée à leur concentration. En effet, en dessous ou au-dessus de la concentration micellaire critique, leurs propriétés et leurs interactions avec l'environnement sont différentes (Raza *et al.*, 2010). Outre le fait que le 17 β -estradiol doit être à la concentration optimale pour favoriser la libération du biosurfactant et l'agrégation ou l'adhérence aux cellules cibles (Clabaut *et al.*, 2021), le phénotype bactérien n'est pas corrélé à la dose d'hormone de manière linéaire. En effet, la diminution de la tension superficielle était liée à la dose mais n'était significative qu'en présence d'estradiol 10⁻⁶ M pour la souche CIP 104459 et 10⁻⁸ M chez la souche V4. Cela suggère également que la quantité et/ou la nature du biosurfactant produit par chaque souche peut être différent dans nos conditions expérimentales.

6. Effet du 17 β -estradiol sur les propriétés physico-chimiques de surface

Les caractéristiques physico-chimiques de la surface des bactéries sont importantes dans les premières interactions réversibles qui précèdent l'adhérence des bactéries dans la formation d'un biofilm. La polarité de la surface de *L. crispatus* CIP 104459 et de la souche V4 exposés au 17 β -

estradiol a été étudiée par la technique MATS. Cette technique consiste à déterminer la nature hydrophobe ou hydrophile de la surface des bactéries. Pour cela, une suspension bactérienne de concentration connue est mise en contact avec un solvant plus ou moins apolaire et de l'eau (solvant polaire). Nous avons utilisé dans cette étude le chloroforme (polaire et acide), l'acétate d'éthyle (polaire et basique), le décane et l'hexadécane (apolaires). Les deux fractions, solvant et bactéries, sont fortement homogénéisés selon un protocole défini par Bellon-Fontaine *et al.*, 1996, puis la densité optique de la fraction aqueuse contenant les bactéries est mesurée (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996). Pour chaque condition il en est déduit l'affinité pour chaque solvant. Les résultats que nous avons obtenus pour la souche CIP 104459 montrent des changements mineurs et seulement significatifs de la diminution de l'affinité pour l'acétate d'éthyle dans notre condition de 10^{-8} M de 17β -estradiol. Cela suggère une légère diminution de l'affinité pour ce solvant et donc du caractère hydrophile. En parallèle, les propriétés acido-basiques de Lewis de la surface bactérienne ont également été analysées. Un traitement par le 17β -estradiol a légèrement modifié la polarité de la surface cellulaire (acido-basique à basique). En présentant une faible affinité générale pour le solvant basique acétate d'éthyle, cela confirme le caractère basique très répandu des surfaces des cellules de lactobacilles (Pelletier *et al.*, 1997). Le caractère basique de la surface est renforcé en présence de 17β -estradiol chez la souche CIP 104459 et donc sur sa capacité potentielle à générer des interactions acide-base de Lewis avec un support tel que le polystyrène. Ce résultat pourrait expliquer en partie de sa bonne adhérence sur cette surface dans l'étude de la formation de biofilms. Les études MATS ont également montré que le 17β -estradiol induisait des variations significatives de la polarité de surface de *L. crispatus* V4. L'affinité de *L. crispatus* V4 pour tous les solvants, et en particulier pour le chloroforme et l'hexadécane a été nettement augmentée, révélant une hydrophobicité globale de la surface plus élevée chez cette souche. Parallèlement, les propriétés acide/base de Lewis de *L. crispatus* V4 ont évoluées de basique à fortement acide. Contrairement à la souche CIP 104459, le 17β -estradiol semble provoquer une évolution des charges de surface chez cette souche. Le renforcement du caractère acide peut se traduire par une diminution de sa capacité à générer des interactions avec un support comme le polystyrène. Cela est cohérent avec la difficulté d'adhérence sur cette surface observée lors de l'étude de la formation de biofilms. Une étude précédente avait montré que les LAB « Lactic Acid Bacteria » non-agrégatives ont une faible affinité pour l'hexadécane (Nikolic *et al.*, 2010). La souche CIP 104459 présente en moyenne 12 % d'affinité pour l'hexadécane contre 70 % chez la souche V4 et ce phénomène est accentué (92 %) en présence de 17β -estradiol. Nous pouvons également noter que la souche CIP 104459 est plutôt hydrophile et que la souche V4 est hydrophobe. On peut noter également que les bactéries sont cultivées dans un milieu

aqueux (MRS) et l'hydrophobie de la surface de la souche V4 pourrait faciliter son agrégation. Les surfaces cellulaires hautement hydrophobes sont parfois associées à une capacité d'auto-agrégation (Collado *et al.*, 2007), qui dans certains cas détermine la colonisation vaginale. Certains auteurs ont corrélé la capacité d'adhérence des lactobacilles à leur hydrophobie de surface (Ehrmann *et al.*, 2002). Enfin ces résultats sont cohérents avec des études qui ont suggérées une forte variation inter-souche concernant les propriétés physico-chimiques de surface des lactobacilles (Pelletier *et al.*, 1997).

Les résultats obtenus sont susceptibles de s'accompagner de certaines modifications particulières de la composition chimique de la paroi cellulaire et/ou de la composition protéique de la couche S. Les protéines de la couche S sont généralement hydrophobes (Vilen *et al.*, 2009) et ce résultat suggère un renforcement de l'enveloppe cristalline de la bactérie. Ce comportement de *L. crispatus* V4 est totalement différent de celui observé avec la souche CIP 104459 où le 17 β -estradiol n'a quasiment eu aucun impact, ou très limité, sur l'agrégation et la polarité de surface (Clabaut *et al.*, 2021). Cependant, il convient de noter que, à l'opposé de V4, CIP 104459 a une faible affinité pour les solvants et sa surface est beaucoup plus polaire, ce qui suggère que la composition de sa couche S est différente ou qu'elle a une couche S incomplète ou absente. L'adhérence des bactéries aux surfaces est déterminée par des propriétés physico-chimiques de surface telles que l'hydrophobie et la charge. Des facteurs spécifiques de reconnaissance de ligands, comme la liaison aux protéines de la couche S, peuvent être décrits à l'échelle microscopique comme des interactions hydrophobes et électrostatiques. L'hydrophobicité de la surface des cellules bactériennes peut être déterminée par la mesure des angles de contact. Un inventaire des angles de contact avec l'eau sur 142 isolats microbiens (van der Mei *et al.*, 1998) a montré que certains isolats de lactobacilles tels que *L. acidophilus* RC14 avaient des surfaces très hydrophobes (angles de contact avec l'eau supérieurs à 100°), alors que d'autres tels que *L. casei* 36 et 62 présentent des surfaces hydrophiles (angles de contact avec l'eau de 19°). La plupart des bactéries ont une surface chargée négativement dans des conditions physiologiques, à l'exception de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Streptococcus thermophilus* B (Jucker *et al.*, 1996). Habituellement, les souches hydrophobes ont des points isoélectriques autour de pH 4-5, alors que les souches plus hydrophiles ont des points isoélectriques plus bas ou restent chargées négativement à un pH faible. La spectroscopie photoélectronique à rayons X a indiqué que les surfaces cellulaires riches en carboxylate et en phosphate sont généralement hydrophiles et chargées négativement sur toute la gamme de pH, tandis que les surfaces cellulaires hydrophobes sont recouvertes de groupes protéiques (Millsap *et al.*, 1996). Suggérant ainsi que la couche S de la souche V4 peut être différente dans sa composition protéique. Cela suggère

également que la surface de la souche CIP 104459 est riche en carboxylates et phosphates, et conformément à sa basicité, chargée négativement par le caractère donneur d'électrons. De plus, les propriétés de surface des bactéries sont variables selon le milieu de culture et les conditions expérimentales et évoluent dans le temps (Millsap *et al.*, 1996; Schär-Zammaretti *et al.*, 2005). Cette variabilité est liée à la production de biosurfactants, d'exopolymères, des changements de composition et d'organisation de la surface de la bactérie pendant la croissance. Cependant, on connaît mal la relation entre la durée de la croissance, les changements des propriétés de surface et leurs effets sur l'adhérence de la bactérie à la muqueuse.

7. Effet du 17 β -estradiol sur la fluidité membranaire

La variabilité et la complexité des membranes bactériennes rendent difficile la caractérisation précise de l'impact des différents stress sur les changements de leur composition lipidique. Il est plus intéressant d'évaluer les changements relatifs de la fluidité de la membrane bactérienne afin de comprendre les impacts des différentes conditions de stress (température, pH...), l'impact de solvants (éthanol) ou encore de différentes molécules (stéroïdes) (Mykytczuk *et al.*, 2007). De par son caractère amphiphile, le 17 β -estradiol, est susceptible de pouvoir s'insérer directement dans les membranes (Hosoda *et al.*, 2011). De plus, comme nous l'avons montré, le 17 β -estradiol stimule la production de biosurfactants chez nos souches et les tensioactifs peuvent s'insérer à n'importe quelle interface, abiotique ou non. Certains d'entre eux ont ainsi été montré comme capables de modifier la fluidité de la membrane (Otzen, 2017). La production de biosurfactant, la nature chimique du 17 β -estradiol et de l'éthanol utilisé comme solvant, nous ont donc conduits à étudier la fluidité membranaire chez nos deux souches de *L. crispatus*.

Les méthodes de polarisation de la fluorescence sont les plus couramment utilisées pour étudier la fluidité de la membrane grâce à des sondes lipidiques fluorescentes. Une fois insérée dans la membrane, la rotation de la sonde peut être plus ou moins entravée, ce qui affecte la polarisation de la lumière excitatrice. Par exemple, dans un environnement fluide, la sonde tourne et émet de la lumière dans toutes les directions, mais dans un environnement visqueux, la sonde ne peut pas tourner librement et la lumière est émise dans certaines directions préférentielles (Denich *et al.*, 2003). L'anisotropie d'une source lumineuse peut alors être calculée, elle est définie comme le rapport entre la composante polarisée et l'intensité totale. Ainsi, des variations de l'anisotropie de fluorescence pourront être reliées aux variations de la polarisation de fluorescence, et fournir des informations sur la fluidité ou la rigidité membranaire. Trois sondes membranaires sont couramment utilisées. Le DPH (1, 6-diphényl-1,3,5-hexatriène) pénètre

jusqu'au noyau hydrophobe des phospholipides et s'oriente parallèlement aux chaînes d'acides gras. Le DPH-PA (acide 3-[4-(6-phényl)-1,2,5-hexatriényl] phényl propionique) et le TMA-DPH (1-[4-(triméthylamino) phényl]-6-phényl 1,3,5-hexatriène), deux dérivés de DPH chargés positivement, ne rentrent qu'au niveau externe de la membrane, la partie chargée restant ancrée à la surface de la cellule (Collins and Grogan, 1989; Borenstain and Barenholz, 1993).

Nous avons examiné l'effet du 17β -estradiol sur la fluidité de la membrane de *L. crispatus* CIP 104459 et V4 en utilisant le DPH comme sonde et en mesurant l'anisotropie de fluorescence. Une diminution de l'anisotropie membranaire a été observée après une exposition bactérienne continue au 17β -estradiol chez la souche CIP 104459. Ce résultat indique une plus grande fluidité et révèle ainsi une altération de l'homéostasie membranaire. L'impact de 17β -estradiol sur la fluidité de la membrane bactérienne est très différent chez les deux souches de *L. crispatus* étudiées. Dans le cas de *L. crispatus* V4, des variations mineures ont été observées après l'exposition continue au 17β -estradiol pendant 18h.

Un de nos objectifs était de définir si le 17β -estradiol pourrait être capable de s'insérer dans les membranes de *L. crispatus* CIP 104459 et d'affecter l'homéostasie membranaire. Afin de mieux comprendre le mécanisme impliqué, nous avons testé la fluidité de la membrane lors d'une exposition à court terme au 17β -estradiol à différents moments au cours de la croissance bactérienne. De plus, la sonde a été incorporée en même temps que le 17β -estradiol afin de mettre en évidence une éventuelle intégration non spécifique de l'hormone au niveau de la membrane. Si cette molécule était capable de s'insérer directement ou de passer les membranes de façon non spécifique cela entraînerait des altérations rapides (< 30 min) de la fluidité membranaire. Des différences mineures de l'indice d'anisotropie de fluorescence ont été mesurées chez des bactéries cultivées en phase exponentielle de croissance (6 h de croissance). Ce phénotype est atténué lorsque les bactéries sont d'abord cultivées jusqu'à l'entrée de la phase stationnaire avant l'exposition au 17β -estradiol (12 h de croissance), et a complètement disparu dans le cas des bactéries cultivées en phase stationnaire tardive. Ainsi, nos données suggèrent que l'augmentation de la fluidité de la membrane résultant d'une exposition bactérienne continue au 17β -estradiol pourrait ne pas être le résultat de l'insertion de stéroïdes dans la membrane, mais plutôt une conséquence d'une réponse adaptative des bactéries par la transduction de signaux suite à la détection de l'hormone. Cette hypothèse est également soutenue par l'observation que la réponse au 17β -estradiol a été préservée à 10^{-10} M, c'est-à-dire à une concentration où le nombre de molécules de stéroïdes par bactérie pourrait être limité et potentiellement en nombre non suffisant pour entraîner des effets physico-chimiques directs.

Nous remarquons également que l'homéostasie membranaire n'est pas la même et évolue tout au long de la croissance avec une augmentation continue de l'indice d'anisotropie chez les deux souches, de 6 à 24 heures de culture en MRS. Ces résultats suggèrent qu'au cours de la croissance bactérienne les membranes se rigidifient et que le 17 β -estradiol n'interfère pas dans ce processus. Enfin, il faut remarquer qu'il n'y a pas d'effet de l'éthanol à 0,1 % sur la fluidité des membranes de *L. crispatus* V4 ou CIP 104459 dans nos conditions. Ces résultats sont cohérents avec une étude réalisée chez *L. hilgardii*, où il a été montré qu'une concentration de 5 % d'éthanol n'avait aucun effet sur la fluidité membranaire. Par contre, une concentration de 15 % d'éthanol semble augmenter la rigidité membranaire (Couto *et al.*, 1996). Généralement, l'éthanol sur les lactobacilles a tendance à augmenter la rigidité membranaire (Yang *et al.*, 2017). Dans notre étude, les œstrogènes semblent augmenter la fluidité et ce, même en présence de 0,1 % d'éthanol ajouté à t=0 et que ce soit au bout de 6, 12 et 24 heures de culture. L'insertion du 17 β -estradiol dans les membranes bactériennes a été particulièrement observée chez les bactéries à Gram-négatif telles que *Helicobacter pylori* (Hosoda *et al.*, 2011) et *Pseudomonas aeruginosa* (Vidaillac *et al.*, 2020). À cet égard, l'absence d'effet de 17 β -estradiol sur l'intégrité de la membrane de *L. crispatus* V4 pourrait s'expliquer par la protection conférée par une enveloppe extérieure complète (ou de composition différente) de la couche S. Néanmoins, l'absence d'effet du 17 β -estradiol, sur la fluidité membranaire administré pendant toute la phase de croissance ou à différentes périodes de la cinétique de croissance, renforce l'hypothèse selon laquelle le 17 β -estradiol devrait agir sur la physiologie de *L. crispatus* par un mécanisme dépendant de la transduction du signal et non par une intégration membranaire non spécifique, au moins aux concentrations étudiées.

8. Effet du 17 β -estradiol sur la taille des bactéries

Suite aux différentes observations, notamment en termes de variations physico-chimiques de surface, d'agrégation et d'hétérogénéité de la surface, une analyse complémentaire par microscopie électronique à balayage a été réalisée au bout de 18 heures de culture en présence de l'hormone. Cette analyse nous a permis, entre autre, de mesurer la taille des bacilles sur l'ensemble des clichés réalisés. Ces résultats ont montré que quand *L. crispatus* V4 et CIP 104459 sont exposés au 17 β -estradiol il y a une augmentation du nombre de bacilles de petite taille. En effet, une proportion significativement plus importante de petits bacilles CIP 104459 (taille comprise entre 1 et 2 μ m) est observée en présence de l'hormone, soit 21 % de bacilles contre 3,85 % pour la condition témoin sans hormone. Une diminution du nombre de grands bacilles (4 à 9 μ m) de 17,14 % contre 42,31 % pour la condition témoin est aussi notée. Chez la souche V4, cette variation de la taille se reflète seulement pour la population de petits bacilles inférieurs à 1

µm, soit 8,97 % contre 1,72 % dans la condition contrôle. Cependant, l'observation des clichés montre que la surface des bactéries semble être similaire dans les différentes conditions étudiées. Nous pouvons également remarquer que la souche V4 en présence de l'hormone est différente en termes d'agrégats et d'aspect général. Le protocole complexe de centrifugation et de fixation des échantillons pour l'observation au microscope rend difficile l'interprétation de ce phénomène, mais partant du principe que tous les échantillons ont été analysés dans les mêmes conditions, nous pouvons relever cette différence. Cette étude révèle que la réponse de *L. crispatus* CIP 104459 et V4 au 17β-estradiol implique un processus complexe conduisant à la modification de la taille de la bactérie.

9. Effet du 17β-estradiol sur le protéome total des deux souches

Une analyse de l'ensemble des protéines des deux souches a été réalisée afin de voir si le 17β-estradiol pouvait moduler l'expression de certaines d'entre elles et expliquer une partie des résultats précédemment mentionnés. Cette étude a également pour objectif de tendre vers la compréhension d'un mécanisme moléculaire suite à l'exposition du 17β-estradiol par *L. crispatus* V4 et CIP 104459. Pour ce faire, les extractions protéiques ont été réalisées de façon à récupérer le protéome total des bactéries mais pas de leur sécrétome. Les échantillons ont été analysés en nano-LC-MS/MS en collaboration avec le Dr Julie Hardouin au Laboratoire Polymères, Biopolymères, Surface (PBS) à Rouen. L'ensemble des peptides retrouvés a été comparé à une banque de données que nous avons fournie. Cette banque de donnée correspond à l'ensemble des protéines potentiellement exprimées par nos souches, identifiées suite à l'assemblage et l'annotation de chaque génome séquencé. Cette étude a montré que les 2 souches exprimaient un nombre assez similaire de protéines (81,1 %), bien que l'ensemble des protéines fût sensiblement différent. Cette étude n'a pas montré de réelle différence dans les conditions où la bactérie a été cultivée avec le 17β-estradiol en comparaison à la condition témoin (sans hormone). L'ensemble des protéines identifiées chez chaque souche a été classé par groupes fonctionnels. Ce classement nous permet dans un premier temps, de faire ressortir des groupes impliqués dans des processus biologiques différents afin de rechercher différents profils selon les souches étudiées et ainsi d'orienter la compréhension des comportements physiologiques observés en présence de 17β-estradiol. Aucune variation n'a été notée entre les souches et entre les différentes conditions testées. L'analyse protéomique a également révélé que le 17β-estradiol avait des effets très mineurs sur l'expression des protéines de *L. crispatus* V4 et CIP 104459. Nous pouvons aussi remarquer qu'aucune des enzymes typiques de dégradation du glycogène n'a été détectée dans le protéome des deux souches. Sachant que ces enzymes sont importantes

dans la le processus de colonisation de l'environnement vaginale, elles auraient pu fournir des informations cruciales dans la compréhension de ce phénomène. La composition du milieu, le pH et la température affectent profondément l'expression des enzymes de *L. crispatus* (Kim and Rajagopal, 2000). Classiquement utilisé pour la culture de *Lactobacillus*, le milieu MRS contient des extraits de levure et de viande mais probablement pas assez de glycogène pour induire l'expression d'enzymes de dégradation spécifiques. De plus, nous ne retrouvons pas beaucoup de protéines membranaires. Cela suggère que l'extraction n'a pas été totale et n'a pas pu dissocier correctement les protéines des membranes. En effet, l'extraction des protéines membranaires est difficile et demande une mise au point très chronophage. Cette extraction demande également des étapes d'ultra-centrifugation permettant de rompre ces membranes, notre extraction a quant à elle, été réalisée à l'aide d'un broyeur à bille – homogénéiseur. La non-détection d'enzymes clés et de protéines membranaires ainsi que le nombre important de protéines classées en fonction hypothétiques rendent difficiles l'interprétation de ces résultats.

IV. Recherche de récepteur(s) pour le 17 β -estradiol

En tant que stéroïde, le 17 β -estradiol est une molécule amphiphile et ne présente pas de groupes réactifs permettant de former des conjugués directement covalents avec des colorants ou des traceurs. L'incorporation d'isotopes reste la seule technique permettant d'étudier expérimentalement sa liaison à des récepteurs potentiels, mais ces techniques sont soumises à de lourdes contraintes réglementaires. Nous avons donc décidé d'utiliser des approches de bioinformatique pour étudier le(s) site(s) potentiel(s) de liaison du 17 β -estradiol chez *L. crispatus* CIP 104459 et V4 au 17 β -estradiol.

Nous avons sélectionné une série de neuf molécules identifiées comme des protéines de liaison à l'estradiol chez les eucaryotes. Par comparaison de leurs séquences avec le génome de *L. crispatus* CIP 104459 (Clabaut *et al.*, 2021), nous avons montré que deux de ces protéines, le récepteur gamma lié aux œstrogènes (ERR3) et la prohibitine 2 (PHB2), avaient une homologie significative avec une protéine bactérienne contenant un domaine SPFH (*SPFH domain-containing protein*). SPFH sont les initiales de « stomatine, prohibitine, flotilline et HflK/C », une famille de protéines associées aux radeaux lipidiques membranaires (Browman *et al.*, 2007). La valeur de la constante de dissociation calculée entre le 17 β -estradiol et la protéine contenant le domaine SPFH était particulièrement élevée (-7,8 Kcal/mol), indiquant une interaction possible entre ces 2 molécules. Le potentiel site de liaison au 17 β -estradiol a été mis en évidence dans la région submembranaire de la *SPFH domain-containing protein*.

Il est intéressant de noter que les études expérimentales réalisées sur *B. burgdorferi* suggèrent aussi une association des stérols avec les radeaux lipidiques membranaires (Huang and London, 2016). En outre, il a été montré que ces microdomaines membranaires devraient avoir plus que des fonctions structurales chez les bactéries, l'une d'entre elles reposant sur la transduction de signaux (Lopez and Koch, 2017). Par conséquent, l'ensemble de nos données suggèrent une relation entre le 17 β -estradiol et la protéine contenant le domaine SPFH. Cette protéine pourrait donc intervenir dans l'induction de la réponse bactérienne à l'hormone chez *L. crispatus*. Ces données suggèrent que les membranes bactériennes contiendraient des radeaux lipidiques similaires à ceux que l'on trouve dans les membranes des cellules eucaryotes (Simons and Ikonen, 1997). L'assemblage des microdomaines membranaires implique la biosynthèse de lipides polyisoprénoïdes dans la membrane et leur co-localisation avec des protéines de type flotilline, qui sont également présentes chez les bactéries (Tavernarakis *et al.*, 1999).

Les flotillines appartiennent à la grande famille des *SPFH domain-containing protein* (Rivera-Milla *et al.*, 2006). Cette famille a été décrite sur la base de comparaisons de séquences et de recherches d'homologie. Tous les membres de celle-ci présentent un domaine PHB (prohibitin), qui semble important pour la fonctionnalité de ces protéines (Tavernarakis *et al.*, 1999). Cependant, la région N-terminale des flotillines bactériennes n'est pas ornée de groupements lipidiques. Au lieu de cela, l'association de ces protéines avec la membrane bactérienne se fait par l'intermédiaire des régions transmembranaires ou une boucle en « épingle à cheveux » s'insérant dans la bicouche lipidique. Les flotillines abritent généralement une région en hélice α en aval du domaine SPFH, qui semble être impliqué dans les interactions protéine-protéine spécifiques et l'oligomérisation (Bramkamp and Lopez, 2015). La flotilline est une protéine abondante des radeaux lipidiques et est donc considérée comme un marqueur protéique important pour la détection et la visualisation des radeaux lipidiques (Bramkamp et Lopez, 2015). Les flotillines bactériennes semblent jouer un rôle similaire à celui des flotillines eucaryotes, en agissant comme des échafaudages protéiques dans le recrutement des protéines qui doivent être localisées dans les radeaux lipidiques (Langhorst *et al.*, 2005). Ainsi, l'activité des flotillines est liée à la fixation de composants protéiques ou lipidiques pour faciliter leur interaction et leur oligomérisation facilitant l'activation de voies de transduction du signal (Bramkamp et Lopez, 2015). Tout comme les flotillines eucaryotes, les flotillines des bactéries jouent un rôle essentiel dans l'organisation et le maintien de l'architecture des microdomaines membranaires fonctionnels. En 2009, Donovan et Bramkamp ont montré la localisation subcellulaire d'une flotilline YuaG, qui est distribuée de manière hétérogène à travers la membrane de *B. subtilis* (Donovan and Bramkamp, 2009). Les chercheurs ont constaté que YuaG influençait la sporulation chez *B.*

subtilis, car les cellules dépourvues de YuaG étaient retardées dans le début de la sporulation par rapport aux souches sauvages (Donovan et Bramkamp, 2009). En 2010, il a été constaté que YuaG était co-localisée au niveau de la membrane avec la flotilline YqfA, et d'autres protéines impliquées dans la transduction de signaux et la communication cellulaire (López and Kolter, 2010). De manière remarquable, les altérations de la production de polyisoprénoides associés aux membranes affectent la localisation et la fonctionnalité des protéines hébergées dans les microdomaines membranaires fonctionnels et les processus cellulaires connexes, (formation de biofilms, sporulation et sécrétion de protéases), chez *B. subtilis* mais aussi chez d'autres espèces bactériennes comme *S. aureus* (López and Kolter, 2010). Une souche de *B. subtilis* déficiente en flotilline est affectée dans la sporulation, l'activation de la compétence naturelle et la motilité (Dempwolff *et al.*, 2012). De plus, un mutant de *B. subtilis* déficient en flotilline montre un défaut de fonctionnalité de la protéase FtsH (Yepes *et al.*, 2012), ainsi que des altérations de la forme et de la division cellulaire (Mielich-Süss *et al.*, 2013). Enfin, ces flotillines jouent un rôle important dans la régulation de la fluidité membranaire et des processus cellulaires associés aux radeaux lipidiques liés à la sécrétion et au transport des protéines (Bach and Bramkamp, 2013). En effet, la perte de flotillines réduit la fluidité en conditions de stress (Lee *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces données montre un lien entre la fonctionnalité des flotillines et l'organisation des membranes chez les bactéries, pouvant être lié à l'augmentation de la fluidité membranaire observée chez la souche CIP 104459. Ces données montrent également que les *SPFH domain-containing protein* peuvent être liées à l'organisation des surfaces et de la forme des cellules. Elles sont également associées à la perception de nombreux signaux de diverses origines et responsables d'une réponse adaptative liée à un stress chez les bactéries. Bien que l'effet de l'estradiol sur la souche V4 ne se traduit pas par l'augmentation de la fluidité membranaire, leur surface, leur taille et d'autres phénotypes sont impactés, le tout suite à la perception du 17 β -estradiol. Enfin, la détection de l'hormone par ces protéines pourrait entraîner, pour chaque souche, une cascade d'événements menant à la modulation de leurs phénotypes en améliorant leur affinité pour l'environnement vaginal.

L'ensemble de ces résultats discutés dans cette partie sont importants car ils montrent que si les souches de *L. crispatus* V4 et CIP 104459 appartiennent à des groupes génétiques différents et n'ont pas les mêmes propriétés physico-chimiques de surface, l'effet du 17 β -estradiol sur le phénotype d'adhérence en ce qui concerne les cellules de la muqueuse vaginale est préservé. On peut donc supposer que le 17 β -estradiol pourrait avoir un effet similaire sur toutes les souches de *L. crispatus* en favorisant l'adhérence sur/dans la muqueuse vaginale sans modifier la

dynamique de la population. Ces observations sont cohérentes avec les études cliniques montrant que sous traitement par le 17β -estradiol, tel qu'administré lors de protocoles de fécondation *in vitro*, la microflore vaginale tend à se rééquilibrer en faveur de *L. crispatus* et d'autres *Lactobacillus* de la flore normale (Jakobsson and Forsum, 2008). Compte tenu du risque inhérent à l'activité cancérigène de l'estradiol (Russo and Russo, 2006), le 17β -estradiol n'est pas le meilleur candidat pour le développement d'un produit capable de rééquilibrer le microbiote vaginal, mais de nombreux phytoestrogènes existent et pourraient avoir une activité plus spécifique sur les *Lactobacillus*.

Conclusion et perspectives

Les lactobacilles vaginaux offrent une protection contre les infections urinaires et vaginales récurrentes. En particulier, *L. crispatus* représente l'espèce majoritaire de la microflore vaginale normale, c'est-à-dire l'eubiose. Lorsqu'il y a une baisse du taux d'œstrogènes, lors de la ménopause par exemple, la population en lactobacilles diminue et laisse place à d'autres espèces potentiellement pathogènes. Mais la relation entre les lactobacilles et les œstrogènes est mal comprise et peu documentée dans la littérature. Les mécanismes précis qui sous-tendent l'interaction entre les lactobacilles et l'épithélium de l'hôte restent également mal compris au niveau physiologique et moléculaire. Le décryptage de ces événements peut fournir des informations précieuses sur le mode d'action des bactéries commensales et probiotiques dans l'environnement vaginal. Afin de mieux comprendre cette relation entre les œstrogènes et les lactobacilles, nous avons étudié les effets exercés par le 17β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 et V4.

Au cours de ma thèse, nous avons démontré que cette hormone induit notamment une augmentation de la capacité d'adhérence de mes deux souches sur les cellules épithéliales vaginales VK2 en présence de 17β -estradiol. Par la suite, cette étude pourrait s'étendre à l'analyse de la réponse inflammatoire en mesurant les taux des marqueurs de l'inflammation (IL-8, IL-6, TNF- α ...). Cela permettrait de décrire d'avantage l'environnement inflammatoire en présence des bactéries et de l'hormone afin de comprendre les phénomènes de protection vis-à-vis de pathogènes exercés par ces souches. Les techniques de microscopie confocale ou électronique pourraient être utilisées en complémentarité pour analyser plus précisément ces interactions cellulaires (bactéries/cellules VK2). De plus, une étude sur des épithéliums vaginaux reconstitués « modèles 3D » pourrait fournir des informations au plus près du réel quant aux interactions hôte/lactobacilles. Le 17β -estradiol semble jouer un rôle dans la modulation des propriétés physico-chimiques de surface des *L. crispatus*. Ces modulations sont importantes car elles représentent les premiers éléments externes en contact de leur microenvironnement, et donc vis-à-vis des cellules eucaryotes. En présence de 17β -estradiol, le caractère hydrophile et basique de la souche CIP 104459 et hydrophobe et acide de la surface de la souche V4 nous indiquent que le phénomène d'adhérence est différent pour chaque souche. Ces résultats nous indiquent également que la surface, et en particulier la couche S semble différente. Une étude du potentiel électronique des surfaces de nos deux souches pourrait être envisagée par l'étude du potentiel zêta et ce dans différentes conditions de pH. En effet, cette charge électronique est différente du pH et de la composition du milieu dans lequel les bactéries sont présentes. Il serait également judicieux, à mon sens, d'étudier les propriétés physico-chimiques des surfaces dans un autre milieu de culture biomimétique tel que le SGTS utilisé dans cette thèse. Enfin, comme ces

propriétés sont dépendantes du pH et que les lactobacilles sont productrices d'acide lactique, il serait nécessaire de quantifier cette production et ce, en présence de 17β -estradiol. La couche S représente la couche cristalline la plus externe de la bactérie et elle semble être différente selon les souches de *L. crispatus*. Une extraction de la couche S des deux souches permettrait une analyse poussée de la structure et de la composition protéique de celle-ci et permettrait de comprendre les différences observées. Les propriétés physico-chimiques des surfaces des deux souches sont différentes, et changeantes avec l'hormone. De plus, ces changements peuvent être liés à la production de molécules amphiphiles, tels que sont les biosurfactants. La souche CIP 104459 semble augmenter la production de ces biosurfactants. En revanche, les biosurfactants impliqués dans ce phénomène n'ont jusqu'ici pas été identifiés chez *L. crispatus* CIP 104459 et V4. Ainsi, nous envisageons de poursuivre l'analyse du profil d'expression des biosurfactants chez ces deux souches après traitement au 17β -estradiol, afin de définir au mieux quelles molécules sont impliquées. Pour cela, une extraction de ces molécules présentes dans le surnageant des bactéries pourrait être réalisée. Cette extraction demande néanmoins une connaissance précise de la nature de ces molécules (Lipidique, protéique...). Cette identification permettrait de connaître la nature et la quantité de biosurfactant produit, la technique de chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse pourrait être utilisée. L'ensemble de ces résultats pourraient expliquer en partie ce phénomène d'adhérence par la modification des tensions interfaciales avec leur microenvironnement. Enfin, l'adhérence aux cellules de l'hôte n'est pas liée qu'à ces phénomènes, mais aussi aux adhésines de surfaces exprimées par les souches telles que la LEA « *Lactoacillus epithelium adhesin* » chez les *L. crispatus*, ainsi que celles permettant les interactions avec le mucus. Cette étude pourrait être réalisée par l'exploitation des résultats de protéomique par exemple.

Le traitement de la souche V4 de *L. crispatus* par le 17β -estradiol provoque une augmentation de la capacité à s'agréger et une légère augmentation de la capacité à former un biofilm. Ces résultats sont étroitement liés et sont importants pour l'implantation et la colonisation dans l'environnement vaginal. Afin de mieux comprendre ces phénomènes, une étude de la matrice extracellulaire pourrait être réalisée en microscope confocale en utilisant des marqueurs spécifiques à l'ADN ou encore des exopolysaccharides. De plus, la cinétique de la formation de biofilm pourrait être envisagée afin de définir, dans ce contexte, le rôle de l'agrégation dans les premières étapes de la formation du biofilm. La formation d'un biofilm est également liée à la communication bactérienne par la détection du quorum « quorum sensing ». Le rôle du gène *luxS* sur la croissance et la formation de biofilms par *L. rhamnosus* GG a été analysé dans différents contextes. Il a été démontré que les mutants *luxS* ont une capacité moindre à former des biofilms

que ceux de la souche sauvage (Lebeer *et al.*, 2007a). Une analyse des systèmes de communication cellulaire chez les *L. crispatus* pourrait être également envisagée afin de comprendre ce phénomène. Cela permettrait de comprendre plus précisément les mécanismes de formation de biofilms chez ces espèces.

Le 17 β -estradiol semble également jouer un rôle dans l'augmentation de la fluidité membranaire de *L. crispatus* CIP 104459 et cela ne semble pas être lié à un effet direct de l'hormone sur les membranes mais plutôt à une réponse moléculaire suite à l'exposition. Nous envisageons donc d'étendre l'étude du site de liaison du 17 β -estradiol au-delà des prédictions réalisées par les analyses *in silico* d'interactions moléculaires. D'après nos premières analyses de « docking moléculaire », la protéine contenant un domaine SPFH pourrait être un senseur du 17 β -estradiol. De plus, cette hormone semble jouer un rôle dans la modulation de la taille des bactéries, les bacilles sont plus petits en présence de 17 β -estradiol. La *SPFH domain-containing protein* est associée aux radeaux lipidiques de la membrane et est connue pour avoir un rôle dans la morphologie cellulaire et dans de nombreuses transductions de signaux. Afin de mieux caractériser l'impact de la liaison du 17 β -estradiol à cette protéine sur la physiologie bactérienne, les mécanismes impliqués dans la transduction des signaux induits par le 17 β -estradiol chez *L. crispatus* doivent être explorés. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'action du 17 β -estradiol suggère une modulation du système de régulation associée à la *SPFH domain-containing protein* chez *L. crispatus* V4 et CIP 104459. L'étude de l'impact de l'hormone sur les systèmes de régulations bactériens pourrait être envisagée. Ainsi, il serait intéressant de rechercher les variations d'expression des gènes suite à l'exposition des bactéries au 17 β -estradiol, dans le but de décrypter les mécanismes moléculaires de réponse à cette hormone. De même, une recherche d'éventuelles modifications d'expression protéique au niveau membranaire pourrait être envisagée, ainsi que celles impliquées dans l'élaboration de la couche S. L'analyse de l'expression des gènes ainsi que celles des protéines ne donne pas les mêmes informations et peuvent être complémentaires. A mon sens, une analyse des transcrits permettrait la recherche d'éléments génétiques régulateurs en ciblant différents opérons associés à l'ensemble des variations observées. La détection d'un gène plus ou moins exprimé dans une condition, pourrait être identifiée suite à la réponse moléculaire liée à la détection de l'hormone. La détection de l'hormone par une protéine implique forcément une réponse moléculaire, et une cascade de modifications entraînant les différents phénotypes observés. Enfin, ces deux observations permettraient peut-être la mise en évidence d'un mécanisme impliquant une détection et une réponse génétique entraînant la production ou la modification de son protéome ou sécrétome. Enfin, l'analyse génétique pourrait permettre de cibler des éléments non soupçonnés, liées à la

production de facteurs sécrétés (telles que les enzymes de dégradation du glycogène), la mise en évidence de voies de stress et d'adaptation de la bactérie. En parallèle, la technique d'immunoprécipitation pourrait être utilisée afin de rechercher l'interaction avec la protéine contenant le domaine SPFH ainsi que d'autres potentiels récepteurs en utilisant des anticorps dirigés contre le 17 β -estradiol suite à une mise en contact de l'hormone avec les extraits protéiques. Les anticorps récupérés à l'aide de billes contenant une protéine de liaison à la chaîne lourde de celui-ci pourraient ainsi être identifiés et séparés. Par cette technique, nous espérons retrouver des protéines capables de se lier au 17 β -estradiol et les identifier. Par la suite, le senseur pourrait être purifié, et son interaction avec l'hormone pourrait être étudiée par thermophorèse à microéchelle (MST) afin de calculer physiquement les constantes de liaison, le tout serait complémentaire à nos analyses hypothétiques d'interactions moléculaires réalisées informatiquement.

Comme nous l'avons décrit précédemment, d'autres molécules eucaryotes présentent un effet sur la physiologie bactérienne, et ce au niveau de la peau, mais aussi au niveau de l'intestin et du poumon. Nos résultats apportent de nouvelles données quant à la capacité des bactéries à percevoir les signaux de l'hôte. Cette notion est à l'origine même du dialogue inter-règnes, qui repose sur un échange de molécules entre l'hôte eucaryote et le commensal ou le symbiote procaryote. Enfin, nos résultats vont dans le sens de l'hypothèse d'une adaptation bactérienne, c'est-à-dire de la capacité des bactéries à percevoir des signaux qui ne leur sont pas destinés à l'origine, mais qui font partie intégrante de leur environnement, que ce soit de façon permanente ou transitoire. Cette adaptation offre aux bactéries la capacité de réagir rapidement à une modification dans son micro-environnement, et de percevoir, *via* la détection d'une hormone, des modifications de natures variées. Cette stratégie d'adaptation, est, comme nous l'avons décrit, cohérente avec l'histoire évolutive des procaryotes, mais également avec la variabilité des niches écologiques qui sont colonisées par ces micro-organismes, et donc avec le large panel de signaux présents en permanence dans leur microenvironnement.

Il serait intéressant d'ouvrir cette étude à d'autres lactobacilles de la microflore vaginale, comme *L. gasseri* ou *L. iners*. Cette étude permettrait peut-être d'expliquer en partie la dominance de *L. crispatus*, retrouvée dans la majorité des cas en condition normale. Le 17 β -estradiol pourrait être à l'origine d'une colonisation importante des membres de la microflore lactobacillaire vaginale lorsque les taux de l'hormone restent élevés. Ainsi, la compréhension de ce dialogue hormonal entre l'hôte et le micro-organisme pourrait permettre de proposer une thérapie pour les individus atteints de physiopathologies vaginales, ou tout simplement de restaurer une flore protectrice

normale chez les femmes ménopausées. Le développement de stratégies visant à l'implantation durable de bactéries bénéfiques telles que les *L. crispatus* pourrait être l'une de celles-ci. Elle aurait des conséquences au niveau gynécologique, mais également au niveau cosmétique, et enfin, avoir des implications au niveau des infections liées à la microflore vaginale au niveau médical.

Matériels et méthodes

I. Matériels et Méthodes

1. Obtention et conservation de la souche de *L. crispatus* CIP104459

La souche de référence *L. crispatus* CIP104459 a été obtenue auprès de la Collection de l'Institut Pasteur (CRBIP-Microorganism biobank catalogue, Paris, France). Elle a été isolée en 1955 d'un prélèvement vaginal de femme non ménopausée (maternité La Croix-Rousse, Lyon, France). Dès réception, les bactéries lyophilisées ont été réhydratées dans de l'eau physiologique (NaCl 0,9% ; pH 7,2) à température ambiante et des géloses De Man, Rogosa et Sharpe (MRS) (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) ont étéensemencées. Au bout de 48 heures à 37°C en anaérobiose, plusieurs colonies ont été cultivées en milieu liquide MRS afin de les cryoconserver dans un mélange MRS/Glycérol (80/20) à -140°C dans un cryofreezer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

2. Collecte et identification d'une nouvelle souche de *L. crispatus*

a. Écouvillonnage

i. *Panels de volontaires*

Dans le but de disposer de souches bactériennes vaginales cultivables, une collecte par écouvillonnage des micro-organismes colonisant naturellement les muqueuses vaginales saines de femmes volontaires ménopausées et non-ménopausées a été réalisée. Deux catégories de volontaires ont été considérées :

- Deux femmes volontaires non-ménopausées
- Deux femmes volontaires ménopausées

La sélection des volontaires et les prélèvements ont été réalisés par le laboratoire Bio-EC (Longjumeau, France) en accord avec les directives d'éthique française et européenne (ARS Biomedical Research Agreement 2012-12-010 et Bioethic Agreement DC-2008-542).

ii. *Récupération des germes*

Après la collecte, l'écouvillon a été introduit dans un tube stérile. L'ensemble a été transmis au LMSM et placé à 4°C jusqu'à la mise en culture des microorganismes.

b. Cultures et isolements

i. *Mise en culture*

La culture des microorganismes collectés a été effectuée à partir des écouvillons mis en suspension dans du milieu MRS (VWR, Fontenay-sous-Bois, France). L'ensemble a été agité au vortex pendant 10 secondes et une dilution en cascade a été réalisée puis ensemencé sur des géloses solides MRS. Les échantillons sont incubés en anaérobiose ou en atmosphère enrichie en CO₂ (5%) pendant 48 heures en condition statique à 37°C. Après incubation, chacune des colonies a été isolée et remise en suspension afin d'obtenir une culture pure.

ii. *Aspects macroscopiques*

L'aspect macroscopique a dans un premier temps été observé. Les critères pris en compte ont été l'opacité, la couleur, la régularité des bords et l'aspect général des colonies (crémeux, rugueux, muqueux).

c. Identification par analyse du protéome total par spectrométrie de masse MALDI TOF/TOF couplée au logiciel Biotyper®

Tous les isolats bactériens ont été soumis à une identification par analyse du protéome total suivant un protocole recommandé par le fournisseur de l'appareil. Pour cela, un spectromètre de masse Autoflex III Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight (MALDI TOF/TOF) 200 (Bruker) a été utilisé, couplé à l'utilisation du système algorithmique Biotyper 3.0 ®. Chacune des colonies présentant un aspect macroscopique différent a été soumise à une identification. Les colonies étudiées ont été prélevées et dissociées par homogénéisation en eau ultra pure (18,2 MΩ) stérile. Un culot bactérien a été obtenu après centrifugation (7500×g ; 1 min) et a été resuspendu dans de l'éthanol à 70% et centrifugé de nouveau. Le culot est alors repris dans de l'acide formique à 70% (v/v en acétonitrile). La suspension a été centrifugée deux minutes à 1600×g et 1 µL de surnageant a été déposé sur une plaque MALDI MTP 384. Après séchage, ce spot a été recouvert par 1 µL de matrice composée d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (10 mg/mL) repris dans un mélange composé de 50% d'acétonitrile et 2,5% d'acide trifluoroacétique (TFA). L'ensemble a été co-cristallisé à température ambiante à l'abri de la lumière.

L'instrument a été calibré avec un test bactérien standard (Bruker Daltonics). Les spectres obtenus sont alors comparés avec ceux présent dans une base de données (Biotyper 3.0). Le logiciel Biotyper génère des scores qui représentent la probabilité d'identification des

microorganismes. Ce score est calculé sur la base de signaux présents au niveau du spectre de référence qui correspondent au spectre moyen du micro-organisme à identifier. Si le score est inférieur à 1,7 le micro-organisme est considéré comme non-identifiable. Les scores compris entre 1,7 et 2,0 indiquent une bonne identification du genre bactérien, tandis que l'identification de l'espèce est considérée comme acceptable avec un score supérieur à 2,0.

d. Sélection des souches

Une nouvelle souche de *L. crispatus* a été identifiée et nommée V4 (quatrième prélèvement vaginal réalisé). Cette souche a été collectée chez une femme non ménopausée ne souffrant pas de pathologie identifiée. La cryopréservation de cette souche a été réalisée dans un mélange MRS/Glycérol (80/20) puis conservée à -140°C.

3. Séquençage de l'ADNr 16s de *L. cristapus* V4

Afin de pouvoir caractériser les souches collectées, un séquençage des gènes codant pour les ARNr 16s a été effectué.

a. Extraction

L'ADN génomique (ADNg) a été extrait à partir de la culture bactérienne en MRS après une lyse des cellules par une solution de lysozyme (20 mM Tris-HCL [pH 8,0], 2 mM EDTA, 1,2% Triton X-100, 20 mg/mL de lysozyme), suivi par un traitement par un kit d'extraction d'ADN (GeneJET genomic DNA purification kit, Thermo Fisher Scientific) en suivant les recommandations du producteur. A la dernière étape l'ADN a été récupéré des colonnes par centrifugation en eau ultra-pure traitée au DEPC (95284-Sigma aldrich, Darmstadt, Germany). Par la suite la qualité de l'ADNg extrait a été quantifiée par NanoDrop (Nanodrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachussetts) et son état a été vérifié par électrophorèse sur gel d'agarose (1%) et révélation par marquage au SYBR safe (S33111 Invitrogen, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachussetts). L'ADNg a été conservé à -20°C.

b. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les séquences des gènes de l'ARN ribosomique 16s ont dans un premier temps été amplifiées par PCR à partir de l'ADNg extrait, en utilisant des amorces universelles (Bodilis *et al.*, 2004) (Tableau 6). Les réactions de PCR ont été réalisées dans un volume final de 25 µl comprenant du tampon 2X MasterMix PCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis), 0,5 µM

de chaque amorce (Eurogentec, Liège, Belgique) et 10 ng d'ADNg extrait. La réaction de PCR a ensuite été réalisée dans un thermocycleur SimpliAmp™ (Applied Biosystem, Fisher Scientific), avec une première étape de dénaturation de l'ADN de 5 min à 98°C, 30 cycles d'amplification comprenant une étape de dénaturation de 10 sec à 98 °C, une étape d'appariement des amorces de 30 sec à la température d'appariement spécifique des amorces (55°C) et une étape d'élongation à 72°C dont la durée varie selon la longueur du fragment à amplifier et la vitesse de polymérisation de l'enzyme utilisée (1 min par kb). Un cycle d'élongation finale de 5 min termine la réaction afin de limiter les élongations incomplètes. Les fragments d'ADN amplifiés ont été visualisés par électrophorèse en gel d'agarose 1% (Invitrogen) dans un tampon TAE 1X (Tris HCl 40 mM, acétate de sodium 20 mM, EDTA 10 mM pH 7,9) (Biosolve). La migration a été effectuée dans un système d'électrophorèse RunOne (Embi Tec, San Diego, CA, Etats-Unis) pendant 25 min à 135 V. La révélation des bandes a été réalisée par fixation de SYBR Safe (Invitrogen) sur l'ADN et observation sous UV. Des marqueurs de taille moléculaire (0,1 à 12 kb, 1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen) permettent de déterminer la taille du ou des fragments.

Amorce	Séquence
63f	[5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAAGGC-3']
1387r	[5'-GGG CGG WGT GTACAA GGC-3']

Tableau 7 : Séquences des amorces.

c. Séquençage

Les produits PCR ont été séquencés par le prestataire Beckman Coulters, et les séquences obtenues ont permis d'identifier les espèces bactériennes par analyse bio-informatique.

d. Analyse bioinformatique

Les séquences obtenues ont été soumis à l'algorithme BLASTn sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) suivi d'une comparaison de séquences de la souche V4 avec la base de données de séquences codant pour les ARNr 16s de NCBI. La séquence de l'ADNr 16s de la souche V4 présente 100% d'identité avec les souches de *Lactobacillus crispatus* CO3MRS11 et AB70 accessibles sous les numéros GenBank CP033426 et CP026503, respectivement).

4. Séquençage de l'ADN génomique total de *L. crispatus* CIP 104459 et *L. crispatus* V4

Le génome de *L. crispatus* CIP 104459 n'ayant pas été précédemment séquencé, une étude a été réalisée sur les deux souches CIP 104459 et V4.

a. Vérifications et contrôles de la qualité de l'ADN extrait

La quantité et la qualité de l'ADNg extrait ont été vérifiées par détection sur NanoDrop (Nanodrop 2000 spectrophotometer, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts) et analyse sur Qubit (Qubit 4 fluorometer Invitrogen, Thermo Fisher scientific, Waltham, Massachusetts). L'ADNg a été conservé à -20°C.

b. Elaboration de la librairie

Des librairies génomiques ont été préparées avec le kit de préparation d'échantillons d'ADN Nextera XT (Illumina) et séquencées en chimie v3 et 2 × 250-bp paired ends sur une plateforme Illumina MiSeq selon les recommandations du constructeur.

c. Séquençage de L'ADN par Illumina Miseq

Le logiciel Trimmomatic v.0.36 (Bolger *et al.*, 2014) a été utilisé pour tronquer les reads générés. FastQC v.0.11.6 (Andrews S. 2010) a été utilisé pour vérifier leur qualité.

d. Assemblage

L'assemblage du génome a été réalisé *de novo* avec le logiciel Unicycler v.0.4.7 (Wick *et al.*, 2017) avec les paramètres par défaut. Quast v.5.0.0 (Mikheenko *et al.*, 2018) a été utilisé pour vérifier la cohérence de l'assemblage obtenu (c'est-à-dire la taille du génome, le nombre de contigs, N50, et contenu en G+C).

e. Annotation

L'assemblage final a été annoté à l'aide de Prokka v.1.13.4 (Seemann, 2014). Le séquençage du génome de *L. crispatus* CIP 104459 a été réalisé et déposé sur la plateforme DDBJ / ENA / GenBank sous le numéro d'accèsion VOMA00000000. Les données brutes correspondant à l'ensemble des reads ont été déposées dans la base de données Sequence Read Archive (SRA) sous le numéro d'accès SRR9860122 (Clabaut *et al.*, 2020). Le génome de *L. crispatus* V4, quant à lui, a été déposé sous le numéro d'accèsion SRLG00000000. Les

données brutes de séquençage ont été déposées dans la même base de données sous le numéro d'accès SRR8842498 (Clabaut *et al.*, 2019).

f. Analyses phylogénétiques

Les séquences du génome de *L. crispatus* V4 et 122 autres souches de *L. crispatus* (dont CIP104459), ainsi que *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* ATCC8293 (utilisé comme aberration pour enraciner l'arbre phylogénétique), ont été récupérées dans RefSeq. Les approches de l'identité nucléotidique moyenne (ANI) et de l'hybridation ADN-ADN *in silico* (isDDH ; en utilisant la formule 2 du GGDC) ont été utilisées pour déterminer la relation génétique entre les 124 séquences du génome en utilisant Pyani v.0.2.7 40 (Pritchard L. 2017) et le GGDC v. 2.1 (Genome-to-Genome Distance Calculator ; <http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>). MAUVE v.2.4.041 (Darling *et al.*, 2004) a été utilisé pour aligner V4 et CIP104459. Une analyse des pangénomes a été réalisée sur les séquences du génome V4 et CIP104459 en utilisant Roary v.3.1342 (Page *et al.*, 2015).

5. Conditions de culture des *L. crispatus* CIP104459 et V4

Ces bactéries ont été cultivées en anaérobiose dans 15 mL de milieu MRS (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) à 37°C en conditions statiques dans des tubes coniques de 15 mL (Corning®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). La densité optique (DO) des suspensions bactériennes a été déterminée par absorption à 600 nm en utilisant un spectrophotomètre (ThermoSpectronics, Cambridge, UK). L'absence de contamination a été contrôlée régulièrement par étalement sur des boîtes de Pétri d'agar MRS (VWR, Fontenay-sous-Bois, France).

6. 17 β -estradiol et conditions de traitements

Le 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) étant peu soluble en milieu aqueux, une solution mère a été réalisée par dilution dans de l'éthanol 100%. Cette solution a été utilisée directement par addition dans le MRS de façon à ce que la concentration finale en éthanol soit maintenue à 0,1% v/v. Les études en condition témoin ont été réalisées en utilisant le même pourcentage d'éthanol en MRS.

7. Conditions de culture des cellules VK2/E6E7

L'adhérence de *L. crispatus* CIP104459 et V4 aux cellules vaginales a été étudiée *in vitro* en utilisant la lignée cellulaire VK2/E6E7 (ATCC CRL-2616). Cette lignée cellulaire vaginale a été développée à partir du tissu muqueux vaginal d'une femme pré-ménopausée en bonne santé. Il a été maintenu et multiplié en utilisant un milieu sans sérum de kératinocytes (KSFM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis), supplémenté avec 0,05 mg/mL d'extrait d'hypophyse bovine, 0,1 ng/mL d'EGF recombinant humain et 44,1 mg/mL de chlorure de calcium comme recommandé par le fournisseur. Les cellules ont été cultivées et répliquées dans du milieu KSFM tous les 3 jours après avoir atteint la confluence. En bref, le surnageant de culture a été retiré du flacon (flacon de culture de tissu Falcon®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et 10 ml de PBS ont été ajoutés pour rincer les cellules. Le PBS a été éliminé et jeté et 5 mL de trypsine 0,25% (p/v)-0,03% (p/v) EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) ont été ajoutés afin de détacher les cellules. La flasque a ensuite été incubée pendant 10 minutes à 37°C. Lorsque les cellules ont commencé à se détacher, 2 mL de milieu contenant du sérum foetal bovin a été ajouté pour détacher les cellules restantes. Les cellules ont été transférées dans un tube conique de capacité 15 mL et centrifugées pendant 5 min à 3000 *xg*. Le surnageant a été jeté et les culots ont été remis en suspension dans 5 mL de PBS afin d'éliminer l'enzyme résiduelle avant d'être centrifugés à nouveau pendant 5 min à 3000 *xg*. Le surnageant a été jeté et le culot a été remis en suspension dans 5 mL de KSFM. Pour une nouvelle propagation, 2 mL de cette suspension cellulaire dans le KSFM ont été ajoutés à un nouveau flacon contenant 10 mL de KSFM supplémenté et incubés à 37°C avec du CO₂ à 5%.

8. Etude de l'effet du 17β-estradiol sur *L. crispatus* CIP 104459 et V4

a. Etude de l'effet du 17β-estradiol sur la croissance

Un volume de 200μL de culture bactérienne à une DO_{600nm} initiale de 0,08 a été déposé dans chaque puits d'une microplaque 96 puits et incubé dans des conditions anoxiques pendant 48h à 37°C avec agitation (360 tr/min) pendant dix secondes avant chaque lecture. Les courbes de croissance bactérienne ont été obtenues par mesure automatique toutes les 30 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaques multimodal (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

b. Etude de la fluidité membranaire par mesure d'anisotropie

La fluidité membranaire de *L. crispatus* CIP104459 et V4 a été déterminée par analyse de fluorescence et mesure d'anisotropie, comme décrit précédemment (Flécharde *et al.*, 2018). Pour cela, les bactéries cultivées en l'absence ou en présence de 17β-estradiol soit dès le début de

l'expérience soit pendant 3 heures avec le 17 β -estradiol après 6, 18 ou 24 heures de culture ont été collectées par centrifugation et lavées deux fois à 7500 $\times g$ pendant 5 min à température ambiante dans du MgSO₄ 10 mM. Les culots ont été remis en suspension dans la même solution et la DO_{600 nm} a été ajustée à 0,1. Dans des eppendorfs de 1.5mL, 1 mL de la suspension bactérienne a été ajouté, puis 1 μ L de 1,6-diphényl-1,3,5-hexatriène (DPH) 4 mM dans du tétrahydrofurane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) a été ajouté en évitant la lumière. Les aliquots ont ensuite été incubés dans l'obscurité pendant 30 minutes à 37°C pour permettre l'incorporation du DPH dans la membrane bactérienne. La polarisation de fluorescence a été mesurée en utilisant un lecteur de microplaques multimodal Spark 20 M, équipé d'un système de régulation de température actif (Te-Cool™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission ont été fixées à 365 et 425 nm, respectivement. Chaque mesure a été réalisée en triplicats biologiques. L'anisotropie membranaire (r) a été calculée selon Lakowicz (Lakowicz, 2006). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel SparkControl™ 2.1 (Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

c. Etude de l'adhésion microbienne aux solvants (Tests MATS)

La polarité de surface et les propriétés acido-basiques de Lewis de *L. cristapus* CIP104459 et V4 exposées ou non au 17 β -estradiol ont été étudiées à l'aide de la technique d'adhésion microbienne aux solvants (MATS) (Bellon-Fontaine *et al.*, 1996).

Les bactéries ont été cultivées dans du MRS et récoltées par centrifugation (7 500 $\times g$, 10 min). Après 18 h d'incubation, les culots ont été lavés deux fois dans du tampon PBS (Lonza™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis) afin d'éliminer les traces de milieu de culture. Deux couples de solvants: chloroforme / hexadécane et acétate d'éthyle / n-décane ont été utilisés. Pour chaque condition, 1,2 ml de suspension bactérienne à une DO_{400nm} = 0,8 a été mélangé pendant 60 secondes avec 0,2 ml de chaque solvant. Après 15 min d'incubation et séparation des phases aqueuse et organique, la DO_{400nm} de la phase aqueuse a été mesurée. Le pourcentage de bactéries se retrouvant dans chaque phase organique (phase solvant) a été calculé en utilisant l'équation suivante avec [AO], la DO_{400nm} de la phase aqueuse sans solvant et [A] la DO_{400nm} de la phase aqueuse après exposition au solvant:

$$\% \text{ d'affinité pour le solvant} = (1-A) / A0 \times 100$$

d. Étude de la capacité à s'auto-agréger par la technique de sédimentation

L'observation du comportement de *L. crispatus* CIP104459 et V4 en microplaques suggérant la formation potentielle d'agrégats bactériens, l'auto-agrégation a été étudiée selon la technique décrite par (Vandevoorde *et al.*, 1992). En bref, des cultures de *L. crispatus* CIP104459 cultivées dans du MRS pendant 18 heures dans des conditions statiques, anoxiques, à 37°C et en l'absence ou en présence de 17β-estradiol, ont été récoltées par centrifugation (7500 *xg*, 5 min à température ambiante), lavées deux fois avec du PBS, et remise en suspension dans 10 mL du même surnageant de culture pour chaque condition. Après 1,5 minute d'agitation (vortex) qui a défini le T=0 de l'expérience, la variation de DO_{600nm} de la suspension a été mesurée une seconde fois après 30 minutes d'incubation en utilisant un spectrophotomètre (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Le pourcentage d'auto-agrégation après 30 min a été calculé selon l'équation suivante:

$$\% \text{ auto-aggregation} = \left(\frac{DO_{0\text{min}} - DO_{30\text{min}}}{DO_{0\text{min}}} \right) \times 100$$

Où DO_{0min} représente la DO_{600nm} initiale à T = 0 et DO_{30min} la DO_{600nm} finale après 30 min.

e. Etude de la capacité à s'auto-agréger par cytométrie en flux

L'auto-agrégation a également été étudiée par cytométrie en flux (CytoFlex S, Beckman coulter Life science, Indianapolis, USA) et le logiciel CytExpert fourni par le constructeur. Dans ces études, la suspension bactérienne a été récoltée par centrifugation (7500 *xg*, 5 min à température ambiante) après 18h de culture en l'absence ou en présence de 17β-estradiol a été remise en suspension dans du PBS. Un volume de 200 µL des suspensions bactériennes a été distribué dans des puits d'une microplaque de 96 puits (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) et analysées après 30 minutes sans agitation et sans coloration par injection dans le cytomètre de flux. Un minimum de 10 000 événements à DO_{488nm} +/- 4nm (canal SSC) et DO_{525nm} +/- 20nm (canal FSC) a été enregistré à un débit de 10 µL.min⁻¹ dans chaque condition. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Cytexpert. Le pourcentage de la population organisée sous forme d'agrégats a été calculé par le pourcentage dans la zone Q1-UR du graphe (zone rouge). La taille est évaluée sur l'échelle FSC-A et le pourcentage de la population de petites bactéries est représenté dans la zone Q1-UL et Q1-LL. La granulométrie est représentée à l'échelle SSC-A et une complexité accrue est représentée dans la zone Q1-UL et Q1-Ur (Figure 21 représentation d'un graph de cyto).

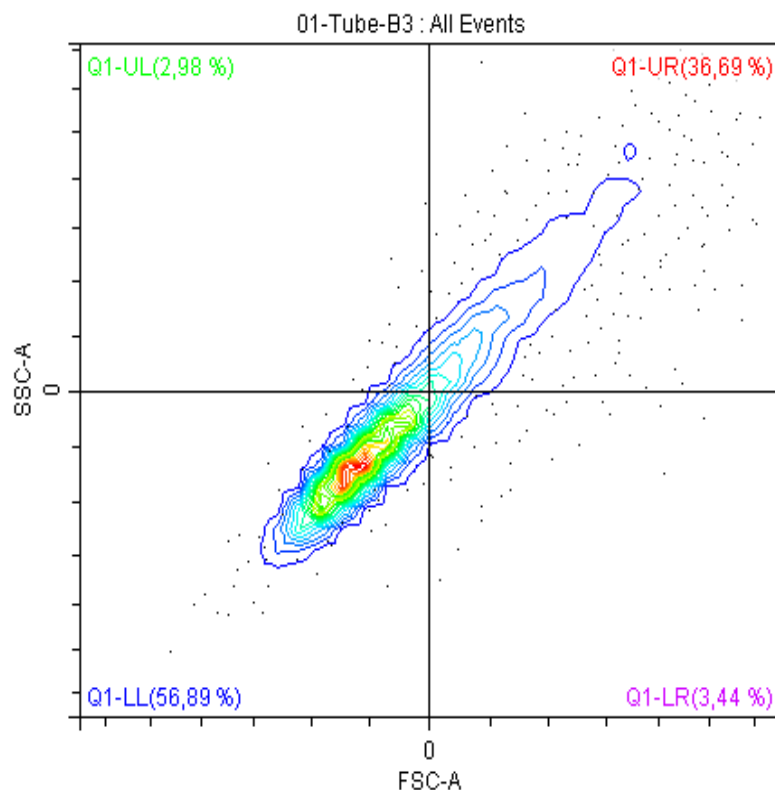


Figure 21 : Exemple de graphique utilisé pour la représentation de l'analyse de cytométrie en flux

f. Microscopie électronique à balayage

La morphologie des *L. crispatus* CIP 104459 et V4 a été étudiée par microscopie électronique à balayage en utilisant un microscope TENEO VolumeScope (FEI, Hillsboro, OR, USA) sous 10 kV. Pour cela, *L. crispatus* a été cultivé pendant 18h en l'absence (témoin) ou en présence de 17β -estradiol puis collectés par centrifugation (7 500 xg , 10 min). Pour la fixation, les culots bactériens ont été immergés dans 1 mL de glutaraldéhyde à 2,5% dans un tampon phosphate 1 M, pH 7,1 pendant 1 h. La préparation des échantillons a été effectuée comme décrit précédemment (Verdon *et al.*, 2016). Après traitement HMDS (hexaméthylsilazane), la surface du filtre a été revêtue d'une couche électriquement conductrice de 25 nm d'épaisseur de revêtement constitué d'alliage de platine dans une chambre à vide par pulvérisation (LEICA EM ACE600 sputter coater, Wetzlar, Allemagne). Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire EBI (CNRS UMR7267), Université de Poitiers.

g. Analyse de la capacité à produire des biosurfactants

i. *Observation du tapis bactérien sur gélose MRS*

Les cultures sur gélose MRS ont montré que *L. crispatus* CIP104459 en présence de 17 β -estradiol formait des colonies visqueuses et fluides s'écoulant à la surface du milieu de culture, suggérant une production de biosurfactant.

i. Extraction des biosurfactants à partir des colonies sur géloses solides

Les boîtes MRS gélosées ont été inoculées en surface par 100 μ L de suspension bactérienne à une DO_{600nm} de 0,08 pour le témoin ainsi que celles en présence de 17 β -estradiol pour obtenir un tapis bactérien. Le tapis bactérien a été cultivé pendant 24 heures en anaérobiose à 37°C, avant d'être récupéré à trois reprises dans 5mL d'eau de volvic à l'aide d'un râteau (Meylheuc *et al.*, 2001), La suspension a ensuite été agitée vigoureusement par vortex pendant 3 minutes et centrifugée deux fois pendant 30 minutes à 4°C (10 000 x g) pour éliminer les bactéries et les fragments résiduels. Le surnageant a été recueilli et conservé à 4°C.

ii. *Technique de la goutte posée*

La présence de biosurfactant en solution a été étudiée par la technique de la goutte de surnageant de 20 μ L posée sur une surface en polystyrène (Drelich, 2015). La visualisation de l'angle de contact avec la surface a été réalisée par photographie.

iii. *Technique de la goutte pendante*

La forme des gouttes de surnageant a été analysée à l'aide d'un tensiomètre de surface DSA30 équipé d'une caméra (Kruss, Hambourg, Allemagne). La tension superficielle, ou tension interfaciale, a été calculée à l'aide du logiciel d'analyse de forme de goutte basé sur l'équation de Young-Laplace (Berry *et al.*, 2015). Afin de prendre en considération toute variation potentielle due à la biomasse bactérienne collectée, les valeurs de tension superficielle calculées ont été corrélées à la DO_{600nm} de la suspension bactérienne mesurée immédiatement après la récupération et l'agitation du tapis bactérien.

h. Etude du potentiel d'adhérence sur les cellules épithéliales vaginales VK2/E6E7

Pour l'évaluation de l'adhérence bactérienne, des cellules VK2/E6E7 ont été exposées à *L. crispatus* CIP104459 ou V4 cultivées pendant 18 heures dans un milieu MRS ou SGTS avec ou sans 17 β -estradiol à une MOI (multiple of infection) de 100 bactéries/cellule. Des expériences ont été réalisées en utilisant un milieu sans sérum de kératinocytes (KSFM) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis) sans ajout d'antibiotiques et les cellules VK2/E6E7 atteignant un minimum de 80% de confluence. Après 1 h d'interactions bactéries/cellules, le milieu a été retiré lentement pour retirer les bactéries planctoniques (non adhérentes aux cellules) et rincé soigneusement avec du KSFM sans antibiotiques. Ensuite, les cellules VK2/E6E7 ont été traitées par addition de 0,1% de triton X-100 dans du PBS. Le lysat a été dilué dans du milieu MRS et étalé sur des boîtes de Pétri contenant du MRS agar. Le nombre de cellules adhérentes aux bactéries a été déduit du comptage direct des colonies de *L. crispatus* en croissance après 48 heures de culture à 37°C dans des conditions d'anaérobiose. Cette étude a été réalisée au sein du Laboratoire CBM (CNRS UPR4301), Université d'Orléans.

i. Etude de la capacité à former des biofilms par la technique de la coloration au cristal violet

La formation de biofilms par *L. crispatus* CIP104459 et V4 a été initialement étudiée en utilisant la technique de la coloration au cristal violet (O'Toole, 2011). Les DO_{600nm} de solutions de bactéries cultivées dans du MRS pendant 48 heures ont été ajustées à 0,1 dans un volume final de 10 ml et distribuées dans des plaques de polystyrène stériles de 24 puits (Falcon®, Durham, USA, 1mL/puit). Les plaques ont été incubées en anaérobiose à 37°C sans agitation pendant 48 heures. A la fin de la période d'incubation, le milieu a été retiré par aspiration et les bactéries non adhérentes ont été éliminées par deux lavages avec de l'eau physiologique (NaCl 0,9% ; pH 7,2). Les biofilms ont été colorés par incubation avec du cristal violet (0,1% v/v dans de l'eau ultrapure stérile 18,2 M Ω) pendant 10 minutes à température ambiante. L'excès de colorant a été éliminé par trois lavages successifs dans de l'eau 18,2 M Ω . Le cristal violet adsorbé dans la matrice du biofilm et sur les bactéries a été solubilisé avec de l'éthanol absolu (100%) et la DO_{595nm} de la solution a été déterminée en utilisant un lecteur de plaque automatisé (Te-Cool™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suisse).

j. Etude de la capacité à former des biofilms par microscopie confocale à balayage laser

Pour l'observation par microscopie confocale à balayage laser de la structure des biofilms de *L. crispatus* CIP104459 et V4, les bactéries ont été pré-cultivées en MRS et les biofilms ont été produits dans du milieu simulant les sécrétions vaginales (SGTS) adapté de (Geshnizgani and

Onderdonk, 1992). Le choix de ce milieu a été imposé par l'observation de l'impossibilité pour *L. crispatus* cultivé en MRS de former des biofilms sur support de verre comme exigé pour la microscopie. Le 17 β -estradiol, ou une quantité équivalente d'éthanol dans le milieu, a été administré du début de l'incubation à la fin de la formation du biofilm. Pour les études de microscopie confocale, des pré-cultures de 48 h dans du milieu MRS ont été récoltées par centrifugation (7500 xg , 10 min). Les bactéries ont été remises en suspension dans du milieu frais SGTS et la suspension a été ajustée à une $DO_{600nm} = 0,1$. Un volume de 1mL de suspension contenant ou non du 17 β -estradiol a été déposé dans des microplaques 24 puits à fond plat en verre (Sensoplate, Greiner bio-one, Allemagne). Les microplaques ont été incubées pendant 48 heures dans des conditions statiques et anoxiques pour permettre la formation de biofilms. Les puits ont été lavés deux fois avec de l'eau physiologique afin d'éliminer les bactéries planctoniques restantes et les biofilms ont été colorés avec le marqueur fluorescent SYTO 9 Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Chaque puit a été examiné sous un microscope confocal à balayage laser inversé LSM 710 (Zeiss, Marly-le-Roi, France) à l'aide du progiciel Zen 2009 (Version 12.0.1.362). Les images ont été reconstruites et analysées à l'aide du logiciel COMSTAT2 associé au microscope. L'épaisseur moyenne du biofilm (μm), le volume moyen de biomasse ($\mu m^3/\mu m^2$) et le coefficient de rugosité ont été calculés sur un minimum de 30 observations pour chaque condition.

k. Composition du Milieu simulant les sécrétions du tractus génital (SGTS)

Corposants	Concentration finale (g/L)
Part 1^a	
NaCl	3,5
KCL	1,5
K ₂ HPO ₄	1,74
KH ₂ PO ₄	1,36
Dextrose	10,8
Cysteine HCL	0,5
Part 2^b	
Glycogen	1
Mucin	0,25
Tween 20	0,2
Urea	0,5
Hemin	0,5
Albumine	0,2
MgSO ₄ *	0,3
NaHCO ₃ *	0,04
Part 3	
Vitamin mix ^d	5 mL de solution 100X

Tableau 8 : Composition du milieu “simulating genital tract secretion” (SGTS).

*Solutions stérilisées par filtration sur des membranes de porosité 0,22 µm.

^aPréparés par dissolution dans de l'eau ultra pure 18,2 MΩ. Le pH a été ajusté à 7,2 avec du NaOH (1M) avant autoclavage (15 min – 121°C).

^bLa partie 2 consiste en la préparation de 8 composants préparés séparément et autoclavés pendant 15 min à 121°C.

La solution d'albumine humaine (Sigma-Aldrich) a été pasteurisée pendant 10 heures à 60°C.

9. Etude du protéome

a. Extraction protéique

L'extraction a été réalisée après 18 heures de culture en présence ou non de 17 β -estradiol. Toutes les étapes d'extraction par la suite ont été réalisées à environ 4°C, sur glace pilée. Les bactéries ont été récupéré après centrifugation (7 500xg – 10min). Les culots ont subi 3 lavages successifs par centrifugation (7 500xg – 10min) et repris à chaque étape dans du tampon Tris-HCl pH 7,4 (20mM). Un inhibiteur de protéase a été ajouté (cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). Pour chaque condition, 3mL ont été répartis dans 3 tubes contenant des billes de verre de 0,1mm de diamètre (VK01 -2 mL, P000914-LYSK0-A, Precellys, Bertin Technologies Montigny-le-Bretonneux, France) et les cellules ont été lysées mécaniquement par centrifugation trois fois à 6800 rpm pendant 30 secondes avec 30 secondes de pause entre chaque cycle, à l'aide d'un broyeur à billes – homogénéiseur (Precellys 24, Bertin Technologies Montigny-le-Bretonneux, France) maintenu à 4°C grâce à un module de refroidissement intégré (Cryolys® Evolution). Les échantillons ont ensuite été traités avec de la benzonase (Benzonase Nuclease E1014-5KU, Sigma aldrich, Darmstadt, Germany) et MgCl₂ (REF 036226, Alfa Aesar) pendant 30 minutes à 4°C.

b. Dosage des protéines

La concentration en protéines a été estimée par la méthode de Bradford. Une gamme de concentration de sérum albumine bovine (BSA) est formulée à partir d'une solution mère préparée à 2mg/mL. 50 μ L d'échantillon ou de la gamme sont mélangés à 1,2 mL de solution de Bradford (Pierce Coomassie Plus Protein Assay Reagent 23238 Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), incubés 15 min à l'obscurité à température ambiante. La mesure est réalisée à une DO de 595nm. Par la suite les échantillons ont été conservés à -20°C.

c. Analyse par NanoLC-MS/MS

Pour chaque condition, trois aliquotes de 500 μ L ont été préparés. Ces échantillons ont été adressés au Dr J. Hardouin (Laboratoire PBS, UMR6270 CNRS de l'Université de Rouen) qui en

a réalisé l'analyse à l'aide d'un appareil LTQ-Orbitrap Elite couplé à un système Easy nLC II (Thermo Scientific, Villebon-sur-Yvette, France).

10. Recherche du récepteur potentiel du 17 β estradiol chez *L. crispatus* CIP104459 et V4

L'existence d'une protéine homologue d'un récepteur humain pour l'estradiol a été réalisée par alignement du génome séquencé de la bactérie avec 9 protéines de liaison du 17 β estradiol disponibles sur UniProtKB

Le génome de *L. crispatus* CIP104459 et V4 a été aligné par BLASTp sur ExPASy (<https://web.expasy.org/blast>) avec la séquence annotée de *L. crispatus* CO3MRSI134 pour améliorer sa définition. La séquence en acides aminés FASTA du génome de *L. crispatus* CIP104459 et V4 a ensuite été alignée sur la séquence des récepteurs d'œstrogènes humains connus listés dans le Tableau 8.

UniProtKB Accession Number	Human gene	Name
P03372	ESR1	ESR1_HUMAN Estrogen receptor
O95718	ESRRB	ERR2_HUMAN Steroid hormone receptor ERR2
Q99527	GPER1	GPER1_HUMAN G-protein coupled estrogen receptor 1
P62508	ESRRG	ERR3_HUMAN Estrogen-related receptor gamma
Q92731	ESR2	ESR2_HUMAN Estrogen receptor beta
Q99623	PHB2	PHB2_HUMAN Prohibitin-2
Q8NI08	NCOA7	NCOA7_HUMAN Nuclear receptor coactivator 7
P49888	SULT1E1	ST1E1_HUMAN Estrogen sulfotransferase
Q86YN6	PPARGC1B	PRGC2_HUMAN Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-beta

Tableau 9 : Liste et références des 9 récepteurs humains au 17 β -estradiol testés pour la recherche d'homologie avec les protéines de *L. crispatus* CIP104459 et V4.

11. Analyses de la liaison du 17 β estradiol par docking moléculaire

Une protéine bactérienne présentant une forte homologie avec les récepteurs d'œstrogènes humains a été identifiée et soumise à une analyse par docking moléculaire en utilisant 17 β -estradiol comme ligand potentiel. Des modèles 3D des protéines de *L. crispatus* ont été générés à l'aide de RaptorX Structure (Källberg *et al.*, 2012) et visualisés à l'aide de Python Molecular Viewer V1.5.6. La prédiction a été réalisée par alignement sur la structure cristallisée de l'orthologue eucaryote correspondante. La liaison potentielle de la 17 β -estradiol à la protéine senseur identifiée a été étudiée à l'aide d'AutoDock 4.2.59. Les valeurs de liaison ont été générées à l'aide de l'algorithme génétique lamarkien d'AutoDock 4.2. Tous les calculs ont été effectués à l'aide d'un ordinateur DELL PowerEdge T420 équipé de quatre disques durs (4 To chacun, pour un total de 12 To sous RAID5).

12. Analyses statistiques

Toutes les valeurs expérimentales ont été évaluées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6.01

Références bibliographiques

- Abramov, V., Khlebnikov, V., Kosarev, I., Bairamova, G., Vasilenko, R., Suzina, N., *et al.* (2014). Probiotic Properties of *Lactobacillus crispatus* 2,029: Homeostatic Interaction with Cervicovaginal Epithelial Cells and Antagonistic Activity to Genitourinary Pathogens. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 6, 165–176. doi:10.1007/s12602-014-9164-4.
- Ahmed, K., Tunaru, S., and Offermanns, S. (2009). GPR109A, GPR109B and GPR81, a family of hydroxy-carboxylic acid receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* 30, 557–562. doi:10.1016/j.tips.2009.09.001.
- Alakomi, H.-L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., and Helander, I. M. (2000). Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2001–2005. doi:10.1128/AEM.66.5.2001-2005.2000.
- Alander, M., Satokari, R., Korpela, R., Saxelin, M., Vilpponen-Salmela, T., Mattila-Sandholm, T., *et al.* (1999). Persistence of colonization of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG, after oral consumption. *Appl Environ Microbiol* 65, 351–354. doi:10.1128/AEM.65.1.351-354.1999.
- Aldunate, M., Srbinovski, D., Hearps, A. C., Latham, C. F., Ramsland, P. A., Gugasyan, R., *et al.* (2015). Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front. Physiol.* 6. doi:10.3389/fphys.2015.00164.
- Allsworth, J. E., and Peipert, J. F. (2007). Prevalence of Bacterial Vaginosis: 2001–2004 National Health and Nutrition Examination Survey Data. *Obstetrics & Gynecology* 109, 114–120. doi:10.1097/01.AOG.0000247627.84791.91.
- Alvarez-Olmos, M. I., Barousse, M. M., Rajan, L., Van Der Pol, B. J., Fortenberry, D., Orr, D., *et al.* (2004). Vaginal Lactobacilli in Adolescents: Presence and Relationship to Local and Systemic Immunity, and to Bacterial Vaginosis. *Sexually Transmitted Diseases* 31, 393–400. doi:10.1097/01.OLQ.0000130454.83883.E9.
- Amabebe, E., and Anumba, D. O. C. (2018). The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* 5, 181. doi:10.3389/fmed.2018.00181.
- Anahtar, M. N., Byrne, E. H., Doherty, K. E., Bowman, B. A., Yamamoto, H. S., Soumillon, M., *et al.* (2015). Cervicovaginal Bacteria Are a Major Modulator of Host Inflammatory Responses in the Female Genital Tract. *Immunity* 42, 965–976. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.019.
- Anderson, D. J., Marathe, J., and Pudney, J. (2014). The Structure of the Human Vaginal Stratum Corneum and its Role in Immune Defense. *American Journal of Reproductive Immunology* 71, 618–623. doi:https://doi.org/10.1111/aji.12230.
- Antikainen, J., Anton, L., Sillanpää, J., and Korhonen, T. K. (2002). Domains in the S-layer protein CbsA of *Lactobacillus crispatus* involved in adherence to collagens, laminin and lipoteichoic acids and in self-assembly. *Molecular Microbiology* 46, 381–394. doi:https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03180.x.
- Arnold, K. B., Burgener, A., Birse, K., Romas, L., Dunphy, L. J., Shahabi, K., *et al.* (2016). Increased levels of inflammatory cytokines in the female reproductive tract are associated with altered expression of proteases, mucosal barrier proteins, and an influx of HIV-susceptible target cells. *Mucosal Immunol* 9, 194–205. doi:10.1038/mi.2015.51.

- Aroutcheva, A., Ling, Z., and Faro, S. (2008). Prevootella *bivia* as a source of lipopolysaccharide in the vagina. *Anaerobe* 14, 256–260. doi:10.1016/j.anaerobe.2008.08.002.
- Arranz, E., Peña, A. S., and Bernardo, D. (2013). Mediators of Inflammation and Immune Responses in the Human Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation* 2013, e865638. doi:https://doi.org/10.1155/2013/865638.
- Avall-Jääskeläinen, S., and Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiol Rev* 29, 511–529. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.003.
- Bach, J. N., and Bramkamp, M. (2013). Flotillins functionally organize the bacterial membrane. *Molecular Microbiology* 88, 1205–1217. doi:https://doi.org/10.1111/mmi.12252.
- Bellon-Fontaine, M.-N., Rault, J., and van Oss, C. J. (1996). Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47–53. doi:10.1016/0927-7765(96)01272-6.
- Berry, J. D., Neeson, M. J., Dagastine, R. R., Chan, D. Y. C., and Tabor, R. F. (2015). Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry. *Journal of Colloid and Interface Science* 454, 226–237. doi:10.1016/j.jcis.2015.05.012.
- Bertsch, A., Roy, D., and LaPointe, G. (2019). Enhanced Exopolysaccharide Production by Lactobacillus rhamnosus in Co-Culture with Saccharomyces cerevisiae. *Applied Sciences* 9, 4026. doi:10.3390/app9194026.
- Beury-Cirou, A., Tannières, M., Minard, C., Soullère, L., Rasamiravaka, T., Dodd, R. H., *et al.* (2013). At a Supra-Physiological Concentration, Human Sexual Hormones Act as Quorum-Sensing Inhibitors. *PLoS ONE* 8, e83564. doi:10.1371/journal.pone.0083564.
- Birse, K., Arnold, K. B., Novak, R. M., McCorrister, S., Shaw, S., Westmacott, G. R., *et al.* (2015). Molecular Signatures of Immune Activation and Epithelial Barrier Remodeling Are Enhanced during the Luteal Phase of the Menstrual Cycle: Implications for HIV Susceptibility. *J. Virol.* 89, 8793–8805. doi:10.1128/JVI.00756-15.
- Blaskewicz, C. D., Pudney, J., and Anderson, D. J. (2011). Structure and Function of Intercellular Junctions in Human Cervical and Vaginal Mucosal Epithelia. *Biol Reprod* 85, 97–104. doi:10.1095/biolreprod.110.090423.
- Bodilis, J., Calbrix, R., Guérillon, J., Mérieau, A., Pawlak, B., Orange, N., *et al.* (2004). Phylogenetic Relationships Between Environmental and Clinical Isolates of Pseudomonas fluorescens and Related Species Deduced from 16S rRNA Gene and OprF Protein Sequences. *Systematic and Applied Microbiology* 27, 93–108. doi:10.1078/0723-2020-00253.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Boot, H. J., Kolen, C. P., Pot, B., Kersters, K., and Pouwels, P. H. (1996). The presence of two S-layer-protein-encoding genes is conserved among species related to Lactobacillus acidophilus. *Microbiology (Reading)* 142 (Pt 9), 2375–2384. doi:10.1099/00221287-142-9-2375.

- Borenstain, V., and Barenholz, Y. (1993). Characterization of liposomes and other lipid assemblies by multiprobe fluorescence polarization. *Chemistry and Physics of Lipids* 64, 117–127. doi:10.1016/0009-3084(93)90061-7.
- Borgdorff, H., Gautam, R., Armstrong, S. D., Xia, D., Ndayisaba, G. F., van Teijlingen, N. H., *et al.* (2016). Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol* 9, 621–633. doi:10.1038/mi.2015.86.
- Borges, S., Silva, J., and Teixeira, P. (2014). The role of lactobacilli and probiotics in maintaining vaginal health. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 289, 479–489. doi:10.1007/s00404-013-3064-9.
- Boris, S., and Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection* 2, 543–546. doi:10.1016/S1286-4579(00)00313-0.
- Boris, S., Suárez, J. E., Vázquez, F., and Barbés, C. (1998). Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens. *Infection and Immunity* 66, 1985–1989. doi:10.1128/IAI.66.5.1985-1989.1998.
- Borrel, V., Thomas, P., Catovic, C., Racine, P.-J., Konto-Ghiorghi, Y., Lefeuvre, L., *et al.* (2019). Acne and Stress: Impact of Catecholamines on Cutibacterium acnes. *Front. Med.* 6. doi:10.3389/fmed.2019.00155.
- Boskey, E. R., Cone, R. A., Whaley, K. J., and Moench, T. R. (2001). Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod* 16, 1809–1813. doi:10.1093/humrep/16.9.1809.
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R., and Cone, R. A. (1999). Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect Immun* 67, 5170–5175. doi:10.1128/IAI.67.10.5170-5175.1999.
- Boyd, M. A., Antonio, M. A. D., and Hillier, S. L. (2005). Comparison of API 50 CH Strips to Whole-Chromosomal DNA Probes for Identification of Lactobacillus Species. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5309–5311. doi:10.1128/JCM.43.10.5309-5311.2005.
- Bramkamp, M., and Lopez, D. (2015). Exploring the Existence of Lipid Rafts in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79, 20.
- Breshears, L. M., Edwards, V. L., Ravel, J., and Peterson, M. L. (2015). Lactobacillus crispatus inhibits growth of Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model. *BMC Microbiology* 15, 276. doi:10.1186/s12866-015-0608-0.
- Brotman, R. M. (2011). Vaginal microbiome and sexually transmitted infections: an epidemiologic perspective. *J Clin Invest* 121, 4610–4617. doi:10.1172/JCI57172.
- Brotman, R. M., Ravel, J., Bavoiil, P. M., Gravitt, P. E., and Ghanem, K. G. (2014). Microbiome, sex hormones, and immune responses in the reproductive tract: Challenges for vaccine development against sexually transmitted infections. *Vaccine* 32, 1543–1552. doi:10.1016/j.vaccine.2013.10.010.

- Brotman, R. M., Ravel, J., Cone, R. A., and Zenilman, J. M. (2010). Rapid fluctuation of the vaginal microbiota measured by Gram stain analysis. *Sexually Transmitted Infections* 86, 297–302. doi:10.1136/sti.2009.040592.
- Browman, D. T., Hoegg, M. B., and Robbins, S. M. (2007). The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends Cell Biol* 17, 394–402. doi:10.1016/j.tcb.2007.06.005.
- Buck, B. L., Altermann, E., Svingerud, T., and Klaenhammer, T. R. (2005). Functional Analysis of Putative Adhesion Factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *AEM* 71, 8344–8351. doi:10.1128/AEM.71.12.8344-8351.2005.
- Butler, D. S. C., Silvestroni, A., and Stapleton, A. E. (2016). Cytoprotective Effect of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 against Uropathogenic *E. coli*. *Pathogens* 5, 27. doi:10.3390/pathogens5010027.
- Campisciano, G., Zanotta, N., Petix, V., Corich, L., De Seta, F., and Comar, M. (2018). Vaginal microbiota dysmicrobism and role of biofilm-forming bacteria. *Front Biosci (Elite Ed)* 10, 528–536.
- Carbonnelle, E., Mesquita, C., Bille, E., Day, N., Dauphin, B., Beretti, J.-L., et al. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* 44, 104–109. doi:10.1016/j.clinbiochem.2010.06.017.
- CATO, E. P., MOORE, W. E. C., and JOHNSON, J. L. (1983). Synonymy of Strains of “*Lactobacillus acidophilus*” Group A2 (Johnson et al. 1980) with the Type Strain of *Lactobacillus crispatus* (Brygoo and Aladame 1953) Moore and Holdeman 1970. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33, 426–428. doi:10.1099/00207713-33-2-426.
- Cauci, S., Driussi, S., Santo, D. D., Penacchioni, P., Iannicelli, T., Lanzafame, P., et al. (2002). Prevalence of Bacterial Vaginosis and Vaginal Flora Changes in Peri- and Postmenopausal Women. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2147–2152. doi:10.1128/JCM.40.6.2147-2152.2002.
- Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M., et al. (2015). Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *J Appl Microbiol* 118, 1116–1125. doi:10.1111/jam.12760.
- Cesena, C., Morelli, L., Alander, M., Siljander, T., Tuomola, E., Salminen, S., et al. (2001). *Lactobacillus crispatus* and its Nonaggregating Mutant in Human Colonization Trials. *Journal of Dairy Science* 84, 1001–1010. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74559-6.
- Chahal, H. S., and Drake, W. M. (2007). The endocrine system and ageing. *The Journal of Pathology* 211, 173–180. doi:https://doi.org/10.1002/path.2110.
- Chapot-Chartier, M.-P., and Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13, S9. doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
- Chee, W. J. Y., Chew, S. Y., and Than, L. T. L. (2020). Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microb Cell Fact* 19, 203. doi:10.1186/s12934-020-01464-4.
- Chen, X., Xu, J., Shuai, J., Chen, J., Zhang, Z., and Fang, W. (2007). The S-layer proteins of *Lactobacillus crispatus* strain ZJ001 is responsible for competitive exclusion against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium*. *Int J Food Microbiol* 115, 307–312. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.007.

- Cheng, X., Huang, L., and Li, K. (2019). Antioxidant activity changes of exopolysaccharides with different carbon sources from *Lactobacillus plantarum* LPC-1 and its metabolomic analysis. *World J Microbiol Biotechnol* 35, 68. doi:10.1007/s11274-019-2645-6.
- Chotirmall, S. H., Gunaratnam, C., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2012). Effect of Estrogen on *Pseudomonas* Mucoidy and Exacerbations in Cystic Fibrosis. *n engl j med*, 9.
- Chung, M., Munro, J. B., Tettelin, H., and Dunning Hotopp, J. C. (2018). Using Core Genome Alignments To Assign Bacterial Species. *mSystems* 3. doi:10.1128/mSystems.00236-18.
- Clabaut, M., Boukerb, A. M., Racine, P.-J., Pichon, C., Kremser, C., Picot, J.-P., *et al.* (2020). Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* CIP 104459, Isolated from a Vaginal Swab. *Microbiol Resour Announc* 9. doi:10.1128/MRA.01373-19.
- Clabaut, M., Boukerb, A. M., Racine, P.-J., Pichon, C., Kremser, C., Queiroz, A., *et al.* (2019). Draft Genome Sequence of *Lactobacillus crispatus* Strain V4, Isolated from a Vaginal Swab from a Young Healthy Nonmenopausal Woman. *Microbiol Resour Announc* 8. doi:10.1128/MRA.00856-19.
- Clabaut, M., Suet, A., Racine, P.-J., Tahrioui, A., Verdon, J., Barreau, M., *et al.* (2021). Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain. *Sci Rep* 11, 7133. doi:10.1038/s41598-021-86628-x.
- Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J., and Salminen, S. (2007). Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. *J Food Sci* 72, M89-93. doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00294.x.
- Collins, J. M., and Grogan, W. M. (1989). Comparison between flow cytometry and fluorometry for the kinetic measurement of membrane fluidity parameters. *Cytometry* 10, 44–49. doi:https://doi.org/10.1002/cyto.990100108.
- Condon, S. (1983). Aerobic Metabolism of Lactic Acid Bacteria. *Irish Journal of Food Science and Technology* 7, 15–25.
- Cooper, EvaV. (1946). GAS-GANGRENE FOLLOWING INJECTION OF ADRENALINE. *The Lancet* 247, 459–461. doi:10.1016/S0140-6736(46)91431-6.
- Couto, J. A., Rozès, N., and Hogg, T. (1996). Ethanol-induced changes in the fatty acid composition of *Lactobacillus hilgardii*, its effects on plasma membrane fluidity and relationship with ethanol tolerance. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 126–132. doi:10.1111/j.1365-2672.1996.tb04489.x.
- Dahn, A., Saunders, S., Hammond, J.-A., Carter, D., Kirjavainen, P., Anukam, K., *et al.* (2008). Effect of bacterial vaginosis, *Lactobacillus* and Premarin estrogen replacement therapy on vaginal gene expression changes. *Microbes and Infection* 10, 620–627. doi:10.1016/j.micinf.2008.02.007.
- De Gregorio, P. R., Parolin, C., Abruzzo, A., Luppi, B., Protti, M., Mercolini, L., *et al.* (2020). Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with *Candida* adhesion. *Microbial Cell Factories* 19, 133. doi:10.1186/s12934-020-01390-5.
- Deepika, G., and Charalampopoulos, D. (2010). “Chapter 4 - Surface and Adhesion Properties of Lactobacilli,” in *Advances in Applied Microbiology* Advances in Applied Microbiology. (Academic Press), 127–152. doi:10.1016/S0065-2164(10)70004-6.

- Deepika, G., Green, R. J., Frazier, R. A., and Charalampopoulos, D. (2009). Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *J Appl Microbiol* 107, 1230–1240. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04306.x.
- Dempwolff, F., Möller, H. M., and Graumann, P. L. (2012). Synthetic motility and cell shape defects associated with deletions of flotillin/reggie paralogs in *Bacillus subtilis* and interplay of these proteins with NfeD proteins. *J Bacteriol* 194, 4652–4661. doi:10.1128/JB.00910-12.
- Denich, T. J., Beaudette, L. A., Lee, H., and Trevors, J. T. (2003). Effect of selected environmental and physico-chemical factors on bacterial cytoplasmic membranes. *Journal of Microbiological Methods* 52, 149–182. doi:10.1016/S0167-7012(02)00155-0.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., and Hébraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiol Lett* 256, 1–15. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x.
- Devillard, E., Burton, J. P., Hammond, J.-A., Lam, D., and Reid, G. (2004). Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 117, 76–81. doi:10.1016/j.ejogrb.2004.02.001.
- Doerflinger, S. Y., Throop, A. L., and Herbst-Kralovetz, M. M. (2014). Bacteria in the Vaginal Microbiome Alter the Innate Immune Response and Barrier Properties of the Human Vaginal Epithelia in a Species-Specific Manner. *The Journal of Infectious Diseases* 209, 1989–1999. doi:10.1093/infdis/jiu004.
- Donders, G. G. G., Bellen, G., Grinceviciene, S., Ruban, K., and Vieira-Baptista, P. (2017). Aerobic vaginitis: no longer a stranger. *Research in Microbiology* 168, 845–858. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.004.
- Donders, G. G. G., Gonzaga, A., Marconi, C., Donders, F., Michiels, T., Eggermont, N., *et al.* (2016). Increased vaginal pH in Ugandan women: what does it indicate? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 35, 1297–1303. doi:10.1007/s10096-016-2664-2.
- Donders, G. G., Van Bulck, B., Caudron, J., Londers, L., Vereecken, A., and Spitz, B. (2000). Relationship of bacterial vaginosis and mycoplasmas to the risk of spontaneous abortion. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183, 431–437. doi:10.1067/mob.2000.105738.
- Donia, M. S., Cimermancic, P., Schulze, C. J., Wieland Brown, L. C., Martin, J., Mitreva, M., *et al.* (2014). A Systematic Analysis of Biosynthetic Gene Clusters in the Human Microbiome Reveals a Common Family of Antibiotics. *Cell* 158, 1402–1414. doi:10.1016/j.cell.2014.08.032.
- Donlan, R. M., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193. doi:10.1128/cmr.15.2.167-193.2002.
- Donnarumma, G., Molinaro, A., Cimini, D., De Castro, C., Valli, V., De Gregorio, V., *et al.* (2014). *Lactobacillus crispatus* L1: high cell density cultivation and exopolysaccharide structure characterization to highlight potentially beneficial effects against vaginal pathogens. *BMC microbiology* 14, 137.
- Donovan, C., and Bramkamp, M. (2009). Characterization and subcellular localization of a bacterial flotillin homologue. *Microbiology* 155, 1786–1799. doi:10.1099/mic.0.025312-0.

- dos Santos, A. S., de Albuquerque, T. M. R., de Brito Alves, J. L., and de Souza, E. L. (2019). Effects of Quercetin and Resveratrol on in vitro Properties Related to the Functionality of Potentially Probiotic Lactobacillus Strains. *Front. Microbiol.* 10. doi:10.3389/fmicb.2019.02229.
- Drelich, J. (2015). Guidelines to measurements of reproducible contact angles using a sessile-drop technique. *Surface Innovations*. doi:10.1680/si.13.00010.
- Duwat, P., Cochou, A., Ehrlich, S. D., and Gruss, A. (1997). Characterization of Lactococcus lactis UV-sensitive mutants obtained by ISS1 transposition. *J Bacteriol* 179, 4473–4479. doi:10.1128/jb.179.14.4473-4479.1997.
- Edelman, S. M., Lehti, T. A., Kainulainen, V., Antikainen, J., Kylväjä, R., Baumann, M., et al. (2012). Identification of a high-molecular-mass Lactobacillus epithelium adhesin (LEA) of Lactobacillus crispatus ST1 that binds to stratified squamous epithelium. *Microbiology*, 158, 1713–1722. doi:10.1099/mic.0.057216-0.
- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., and Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *J Appl Microbiol* 92, 966–975. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01608.x.
- Endo, A., and Dicks, L. M. T. (2014). “Physiology of the LAB,” in *Lactic Acid Bacteria*, eds. W. H. Holzapfel and B. J. B. Wood (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd), 13–30. doi:10.1002/9781118655252.ch2.
- Endo, Y., Shibazaki, M., Nakamura, M., and Takada, H. (1997). Contrasting Effects of Lipopolysaccharides (Endotoxins) from Oral Black-Pigmented Bacteria and Enterobacteriaceae on Platelets, a Major Source of Serotonin, and on Histamine-Forming Enzyme in Mice. *The Journal of Infectious Diseases* 175, 1404–1412. doi:10.1086/516473.
- Eschenbach, D. A., Thwin, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., Agnew, K., et al. (2000). Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clinical Infectious Diseases* 30, 901–907. doi:10.1086/313818.
- Evans, D. G., Miles, A. A., and Niven, J. S. F. (1948). The enhancement of bacterial infections by adrenaline. *Br J Exp Pathol* 29, 20–39.
- Fagan, R. P., and Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol* 12, 211–222. doi:10.1038/nrmicro3213.
- Famularo, G., Pieluigi, M., Coccia, R., Mastroiacovo, P., and Simone, C. D. (2001). Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. *Medical Hypotheses* 56, 421–430. doi:10.1054/mehy.2000.1195.
- Farage, M. A., and Maibach, H. I. (2011). Morphology and Physiological Changes of Genital Skin and Mucosa. *Topical Applications and the Mucosa* 40, 9–19. doi:10.1159/000321042.
- Farage, M., and Maibach, H. (2006). Lifetime changes in the vulva and vagina. *Arch Gynecol Obstet* 273, 195–202. doi:10.1007/s00404-005-0079-x.
- Ferreira, S. S., Passos, C. P., Madureira, P., Vilanova, M., and Coimbra, M. A. (2015). Structure–function relationships of immunostimulatory polysaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers* 132, 378–396. doi:10.1016/j.carbpol.2015.05.079.

- Fichorova, R. N., Onderdonk, A. B., Yamamoto, H., Delaney, M. L., DuBois, A. M., Allred, E., *et al.* (2011). Maternal Microbe-Specific Modulation of Inflammatory Response in Extremely Low-Gestational-Age Newborns. *mBio* 2, e00280-10. doi:10.1128/mBio.00280-10.
- Fiechter, A. (1992). Biosurfactants: moving towards industrial application. *Trends in Biotechnology* 10, 208–217. doi:10.1016/0167-7799(92)90215-H.
- Fléchar, M., Duchesne, R., Tahrioui, A., Bouffartigues, E., Depayras, S., Hardouin, J., *et al.* (2018). The absence of SigX results in impaired carbon metabolism and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 8, 17212. doi:10.1038/s41598-018-35503-3.
- Foschi, C., Salvo, M., Cevenini, R., Parolin, C., Vitali, B., and Marangoni, A. (2017). Vaginal Lactobacilli Reduce *Neisseria gonorrhoeae* Viability through Multiple Strategies: An in Vitro Study. *Front Cell Infect Microbiol* 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00502.
- France, M. T., Mendes-Soares, H., and Forney, L. J. (2016). Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 7063–7073. doi:10.1128/AEM.02385-16.
- Fredricks, D. N., and Marrazzo, J. M. (2005). Molecular methodology in determining vaginal flora in health and disease: Its time has come. *Curr Infect Dis Rep* 7, 463–470. doi:10.1007/s11908-005-0049-2.
- Fteita, D., Könönen, E., Söderling, E., and Gürsoy, U. K. (2014). Effect of estradiol on planktonic growth, coaggregation, and biofilm formation of the *Prevotella intermedia* group bacteria. *Anaerobe* 27, 7–13. doi:10.1016/j.anaerobe.2014.02.003.
- Gajer, P., Brotman, R. M., Bai, G., Sakamoto, J., Schütte, U. M. E., Zhong, X., *et al.* (2012). Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. *Science Translational Medicine* 4, 132ra52-132ra52. doi:10.1126/scitranslmed.3003605.
- Galhardo, C. L., Soares, J. M., Simões, R. S., Haidar, M. A., Rodrigues de Lima, G., and Baracat, E. C. (2006). Estrogen effects on the vaginal pH, flora and cytology in late postmenopause after a long period without hormone therapy. *Clin Exp Obstet Gynecol* 33, 85–89.
- Gardiner, G. E., Heinemann, C., Bruce, A. W., Beuerman, D., and Reid, G. (2002). Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but Not *L. rhamnosus* GG in the Human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *CVI* 9, 92–96. doi:10.1128/CDLI.9.1.92-96.2002.
- Gardner, J. K., Swaims-Kohlmeier, A., and Herbst-Kralovetz, M. M. (2019). IL-36 γ Is a Key Regulator of Neutrophil Infiltration in the Vaginal Microenvironment and Limits Neuroinvasion in Genital HSV-2 Infection. *J Immunol* 203, 2655–2664. doi:10.4049/jimmunol.1900280.
- Geshnizgani, A. M., and Onderdonk, A. B. (1992). Defined medium simulating genital tract secretions for growth of vaginal microflora. *J. Clin. Microbiol.* 30, 1323–1326.
- Ghartey, J. P., Smith, B. C., Chen, Z., Buckley, N., Lo, Y., Ratner, A. J., *et al.* (2014). *Lactobacillus crispatus* Dominant Vaginal Microbiome Is Associated with Inhibitory Activity of Female Genital Tract Secretions against *Escherichia coli*. *PLOS ONE* 9, e96659. doi:10.1371/journal.pone.0096659.

- Ginkel, P. D., Soper, D. E., Bump, R. C., and Dalton, H. P. (1993). Vaginal Flora in Postmenopausal Women: The Effect of Estrogen Replacement. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 1, 94–97. doi:<https://doi.org/10.1155/S1064744993000225>.
- Goh, Y. J., and Klaenhammer, T. R. (2010). Functional Roles of Aggregation-Promoting-Like Factor in Stress Tolerance and Adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5005–5012. doi:10.1128/AEM.00030-10.
- Goh, Y. J., and Klaenhammer, T. R. (2013). A functional glycogen biosynthesis pathway in *Lactobacillus acidophilus*: expression and analysis of the *glg* operon. *Mol Microbiol* 89, 1187–1200. doi:10.1111/mmi.12338.
- Goh, Y. J., and Klaenhammer, T. R. (2014). Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microbial Cell Factories* 13, 94. doi:10.1186/s12934-014-0094-3.
- Gold, J. M., and Shrimanker, I. (2020). “Physiology, Vaginal,” in *StatPearls* (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing). Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545147/> [Accessed November 17, 2020].
- Gomaa, E. Z. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The Journal of General and Applied Microbiology* 59, 425–436. doi:10.2323/jgam.59.425.
- Gong, Z., Luna, Y., Yu, P., and Fan, H. (2014). Lactobacilli Inactivate *Chlamydia trachomatis* through Lactic Acid but Not H₂O₂. *PLOS ONE* 9, e107758. doi:10.1371/journal.pone.0107758.
- Gosmann, C., Anahtar, M. N., Handley, S. A., Farcasanu, M., Abu-Ali, G., Bowman, B. A., *et al.* (2017). *Lactobacillus*-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity* 46, 29–37. doi:10.1016/j.immuni.2016.12.013.
- Gustafsson, R. J., Ahrné, S., Jeppsson, B., Benoni, C., Olsson, C., Stjernquist, M., *et al.* (2011). The *Lactobacillus* flora in vagina and rectum of fertile and postmenopausal healthy Swedish women. *BMC Women’s Health* 11, 17. doi:10.1186/1472-6874-11-17.
- Hajfarajollah, H., Eslami, P., Mokhtarani, B., and Noghabi, K. A. (2018). Biosurfactants from probiotic bacteria: A review. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 65, 768–783. doi:<https://doi.org/10.1002/bab.1686>.
- Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases* 1, 156–164. doi:10.1016/S1473-3099(01)00092-5.
- Hardy, L., Cerca, N., Jaspers, V., Vaneechoutte, M., and Crucitti, T. (2017). Bacterial biofilms in the vagina. *Res. Microbiol.* 168, 865–874. doi:10.1016/j.resmic.2017.02.001.
- Heinemann, C., and Reid, G. (2011). Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Canadian Journal of Microbiology*. doi:10.1139/w05-070.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H. L., Pridmore, R. D., Gysler, C., Kleerebezem, M., *et al.* (2014). H₂O₂ Production in Species of the *Lactobacillus acidophilus* Group: a Central Role for a

Novel NADH-Dependent Flavin Reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 2229–2239. doi:10.1128/AEM.04272-13.

Hickey, R. J., Zhou, X., Settles, M. L., Erb, J., Malone, K., Hansmann, M. A., *et al.* (2015). Vaginal Microbiota of Adolescent Girls Prior to the Onset of Menarche Resemble Those of Reproductive-Age Women. *mBio* 6, e00097-15. doi:10.1128/mBio.00097-15.

Hinderfeld, A. S., and Simoes-Barbosa, A. (2020). Vaginal dysbiotic bacteria act as pathobionts of the protozoal pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Microbial Pathogenesis* 138, 103820. doi:10.1016/j.micpath.2019.103820.

HOMMEL, R. K. (1993). Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules. *Marcel Dekker*, 3–63.

Hosoda, K., Shimomura, H., Hayashi, S., Yokota, K., and Hirai, Y. (2011). Steroid hormones as bactericidal agents to *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol Lett* 318, 68–75. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02239.x.

Huang, B., Fettweis, J. M., Brooks, J. P., Jefferson, K. K., and Buck, G. A. (2014). The Changing Landscape of the Vaginal Microbiome. *Clinics in Laboratory Medicine* 34, 747–761. doi:10.1016/j.cll.2014.08.006.

Huang, Z., and London, E. (2016). Cholesterol lipids and cholesterol-containing lipid rafts in bacteria. *Chem Phys Lipids* 199, 11–16. doi:10.1016/j.chemphyslip.2016.03.002.

Huberts, D. H. E. W., and van der Klei, I. J. (2010). Moonlighting proteins: An intriguing mode of multitasking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1803, 520–525. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.01.022.

Hynönen, U., and Palva, A. (2013). Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 97, 5225–5243. doi:10.1007/s00253-013-4962-2.

Imran, M. Y. M., Reehana, N., Jayaraj, K. A., Ahamed, A. A. P., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., *et al.* (2016). Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules* 93, 731–745. doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007.

Jakobsson, T., and Forsum, U. (2008). Changes in the predominant human *Lactobacillus* flora during in vitro fertilisation. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 7, 14. doi:10.1186/1476-0711-7-14.

Jang, S. J., Lee, K., Kwon, B., You, H. J., and Ko, G. (2019). Vaginal lactobacilli inhibit growth and hyphae formation of *Candida albicans*. *Sci Rep* 9. doi:10.1038/s41598-019-44579-4.

Jiang, X., Yan, X., Gu, S., Yang, Y., Zhao, L., He, X., *et al.* (2019). Biosurfactants of *Lactobacillus helveticus* for biodiversity inhibit the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and cell invasion. *Future Microbiology* 14, 1133–1146. doi:10.2217/fmb-2018-0354.

Jin, L., Tao, L., Pavlova, S. I., So, J.-S., Kiwanuka, N., Namukwaya, Z., *et al.* (2007). Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. *J Appl Microbiol* 102, 1107–1115. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03147.x.

Joag, V., Obila, O., Gajer, P., Scott, M. C., Dizzell, S., Humphrys, M., *et al.* (2019). Impact of Standard Bacterial Vaginosis Treatment on the Genital Microbiota, Immune Milieu, and Ex Vivo

Human Immunodeficiency Virus Susceptibility. *Clin Infect Dis* 68, 1675–1683. doi:10.1093/cid/ciy762.

Jucker, B. A., Harms, H., and Zehnder, A. J. (1996). Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* 178, 5472–5479. doi:10.1128/jb.178.18.5472-5479.1996.

Jung, S., Park, O.-J., Kim, A. R., Ahn, K. B., Lee, D., Kum, K.-Y., *et al.* (2019). Lipoteichoic acids of lactobacilli inhibit *Enterococcus faecalis* biofilm formation and disrupt the preformed biofilm. *J Microbiol.* 57, 310–315. doi:10.1007/s12275-019-8538-4.

Kainulainen, V., Loimaranta, V., Pekkala, A., Edelman, S., Antikainen, J., Kylväjä, R., *et al.* (2012). Glutamine Synthetase and Glucose-6-Phosphate Isomerase Are Adhesive Moonlighting Proteins of *Lactobacillus crispatus* Released by Epithelial Cathelicidin LL-37. *J Bacteriol* 194, 2509–2519. doi:10.1128/JB.06704-11.

Källberg, M., Wang, H., Wang, S., Peng, J., Wang, Z., Lu, H., *et al.* (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc* 7, 1511–1522. doi:10.1038/nprot.2012.085.

Kalyoussef, S., Nieves, E., Dinerman, E., Carpenter, C., Shankar, V., Oh, J., *et al.* (2012). Lactobacillus Proteins Are Associated with the Bactericidal Activity against *E. coli* of Female Genital Tract Secretions. *PLOS ONE* 7, e49506. doi:10.1371/journal.pone.0049506.

Kashket, E. R. (1987). Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance*. *FEMS Microbiology Reviews* 3, 233–244. doi:10.1111/j.1574-6968.1987.tb02463.x.

Kaur, B., Balgir, P. P., Mittu, B., Kumar, B., and Garg, N. (2013). Biomedical Applications of Fermenticin HV6b Isolated from *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC10770. *BioMed Research International* 2013, e168438. doi:https://doi.org/10.1155/2013/168438.

Kenyon, C. R., and Osbak, K. (2014). Recent progress in understanding the epidemiology of bacterial vaginosis. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* 26, 448–454. doi:10.1097/GCO.000000000000112.

Kim, J. W., and Rajagopal, S. N. (2000). Isolation and characterization of beta-galactosidase from *Lactobacillus crispatus*. *Folia Microbiol (Praha)* 45, 29–34. doi:10.1007/BF02817446.

Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 598–625. doi:https://doi.org/10.1189/jlb.1204697.

Klebanoff, S. J., Hillier, S. L., Eschenbach, D. A., and Waltersdorff, A. M. (1991). Control of the Microbial Flora of the Vagina by H2O2-Generating Lactobacilli. *J Infect Dis* 164, 94–100. doi:10.1093/infdis/164.1.94.

Kmet, V., and Lucchini, F. (1997). Aggregation-promoting factor in human vaginal *Lactobacillus* strains. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19, 111–114. doi:10.1111/j.1574-695X.1997.tb01079.x.

Kramer, N. E., Hijum, S. A. F. T. van, Knol, J., Kok, J., and Kuipers, O. P. (2006). Transcriptome Analysis Reveals Mechanisms by Which *Lactococcus lactis* Acquires Nisin Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 1753–1761. doi:10.1128/AAC.50.5.1753-1761.2006.

- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., and Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng* 106, 381–386. doi:10.1263/jbb.106.381.
- Lacroix, G., Gouyer, V., Gottrand, F., and Desseyn, J.-L. (2020). The Cervicovaginal Mucus Barrier. *IJMS* 21, 8266. doi:10.3390/ijms21218266.
- Lai, S. K., Hida, K., Shukair, S., Wang, Y.-Y., Figueiredo, A., Cone, R., *et al.* (2009). Human Immunodeficiency Virus Type 1 Is Trapped by Acidic but Not by Neutralized Human Cervicovaginal Mucus. *Journal of Virology* 83, 11196–11200. doi:10.1128/JVI.01899-08.
- Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P., and Kitazawa, H. (2016). Immunoregulatory Effects Triggered by Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides: New Insights into Molecular Interactions with Host Cells. *Microorganisms* 4, 27. doi:10.3390/microorganisms4030027.
- Lamont, R. F., Sobel, J. D., Akins, R. A., Hassan, S. S., Chaiworapongsa, T., Kusanovic, J. P., *et al.* (2011). The vaginal microbiome: new information about genital tract flora using molecular based techniques. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 118, 533–549. doi:https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2010.02840.x.
- Landry, R. M., An, D., Hupp, J. T., Singh, P. K., and Parsek, M. R. (2006). Mucin–*Pseudomonas aeruginosa* interactions promote biofilm formation and antibiotic resistance. *Molecular Microbiology* 59, 142–151. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04941.x.
- Langhorst, M. F., Reuter, A., and Stuermer, C. A. O. (2005). Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2228–2240. doi:10.1007/s00018-005-5166-4.
- Łaniewski, P., Cui, H., Roe, D. J., Barnes, D., Goulder, A., Monk, B. J., *et al.* (2019). Features of the cervicovaginal microenvironment drive cancer biomarker signatures in patients across cervical carcinogenesis. *Sci Rep* 9, 7333. doi:10.1038/s41598-019-43849-5.
- LaRocca, T. J., Pathak, P., Chiantia, S., Toledo, A., Silviu, J. R., Benach, J. L., *et al.* (2013). Proving lipid rafts exist: membrane domains in the prokaryote *Borrelia burgdorferi* have the same properties as eukaryotic lipid rafts. *PLoS Pathog* 9, e1003353. doi:10.1371/journal.ppat.1003353.
- Larsen, J. M. (2017). The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology* 151, 363–374. doi:https://doi.org/10.1111/imm.12760.
- Lebeer, S., Claes, I., Tytgat, H. L. P., Verhoeven, T. L. A., Marien, E., Ossowski, I. von, *et al.* (2012). Functional Analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG Pili in Relation to Adhesion and Immunomodulatory Interactions with Intestinal Epithelial Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 185–193. doi:10.1128/AEM.06192-11.
- Lebeer, S., Keersmaecker, S. C. J. D., Verhoeven, T. L. A., Fadda, A. A., Marchal, K., and Vanderleyden, J. (2007a). Functional Analysis of *luxS* in the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* GG Reveals a Central Metabolic Role Important for Growth and Biofilm Formation. *J. Bacteriol.* 189, 860–871. doi:10.1128/JB.01394-06.
- Lebeer, S., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2010). Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nature Reviews Microbiology* 8, 171–184. doi:10.1038/nrmicro2297.

- Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Perea Vélez, M., Vanderleyden, J., and De Keersmaecker, S. C. J. (2007b). Impact of environmental and genetic factors on biofilm formation by the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 73, 6768–6775. doi:10.1128/AEM.01393-07.
- Leccese Terraf, M. C., Juárez Tomás, M. S., Rault, L., Le Loir, Y., Even, S., and Nader-Macías, M. E. F. (2016). Biofilms of vaginal *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1332: kinetics of formation and matrix characterization. *Archives of Microbiology* 198, 689–700. doi:10.1007/s00203-016-1225-5.
- Lee, Y. H., Kingston, A. W., and Helmann, J. D. (2012). Glutamate Dehydrogenase Affects Resistance to Cell Wall Antibiotics in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 194, 993–1001. doi:10.1128/JB.06547-11.
- Lennard, K., Dabee, S., Barnabas, S. L., Havyarimana, E., Blakney, A., Jaumdally, S. Z., et al. (2017). Microbial Composition Predicts Genital Tract Inflammation and Persistent Bacterial Vaginosis in South African Adolescent Females. *Infect Immun* 86, e00410-17. doi:10.1128/IAI.00410-17.
- Lepargneur, J. P., and Rousseau, V. (2002). [Protective role of the Doderlein flora]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 31, 485–494.
- Lepargneur, J.-P., and Abbal, M. (2012). Immunité innée et adaptative du tractus génital féminin. *Journal de Gynécologie Obstétrique et Biologie de la Reproduction* 41, 612–622. doi:10.1016/j.jgyn.2012.07.006.
- Lesouhaitier, O., Clamens, T., Rosay, T., Desriac, F., Louis, M., Rodrigues, S., et al. (2019). Host Peptidic Hormones Affecting Bacterial Biofilm Formation and Virulence. *J Innate Immun* 11, 227–241. doi:10.1159/000493926.
- Lesouhaitier, O., Veron, W., Chapalain, A., Madi, A., Blier, A.-S., Dagorn, A., et al. (2009). Gram-Negative Bacterial Sensors for Eukaryotic Signal Molecules. *Sensors (Basel)* 9, 6967–6990. doi:10.3390/s90906967.
- Lin, T., Chen, C., Chen, B., Shaw, J., and Chen, Y. (2019). Optimal economic productivity of exopolysaccharides from lactic acid bacteria with production possibility curves. *Food Science & Nutrition* 7, 2336–2344. doi:https://doi.org/10.1002/fsn3.1079.
- Ling, Z., Kong, J., Liu, F., Zhu, H., Chen, X., Wang, Y., et al. (2010). Molecular analysis of the diversity of vaginal microbiota associated with bacterial vaginosis. *BMC Genomics* 11, 488. doi:10.1186/1471-2164-11-488.
- Liu, Z., Zhang, Z., Qiu, L., Zhang, F., Xu, X., Wei, H., et al. (2017). Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science* 100, 6895–6905. doi:10.3168/jds.2016-11944.
- Lopez, D., and Koch, G. (2017). Exploring functional membrane microdomains in bacteria: an overview. *Curr Opin Microbiol* 36, 76–84. doi:10.1016/j.mib.2017.02.001.
- López, D., and Kolter, R. (2010). Functional microdomains in bacterial membranes. *Genes Dev.* 24, 1893–1902. doi:10.1101/gad.1945010.

- Lyte, M. (2004). Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. *Trends Microbiol* 12, 14–20. doi:10.1016/j.tim.2003.11.004.
- Lyte, M., and Ernst, S. (1992). Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. *Life Sciences* 50, 203–212. doi:10.1016/0024-3205(92)90273-R.
- Ma, B., Forney, L. J., and Ravel, J. (2012). Vaginal Microbiome: Rethinking Health and Disease. *Annual Review of Microbiology* 66, 371–389. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150157.
- Machado, A., and Cerca, N. (2015). Influence of Biofilm Formation by *Gardnerella vaginalis* and Other Anaerobes on Bacterial Vaginosis. *J Infect Dis* 212, 1856–1861. doi:10.1093/infdis/jiv338.
- Mack, D. R. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 52, 827–833. doi:10.1136/gut.52.6.827.
- MacKenzie, D. A., Jeffers, F., Parker, M. L., Vibert-Vallet, A., Bongaerts, R. J., Roos, S., *et al.* (2010). Strain-specific diversity of mucus-binding proteins in the adhesion and aggregation properties of *Lactobacillus reuteri*. *Microbiology (Reading)* 156, 3368–3378. doi:10.1099/mic.0.043265-0.
- Macklaim, J. M., Fernandes, A. D., Di Bella, J. M., Hammond, J.-A., Reid, G., and Gloor, G. B. (2013). Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 1, 12. doi:10.1186/2049-2618-1-12.
- Majchrzak-Gorecka, M., Majewski, P., Grygier, B., Murzyn, K., and Cichy, J. (2016). Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 28, 79–93. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.12.001.
- Marcotte, H., Ferrari, S., Cesena, C., Hammarström, L., Morelli, L., Pozzi, G., *et al.* (2004). The aggregation-promoting factor of *Lactobacillus crispatus* M247 and its genetic locus. *Journal of Applied Microbiology* 97, 749–756. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02364.x.
- Marko, D. C., Saffert, R. T., Cunningham, S. A., Hyman, J., Walsh, J., Arbefeville, S., *et al.* (2012). Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cultures from Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 50, 2034–2039. doi:10.1128/JCM.00330-12.
- Martín, R., and Soberón, N. (2008). Evaluation of newly isolated human vaginal lactobacilli and selection of probiotic candidates. *International Microbiology*, 261–266. doi:10.2436/20.1501.01.70.
- Masson, L., Barnabas, S., Deese, J., Lennard, K., Dabee, S., Gamielien, H., *et al.* (2019). Inflammatory cytokine biomarkers of asymptomatic sexually transmitted infections and vaginal dysbiosis: a multicentre validation study. *Sex Transm Infect* 95, 5–12. doi:10.1136/sextrans-2017-053506.
- McGregor, J. A., French, J. I., Jones, W., Milligan, K., McKinney, P. J., Patterson, E., *et al.* (1994). Bacterial vaginosis is associated with prematurity and vaginal fluid mucinase and sialidase: Results of a controlled trial of topical clindamycin cream. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 170, 1048–1060. doi:10.1016/S0002-9378(94)70098-2.

- Meade, K. G., and O'Farrelly, C. (2019). β -Defensins: Farming the Microbiome for Homeostasis and Health. *Front. Immunol.* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.03072.
- Mendes-Soares, H., Suzuki, H., Hickey, R. J., and Forney, L. J. (2014). Comparative Functional Genomics of *Lactobacillus* spp. Reveals Possible Mechanisms for Specialization of Vaginal *Lactobacilli* to Their Environment. *J Bacteriol* 196, 1458–1470. doi:10.1128/JB.01439-13.
- Mending, W., Palmeira-de-Oliveira, A., Biber, S., and Prasauskas, V. (2019). An update on the role of *Atopobium vaginae* in bacterial vaginosis: what to consider when choosing a treatment? A mini review. *Arch Gynecol Obstet* 300, 1–6. doi:10.1007/s00404-019-05142-8.
- Mestecky, J., and Russell, M. W. (2000). Induction of mucosal immune responses in the human genital tract. *FEMS Immunol Med Microbiol* 27, 351–355. doi:10.1111/j.1574-695X.2000.tb01449.x.
- Meylheuc, T., van Oss, C. J., and Bellon-Fontaine, M. N. (2001). Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28. *J Appl Microbiol* 91, 822–832. doi:10.1046/j.1365-2672.2001.01455.x.
- Mielich-Süss, B., Schneider, J., and Lopez, D. (2013). Overproduction of Flotillin Influences Cell Differentiation and Shape in *Bacillus subtilis*. *mBio* 4. doi:10.1128/mBio.00719-13.
- Mikheenko, A., Prjibelski, A., Saveliev, V., Antipov, D., and Gurevich, A. (2018). Versatile genome assembly evaluation with QUAST-LG. *Bioinformatics* 34, i142–i150. doi:10.1093/bioinformatics/bty266.
- Millsap, K., Reid, G., van der Mei, H. C., and Busscher, H. J. (1994). Displacement of *Enterococcus faecalis* from hydrophobic and hydrophilic substrata by *Lactobacillus* and *Streptococcus* spp. as studied in a parallel plate flow chamber. *Appl Environ Microbiol* 60, 1867–1874. doi:10.1128/AEM.60.6.1867-1874.1994.
- Millsap, K. W., van der Mei, H. C., Reid, G., and Busscher, H. J. (1996). Physico-chemical and adhesive cell surface properties of *Lactobacillus* strains grown in old formula and new, standardized MRS medium. *Journal of Microbiological Methods* 27, 239–242. doi:10.1016/S0167-7012(96)00937-2.
- Mirmonsef, P., Hotton, A. L., Gilbert, D., Burgad, D., Landay, A., Weber, K. M., et al. (2014). Free Glycogen in Vaginal Fluids Is Associated with *Lactobacillus* Colonization and Low Vaginal pH. *PLoS ONE* 9, e102467. doi:10.1371/journal.pone.0102467.
- Mirmonsef, P., Hotton, A. L., Gilbert, D., Gioia, C. J., Maric, D., Hope, T. J., et al. (2016). Glycogen Levels in Undiluted Genital Fluid and Their Relationship to Vaginal pH, Estrogen, and Progesterone. *PLoS ONE* 11, e0153553. doi:10.1371/journal.pone.0153553.
- Mirmonsef, P., Modur, S., Burgad, D., Gilbert, D., Golub, E. T., French, A. L., et al. (2015). An exploratory comparison of vaginal glycogen and *Lactobacillus* levels in pre- and post-menopausal women. *Menopause* 22, 702–709. doi:10.1097/GME.0000000000000397.
- Mirmonsef, P., Zariffard, M. R., Gilbert, D., Makinde, H., Landay, A. L., and Spear, G. T. (2012). Short-Chain Fatty Acids Induce Pro-Inflammatory Cytokine Production Alone and in Combination with Toll-Like Receptor Ligands. *American Journal of Reproductive Immunology* 67, 391–400. doi:https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2011.01089.x.

- Mokoena, M. P. (2017). Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. *Molecules* 22, 1255. doi:10.3390/molecules22081255.
- Morais, I. M. C., Cordeiro, A. L., Teixeira, G. S., Domingues, V. S., Nardi, R. M. D., Monteiro, A. S., *et al.* (2017). Biological and physicochemical properties of biosurfactants produced by *Lactobacillus jensenii* P6A and *Lactobacillus gasseri* P65. *Microb Cell Fact* 16, 155. doi:10.1186/s12934-017-0769-7.
- Morse, S. A., and Fitzgerald, T. J. (1974). Effect of progesterone on *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 10, 1370–1377. doi:10.1128/IAI.10.6.1370-1377.1974.
- Muhleisen, A. L., and Herbst-Kralovetz, M. M. (2016). Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas* 91, 42–50. doi:10.1016/j.maturitas.2016.05.015.
- Muzny, C. A., Łaniewski, P., Schwebke, J. R., and Herbst-Kralovetz, M. M. (2020). Host-Vaginal Microbiota Interactions in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. *Curr Opin Infect Dis* 33, 59–65. doi:10.1097/QCO.0000000000000620.
- Mykytczuk, N. C. S., Trevors, J. T., Leduc, L. G., and Ferroni, G. D. (2007). Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 95, 60–82. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2007.05.001.
- Nardini, P., Ñahui Palomino, R. A., Parolin, C., Laghi, L., Foschi, C., Cevenini, R., *et al.* (2016). *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. *Scientific Reports* 6. doi:10.1038/srep29024.
- Nasielli, K., Dudkiewicz, J., Nasiell, M., Hjerpe, A., and Silfverswärd, C. (1972). The occurrence of *Bacillus vaginalis* Döderlein and cytolysis in dysplasia, carcinoma in situ, and invasive carcinoma of the uterine cervix. *Acta Cytol* 16, 21–25.
- Nasioudis, D., Beghini, J., Bongiovanni, A. M., Giraldo, P. C., Linhares, I. M., and Witkin, S. S. (2015). α -Amylase in Vaginal Fluid: Association With Conditions Favorable to Dominance of *Lactobacillus*. *Reprod. Sci.* 22, 1393–1398. doi:10.1177/1933719115581000.
- Nazli, A., Chan, O., Dobson-Belaire, W. N., Ouellet, M., Tremblay, M. J., Gray-Owen, S. D., *et al.* (2010). Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation. *PLOS Pathogens* 6, e1000852. doi:10.1371/journal.ppat.1000852.
- Nelson, H. D. (2004). Commonly used types of postmenopausal estrogen for treatment of hot flashes: scientific review. *JAMA* 291, 1610–1620. doi:10.1001/jama.291.13.1610.
- Neuhaus, F. C., and Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: structures and functions of D-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 686–723. doi:10.1128/mmbr.67.4.686-723.2003.
- Nikolic, M., Jovcic, B., Kojic, M., and Topisirovic, L. (2010). Surface properties of *Lactobacillus* and *Leuconostoc* isolates from homemade cheeses showing auto-aggregation ability. *Eur Food Res Technol* 231, 925–931. doi:10.1007/s00217-010-1344-1.
- Niu, X.-X., Li, T., Zhang, X., Wang, S.-X., and Liu, Z.-H. (2017). *Lactobacillus crispatus* Modulates Vaginal Epithelial Cell Innate Response to *Candida albicans*. *Chin Med J (Engl)* 130, 273–279. doi:10.4103/0366-6999.198927.

- Nouaille, S., Commissaire, J., Gratadoux, J. J., Ravn, P., Bolotin, A., Gruss, A., *et al.* (2004). Influence of Lipoteichoic Acid d-Alanylation on Protein Secretion in *Lactococcus lactis* as Revealed by Random Mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1600–1607. doi:10.1128/AEM.70.3.1600-1607.2004.
- Nunn, K. L., Wang, Y.-Y., Harit, D., Humphrys, M. S., Ma, B., Cone, R., *et al.* (2015). Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with *Lactobacillus crispatus*-Dominant Microbiota. *mBio* 6. doi:10.1128/mBio.01084-15.
- Ocaña, V. S., Pesce de Ruiz Holgado, A. A., and Nader-Macías, M. E. (1999). Selection of Vaginal H₂O₂-Generating *Lactobacillus* Species for Probiotic Use. *Curr Microbiol* 38, 279–284. doi:10.1007/PL00006802.
- O’Hanlon, D. E., Moench, T. R., and Cone, R. A. (2011). In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infectious Diseases* 11, 200. doi:10.1186/1471-2334-11-200.
- O’Hanlon, D. E., Moench, T. R., and Cone, R. A. (2013). Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When *Lactobacilli* Dominate the Microbiota. *PLOS ONE* 8, e80074. doi:10.1371/journal.pone.0080074.
- O’Toole, G. A. (2011). Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp*. doi:10.3791/2437.
- Otzen, D. E. (2017). Biosurfactants and surfactants interacting with membranes and proteins: Same but different? *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 639–649. doi:10.1016/j.bbmem.2016.09.024.
- Owen, D. H., and Katz, D. F. (1999). A vaginal fluid simulant. *Contraception* 59, 91–95. doi:10.1016/S0010-7824(99)00010-4.
- Pabich, W. L., Fihn, S. D., Stamm, W. E., Scholes, D., Boyko, E. J., and Gupta, K. (2003). Prevalence and Determinants of Vaginal Flora Alterations in Postmenopausal Women. *The Journal of Infectious Diseases* 188, 1054–1058. doi:10.1086/378203.
- Papadimitriou, K., Alegría, Á., Bron, P. A., de Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M., *et al.* (2016). Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80, 837–890. doi:10.1128/MMBR.00076-15.
- Pascual, L. M., Daniele, M. B., Giordano, W., Pájaro, M. C., and Barberis, I. L. (2008). Purification and Partial Characterization of Novel Bacteriocin L23 Produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Curr Microbiol* 56, 397. doi:10.1007/s00284-007-9094-4.
- Patterson, J. L., Stull-Lane, A., Girerd, P. H., and Jefferson, K. K. (2010). Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes. *Microbiology (Reading)* 156, 392–399. doi:10.1099/mic.0.034280-0.
- Patton, D. L., Thwin, S. S., Meier, A., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., and Eschenbach, D. A. (2000). Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 183, 967–973. doi:10.1067/mob.2000.108857.

- Pelletier, C., Bouley, C., Cayuela, C., Bouttier, S., Bourlioux, P., and Bellon-Fontaine, M. N. (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Appl Environ Microbiol* 63, 1725–1731. doi:10.1128/AEM.63.5.1725-1731.1997.
- Piwat, S., Sophatha, B., and Teanpaisan, R. (2015). An assessment of adhesion, aggregation and surface charges of *Lactobacillus* strains derived from the human oral cavity. *Lett Appl Microbiol* 61, 98–105. doi:10.1111/lam.12434.
- Platz-Christensen, J.-J., Pålsson, C., and Larsson, P.-G. (1995). Long, Uniform *Lactobacilli* (Döderlein's Bacteria): A New Risk Factor for Postoperative Infection After First-Trimester Abortion. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology* 3, 102–109. doi:https://doi.org/10.1155/S106474499500041X.
- Prado-Acosta, M., Ruzal, S. M., Allievi, M. C., Palomino, M. M., and Rivas, C. S. (2010). Synergistic Effects of the *Lactobacillus acidophilus* Surface Layer and Nisin on Bacterial Growth. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 974–977. doi:10.1128/AEM.01427-09.
- Pretzer, G., Snel, J., Molenaar, D., Wiersma, A., Bron, P. A., Lambert, J., *et al.* (2005). Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 187, 6128–6136. doi:10.1128/JB.187.17.6128-6136.2005.
- Purohit, A., and Reed, M. J. (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* 67, 979–983. doi:10.1016/S0039-128X(02)00046-6.
- Pybus, V., and Onderdonk, A. B. (1997). Evidence for a commensal, symbiotic relationship between *Gardnerella vaginalis* and *Prevotella bivia* involving ammonia: potential significance for bacterial vaginosis. *J. Infect. Dis.* 175, 406–413. doi:10.1093/infdis/175.2.406.
- Pybus, V., and Onderdonk, A. B. (1998). A commensal symbiosis between *Prevotella bivia* and *Peptostreptococcus anaerobius* involves amino acids: potential significance to the pathogenesis of bacterial vaginosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 22, 317–327. doi:10.1111/j.1574-695X.1998.tb01221.x.
- Quayle, A. J. (2002). The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *Journal of Reproductive Immunology* 57, 61–79. doi:10.1016/S0165-0378(02)00019-0.
- Racine, P.-J., Janvier, X., Clabaut, M., Catovic, C., Souak, D., Boukerb, A. M., *et al.* (2020). Dialog between skin and its microbiota: Emergence of “Cutaneous Bacterial Endocrinology.” *Experimental Dermatology* 29, 790–800. doi:https://doi.org/10.1111/exd.14158.
- Rahbar Saadat, Y., Yari Khosroushahi, A., and Pourghassem Gargari, B. (2019). A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 217, 79–89. doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.025.
- Rampersaud, R., Randis, T. M., and Ratner, A. J. (2012). Microbiota of the upper and lower genital tract. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 17, 51–57. doi:10.1016/j.siny.2011.08.006.

- Ravel, J., Brotman, R. M., Gajer, P., Ma, B., Nandy, M., Fadrosh, D. W., *et al.* (2013). Daily temporal dynamics of vaginal microbiota before, during and after episodes of bacterial vaginosis. *Microbiome* 1, 29. doi:10.1186/2049-2618-1-29.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., *et al.* (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 4680–4687. doi:10.1073/pnas.1002611107.
- Raza, Z. A., Khalid, Z. M., Khan, M. S., Banat, I. M., Rehman, A., Naeem, A., *et al.* (2010). Surface properties and sub-surface aggregate assimilation of rhamnolipid surfactants in different aqueous systems. *Biotechnol Lett* 32, 811–816. doi:10.1007/s10529-010-0216-x.
- Reichman, O., Luwisch, H., Sela, H. Y., and Samueloff, A. (2017). Genital discomfort: yeast, trichomonas and bacterial vaginosis are only the tip of the iceberg. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 214, 200–201. doi:10.1016/j.ejogrb.2017.04.049.
- Reid, G., and Bocking, A. (2003). The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 189, 1202–1208. doi:10.1067/S0002-9378(03)00495-2.
- Reid, G., and Burton, J. (2002). Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 4, 319–324. doi:10.1016/s1286-4579(02)01544-7.
- Reid, G., Gan, B. S., She, Y.-M., Ens, W., Weinberger, S., and Howard, J. C. (2002). Rapid Identification of Probiotic Lactobacillus Biosurfactant Proteins by ProteinChip Tandem Mass Spectrometry Tryptic Peptide Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 977–980. doi:10.1128/AEM.68.2.977-980.2002.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V., and Morelli, L. (1992). High frequency of conjugation in Lactobacillus mediated by an aggregation-promoting factor. *Microbiology*, 138, 763–768. doi:10.1099/00221287-138-4-763.
- Rivera-Milla, E., Stuermer, C. A. O., and Málaga-Trillo, E. (2006). Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 343–357. doi:10.1007/s00018-005-5434-3.
- Rogosa, M., and Sharpe, M. E. (1960). Species Differentiation of Human Vaginal Lactobacilli. *Journal of General Microbiology* 23, 197–201. doi:10.1099/00221287-23-1-197.
- Romero, R., Hassan, S. S., Gajer, P., Tarca, A. L., Fadrosh, D. W., Nikita, L., *et al.* (2014). The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome* 2, 4. doi:10.1186/2049-2618-2-4.
- Round, J. L., and Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313–323. doi:10.1038/nri2515.
- Russo, J., and Russo, I. H. (2006). The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102, 89–96. doi:10.1016/j.jsbmb.2006.09.004.
- Salas-Jara, M. J., Ilabaca, A., Vega, M., and García, A. (2016). Biofilm Forming Lactobacillus: New Challenges for the Development of Probiotics. *Microorganisms* 4. doi:10.3390/microorganisms4030035.

- Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J., and Klaenhammer, T. R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology* 49, 207–216. doi:10.1016/j.copbio.2017.09.007.
- Santiago, G. L. dos S., Tency, I., Verstraelen, H., Verhelst, R., Trog, M., Temmerman, M., *et al.* (2012). 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* 7, e45281. doi:10.1371/journal.pone.0045281.
- Sára, M., and Sleytr, U. B. (2000). S-Layer proteins. *J Bacteriol* 182, 859–868. doi:10.1128/jb.182.4.859-868.2000.
- Satpute, S. K., Kulkarni, G. R., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Mone, N. S., Patil, R. H., *et al.* (2016). Biosurfactant/s from Lactobacilli species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology* 56, 1140–1158. doi:10.1002/jobm.201600143.
- Satpute, S. K., Mone, N. S., Das, P., Banat, I. M., and Banpurkar, A. G. (2019). Inhibition of pathogenic bacterial biofilms on PDMS based implants by *L. acidophilus* derived biosurfactant. *BMC Microbiology* 19, 39. doi:10.1186/s12866-019-1412-z.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology* 184, 1140–1154. doi:10.1128/jb.184.4.1140-1154.2002.
- Saunders, S., Bocking, A., Challis, J., and Reid, G. (2007). Effect of Lactobacillus challenge on Gardnerella vaginalis biofilms. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 55, 138–142. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.11.040.
- Schär-Zammaretti, P., Dillmann, M.-L., D'Amico, N., Affolter, M., and Ubbink, J. (2005). Influence of Fermentation Medium Composition on Physicochemical Surface Properties of Lactobacillus acidophilus. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8165–8173. doi:10.1128/AEM.71.12.8165-8173.2005.
- Schär-Zammaretti, P., and Ubbink, J. (2003). The Cell Wall of Lactic Acid Bacteria: Surface Constituents and Macromolecular Conformations. *Biophysical Journal* 85, 4076–4092. doi:10.1016/S0006-3495(03)74820-6.
- Schwebke, J. R., Muzny, C. A., and Josey, W. E. (2014). Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: a conceptual model. *J Infect Dis* 210, 338–343. doi:10.1093/infdis/jiu089.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
- Shen, J., Song, N., Williams, C. J., Brown, C. J., Yan, Z., Xu, C., *et al.* (2016). Effects of low dose estrogen therapy on the vaginal microbiomes of women with atrophic vaginitis. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep24380.
- Shi, L., Ardehali, R., Caldwell, K. D., and Valint, P. (2000). Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 17, 229–239. doi:10.1016/S0927-7765(99)00121-6.

- Shimomura, H., Hosoda, K., McGee, D. J., Hayashi, S., Yokota, K., and Hirai, Y. (2013). Detoxification of 7-dehydrocholesterol fatal to *Helicobacter pylori* is a novel role of cholesterol glucosylation. *J Bacteriol* 195, 359–367. doi:10.1128/JB.01495-12.
- Shivers, K.-Y., Amador, N., Abrams, L., Hunter, D., Jenab, S., and Quiñones-Jenab, V. (2015). Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity. *Cytokine* 72, 121–129. doi:10.1016/j.cyto.2015.01.007.
- Siddique, S. A. (2003). Vaginal Anatomy and Physiology. *Female Pelvic Medicine & Reconstructive Surgery* 9, 263–272. doi:10.1097/01.spv.0000094481.95144.3d.
- Sillanpää, J., Martínez, B., Antikainen, J., Toba, T., Kalkkinen, N., Tankka, S., *et al.* (2000). Characterization of the Collagen-Binding S-Layer Protein CbsA of *Lactobacillus crispatus*. *J Bacteriol* 182, 6440–6450.
- Silva, C., Rey, R., and Elena Nader-Macías, M. (2004). Effects of estrogen administration on the colonization capability of lactobacilli and *Escherichia coli* in the urinary tracts of mice. *Methods Mol Biol* 268, 387–399. doi:10.1385/1-59259-766-1:387.
- Simons, K., and Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572. doi:10.1038/42408.
- Sinensky, M. (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 522–525. doi:10.1073/pnas.71.2.522.
- Smith, R. P., Netter, F. H., Machado, C. A. G., and Netter, F. H. eds. (2011). *The Netter collection of medical illustrations*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Elsevier.
- Sobel and sobel, R. Metronidazole for the treatment of vaginal infections: Expert Opinion on Pharmacotherapy: Vol 16, No 7. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1517/14656566.2015.1035255> [Accessed September 15, 2020].
- Sobel, J. D. (2007). Vulvovaginal candidosis. *The Lancet* 369, 1961–1971. doi:10.1016/S0140-6736(07)60917-9.
- Song, J., Lang, F., Zhao, N., Guo, Y., and Zhang, H. (2018). Vaginal Lactobacilli Induce Differentiation of Monocytic Precursors Toward Langerhans-like Cells: in Vitro Evidence. *Front Immunol* 9. doi:10.3389/fimmu.2018.02437.
- Spear, G. T., French, A. L., Gilbert, D., Zariffard, M. R., Mirmonsef, P., Sullivan, T. H., *et al.* (2014). Human α -amylase Present in Lower-Genital-Tract Mucosal Fluid Processes Glycogen to Support Vaginal Colonization by *Lactobacillus*. *J Infect Dis* 210, 1019–1028. doi:10.1093/infdis/jiu231.
- Spear, G. T., McKenna, M., Landay, A. L., Makinde, H., Hamaker, B., French, A. L., *et al.* (2015). Effect of pH on Cleavage of Glycogen by Vaginal Enzymes. *PLOS ONE* 10, e0132646. doi:10.1371/journal.pone.0132646.
- Spurbeck, R. R., and Arvidson, C. G. (2011). Lactobacilli at the front line of defense against vaginally acquired infections. *Future Microbiology* 6, 567–582. doi:10.2217/fmb.11.36.

- Stewart-Tull, D. E. S. (1964). Evidence that vaginal lactobacilli do not ferment glycogen. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 88, 676–679. doi:10.1016/0002-9378(64)90898-1.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., and Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56, 187–209. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.160705.
- Strandwitz, P., Kim, K. H., Terekhova, D., Liu, J. K., Sharma, A., Levering, J., *et al.* (2019). GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. *Nat Microbiol* 4, 396–403. doi:10.1038/s41564-018-0307-3.
- Strus, M., Brzychczy-Włoch, M., Gosiewski, T., Kochan, P., and Heczko, P. B. (2006). The in vitro effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48, 56–63. doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00120.x.
- Sun, Z., Wang, X., Zhang, X., Wu, H., Zou, Y., Li, P., *et al.* (2018). Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *J Ind Microbiol Biotechnol* 45, 213–227. doi:10.1007/s10295-018-2008-6.
- Swidsinski, A., Verstraelen, H., Loening-Baucke, V., Swidsinski, S., Mendling, W., and Halwani, Z. (2013). Presence of a Polymicrobial Endometrial Biofilm in Patients with Bacterial Vaginosis. *PLOS ONE* 8, e53997. doi:10.1371/journal.pone.0053997.
- Tachedjian, G., Aldunate, M., Bradshaw, C. S., and Cone, R. A. (2017). The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. *Research in Microbiology* 168, 782–792. doi:10.1016/j.resmic.2017.04.001.
- Taha, T. E., Hoover, D. R., Dallabetta, G. A., Kumwenda, N. I., Mtimavalye, L. A. R., Yang, L.-P., *et al.* (1998). Bacterial vaginosis and disturbances of vaginal flora: association with increased acquisition of HIV. *AIDS* 12, 1699–1706.
- Tahara, T., and Kanatani, K. (1997). Isolation and partial characterization of crispacin A, a cell-associated bacteriocin produced by Lactobacillus crispatus JCM 2009. *FEMS Microbiol Lett* 147, 287–290. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10255.x.
- Tanenbaum, D. M., Wang, Y., Williams, S. P., and Sigler, P. B. (1998). Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *PNAS* 95, 5998–6003. doi:10.1073/pnas.95.11.5998.
- Tavernarakis, N., Driscoll, M., and Kyripides, N. C. (1999). The SPFH domain: implicated in regulating targeted protein turnover in stomatins and other membrane-associated proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 24, 425–427. doi:10.1016/S0968-0004(99)01467-X.
- Teixeira, G. S., Soares-Brandão, K. L. K., Branco, K. M. G. R., Sampaio, J. L. M., Nardi, R. M. D., Mendonça, M., *et al.* (2010). Antagonism and synergism in Gardnerella vaginalis strains isolated from women with bacterial vaginosis. *J Med Microbiol* 59, 891–897. doi:10.1099/jmm.0.019794-0.
- Terraf, M. C. L., Tomás, M. S. J., Nader-Macías, M. E. F., and Silva, C. (2012). Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *Journal of Applied Microbiology* 113, 1517–1529. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05429.x.

- Thornton, D. J., Rousseau, K., and McGuckin, M. A. (2008). Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus. *Annu Rev Physiol* 70, 459–486. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100702.
- Tyrrell, J., and Harvey, B. J. (2020). Sexual dimorphism in the microbiology of the CF ‘Gender Gap’: Estrogen modulation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Steroids* 156, 108575. doi:10.1016/j.steroids.2019.108575.
- Underhill, D. M., and Ozinsky, A. (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* 14, 103–110. doi:10.1016/S0952-7915(01)00304-1.
- van der Mei, H. C., Bos, R., and Busscher, H. J. (1998). A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 11, 213–221. doi:10.1016/S0927-7765(98)00037-X.
- van der Mei, H. C., van de Belt-Gritter, B., Pouwels, P. H., Martinez, B., and Busscher, H. J. (2003). Cell surface hydrophobicity is conveyed by S-layer proteins—a study in recombinant lactobacilli. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 28, 127–134. doi:10.1016/S0927-7765(02)00144-3.
- van der Veer, C., Hertzberger, R. Y., Bruisten, S. M., Tytgat, H. L. P., Swanenburg, J., de Kat Angelino-Bart, A., *et al.* (2019). Comparative genomics of human *Lactobacillus crispatus* isolates reveals genes for glycosylation and glycogen degradation: implications for in vivo dominance of the vaginal microbiota. *Microbiome* 7, 49. doi:10.1186/s40168-019-0667-9.
- Vandevoorde, L., Christiaens, H., and Verstraete, W. (1992). Prevalence of coaggregation reactions among chicken lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 214–219. doi:10.1111/j.1365-2672.1992.tb01826.x.
- Vanechoutte, M. (2017). The human vaginal microbial community. *Research in Microbiology* 168, 811–825. doi:10.1016/j.resmic.2017.08.001.
- Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C. J., and Vanderleyden, J. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 276, 140–148. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x.
- Vélez, M. P., Petrova, M. I., Lebeer, S., Verhoeven, T. L. A., Claes, I., Lambrichts, I., *et al.* (2010). Characterization of MabA, a modulator of *Lactobacillus rhamnosus* GG adhesion and biofilm formation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59, 386–398. doi:10.1111/j.1574-695X.2010.00680.x.
- Velraeds, M. M. C., Van De Belt-Gritter, B., Van Der Mei, H. C., Reid, G., and Busscher, H. J. (1998). Interference in Initial Adhesion of Uropathogenic Bacteria and Yeasts to Silicone Rubber by A *Lactobacillus Acidophilus* Biosurfactant. *Journal of Medical Microbiology*, 47, 1081–1085. doi:10.1099/00222615-47-12-1081.
- Ventolini, G. (2015). Vaginal *Lactobacillus*: biofilm formation in vivo – clinical implications. *Int J Womens Health* 7, 243–247. doi:10.2147/IJWH.S77956.
- Ventolini, G., Mitchell, E., and Salazar, M. (2015). Biofilm formation by vaginal *Lactobacillus* in vivo. *Medical Hypotheses* 84, 417–420. doi:10.1016/j.mehy.2014.12.020.
- Verdon, J., Coutos-Thevenot, P., Rodier, M.-H., Landon, C., Depayras, S., Noel, C., *et al.* (2016). Armadillidin H, a Glycine-Rich Peptide from the Terrestrial Crustacean *Armadillidium vulgare*,

- Displays an Unexpected Wide Antimicrobial Spectrum with Membranolytic Activity. *Front. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01484.
- Vidaillac, C., Yong, V. F. L., Aschtgen, M.-S., Qu, J., Yang, S., Xu, G., *et al.* (2020). Sex Steroids Induce Membrane Stress Responses and Virulence Properties in *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio* 11. doi:10.1128/mBio.01774-20.
- Vidal, K., Donnet-Hughes, A., and Granato, D. (2002). Lipoteichoic Acids from *Lactobacillus johnsonii* Strain La1 and *Lactobacillus acidophilus* Strain La10 Antagonize the Responsiveness of Human Intestinal Epithelial HT29 Cells to Lipopolysaccharide and Gram-Negative Bacteria. *Infection and Immunity* 70, 2057–2064. doi:10.1128/IAI.70.4.2057-2064.2002.
- Vilen, H., Hynönen, U., Badelt-Lichtblau, H., Ilk, N., Jääskeläinen, P., Torkkeli, M., *et al.* (2009). Surface location of individual residues of SlpA provides insight into the *Lactobacillus brevis* S-layer. *J Bacteriol* 191, 3339–3349. doi:10.1128/JB.01782-08.
- Voltan, S., Castagliuolo, I., Elli, M., Longo, S., Brun, P., D’Inca, R., *et al.* (2007). Aggregating Phenotype in *Lactobacillus crispatus* Determines Intestinal Colonization and TLR2 and TLR4 Modulation in Murine Colonic Mucosa. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1138–1148. doi:10.1128/CVI.00079-07.
- von Ossowski, I., Satokari, R., Reunanen, J., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J., *et al.* (2011). Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Appl Environ Microbiol* 77, 4465–4472. doi:10.1128/AEM.02497-10.
- Walter, J., Chagnaud, P., Tannock, G. W., Loach, D. M., Dal Bello, F., Jenkinson, H. F., *et al.* (2005). A high-molecular-mass surface protein (Lsp) and methionine sulfoxide reductase B (MsrB) contribute to the ecological performance of *Lactobacillus reuteri* in the murine gut. *Appl Environ Microbiol* 71, 979–986. doi:10.1128/AEM.71.2.979-986.2005.
- Walter, J., Loach, D. M., Alqumber, M., Rockel, C., Hermann, C., Pfitzenmaier, M., *et al.* (2007). D-alanyl ester depletion of teichoic acids in *Lactobacillus reuteri* 100-23 results in impaired colonization of the mouse gastrointestinal tract. *Environ Microbiol* 9, 1750–1760. doi:10.1111/j.1462-2920.2007.01292.x.
- Wang, R., Jiang, L., Zhang, M., Zhao, L., Hao, Y., Guo, H., *et al.* (2017). The Adhesion of *Lactobacillus salivarius* REN to a Human Intestinal Epithelial Cell Line Requires S-layer Proteins. *Scientific Reports* 7, 44029. doi:10.1038/srep44029.
- Wang, X., Zhou, Y. C., Huang, Y. C., Zou, T. N., Lü, Z. Y., Chen, Y., *et al.* (2016). [Estradiol stimulates the growth and biofilm formation of clinical *Staphylococcus epidermidis*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 96, 3083–3089. doi:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.38.010.
- Whittenbury, R. (1964). Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. *Microbiology*, 35, 13–26. doi:10.1099/00221287-35-1-13.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., and Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol* 13. doi:10.1371/journal.pcbi.1005595.

- Wiesenfeld, H. C., Hillier, S. L., Krohn, M. A., Landers, D. V., and Sweet, R. L. (2003). Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection. *Clin Infect Dis* 36, 663–668. doi:10.1086/367658.
- Wilson, J. D., Lee, R. A., Balen, A. H., and Rutherford, A. J. (2016). Bacterial vaginal flora in relation to changing oestrogen levels: *International Journal of STD & AIDS*. doi:10.1258/095646207780749583.
- Wira, C. R., Rodriguez-Garcia, M., and Patel, M. V. (2015). The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. *Nature Reviews Immunology* 15, 217–230. doi:10.1038/nri3819.
- Witkin, S. S. (2015). The vaginal microbiome, vaginal anti-microbial defence mechanisms and the clinical challenge of reducing infection-related preterm birth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 122, 213–218. doi:10.1111/1471-0528.13115.
- Witkin, S. S., Linhares, I. M., and Giraldo, P. (2007). Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 21, 347–354. doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.12.004.
- Witkin, S. S., Mendes-Soares, H., Linhares, I. M., Jayaram, A., Ledger, W. J., and Forney, L. J. (2013). 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* 4. doi:10.1128/mBio.00460-13.
- Wylie, J. G., and Henderson, A. (1969). IDENTITY AND GLYCOGEN-FERMENTING ABILITY OF LACTOBACILLI ISOLATED FROM THE VAGINA OF PREGNANT WOMEN. *Journal of Medical Microbiology*, 2, 363–366. doi:10.1099/00222615-2-3-363.
- Yamashima, T. (2003). Jokichi Takamine (1854-1922), the samurai chemist, and his work on adrenalin. *J Med Biogr* 11, 95–102. doi:10.1177/096777200301100211.
- Yang, X., Teng, K., Zhang, J., Wang, F., Zhang, T., Ai, G., *et al.* (2017). Transcriptome responses of *Lactobacillus acetotolerans* F28 to a short and long term ethanol stress. *Scientific Reports* 7, 2650. doi:10.1038/s41598-017-02975-8.
- Yeoman, C. J., Yildirim, S., Thomas, S. M., Durkin, A. S., Torralba, M., Sutton, G., *et al.* (2010). Comparative Genomics of *Gardnerella vaginalis* Strains Reveals Substantial Differences in Metabolic and Virulence Potential. *PLOS ONE* 5, e12411. doi:10.1371/journal.pone.0012411.
- Yepes, A., Schneider, J., Mielich, B., Koch, G., García-Betancur, J.-C., Ramamurthi, K. S., *et al.* (2012). The biofilm formation defect of a *Bacillus subtilis* flotillin-defective mutant involves the protease FtsH. *Molecular Microbiology* 86, 457–471. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08205.x.
- Zhang, R., Daroczy, K., Xiao, B., Yu, L., Chen, R., and Liao, Q. (2012). Qualitative and semiquantitative analysis of *Lactobacillus* species in the vaginas of healthy fertile and postmenopausal Chinese women. *J Med Microbiol* 61, 729–739. doi:10.1099/jmm.0.038687-0.
- Zhang, W., Wang, H., Liu, J., Zhao, Y., Gao, K., and Zhang, J. (2013). Adhesive ability means inhibition activities for *Lactobacillus* against pathogens and S-layer protein plays an important role in adhesion. *Anaerobe* 22, 97–103. doi:10.1016/j.anaerobe.2013.06.005.

Zhou, X., Brown, C. J., Abdo, Z., Davis, C. C., Hansmann, M. A., Joyce, P., *et al.* (2007). Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women. *ISME J* 1, 121–133. doi:10.1038/ismej.2007.12.

Annexes

Poster

Clabaut M., Boukerb A.M., Racine P-J., Pichon C., Kremser C., Queiroz A., Karsybayeva M., Redziniak G., Chevalier S., Feuilloley M.G.J. Estradiol effect on vaginal *Lactobacillus crispatus*. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS2019) Abstract ID 995, Glasgow Scotland, 7-11 July 2019.

Abstract :

Estradiol effect on vaginal *Lactobacillus crispatus*

M. Clabaut¹, C. Kremser², M. Karsybayeva³, J.P. Picot⁴, A. Queiroz⁴, C. Pichon⁵, G. Redziniak⁶, P.J. Racine¹, S. Chevalier¹, M.G.J. Feuilloley¹

¹ LMSM EA4312, Normandie univ., Univ. Rouen, Evreux, France, ²GimoPharm, Longjumeau, France, ³Remedials Laboratoire, Paris, France, ⁴IDbio Novacap group, Limoges, France, ⁵Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France, ⁶Cosmetic Inventions, Antony, France

Background: Lactobacilli is the major phylum of the normal human vaginal microbial community. Several studies have revealed that vaginal disorders and dysbiosis are associated to an important decrease of the Lactobacillii population and the emergence of pathogens. Many strategies have been proposed to protect the vaginal epithelium and re-equilibrate the microbiota to inhibit proliferation of undesired bacteria. Their real impact remains insufficient presumably because of the complex interactions between the microbiota and the host. Indeed, events such as menopause or child-birth are associated to both hormonal and microbiota variations. Moreover, a direct effect of estrogens on the vaginal microbiota has never been investigated.

Objectives: We choose to focus the present study on the potential effects of estradiol on *Lactobacillus crispatus*, one of the dominant species in the healthy vagina.

Methods: *L. crispatus* strains CIP104459 (Institut Pasteur) and V4 from vaginal swab origin were chosen to investigate the effects of estradiol on growth, adhesion, biofilm formation, auto-aggregation and biosurfactant production.

Results: This study revealed that CIP and V4 strains have different and variable behaviours in terms of biofilm forming potential, auto-aggregation and biosurfactant production. Noticeably, estradiol was shown to modulate these activities. In addition, *in silico* studies suggest that the effects of estradiol on *L. crispatus* could be explained by the expression of ortholog(s) of the human estradiol receptor allowing bacteria to adapt their physiology in response to estradiol.

Estradiol effect on vaginal *Lactobacillus crispatus*

M. CLABAUT¹, A. BOUKERB¹, C. PICHON², A. SUET², C. KREMSER³, A. QUEIROZ⁴, M. KARSYBAYEVA⁵, G. REDZINIAK⁶, S. CHEVALIER¹ & M.G.J. FEUILLOLEY¹

¹Laboratory of Microbiology Signals and Microenvironnement LMSM EA 4312, Normandie univ., Univ. Rouen, Evreux, France, www.lmsm-lab.fr

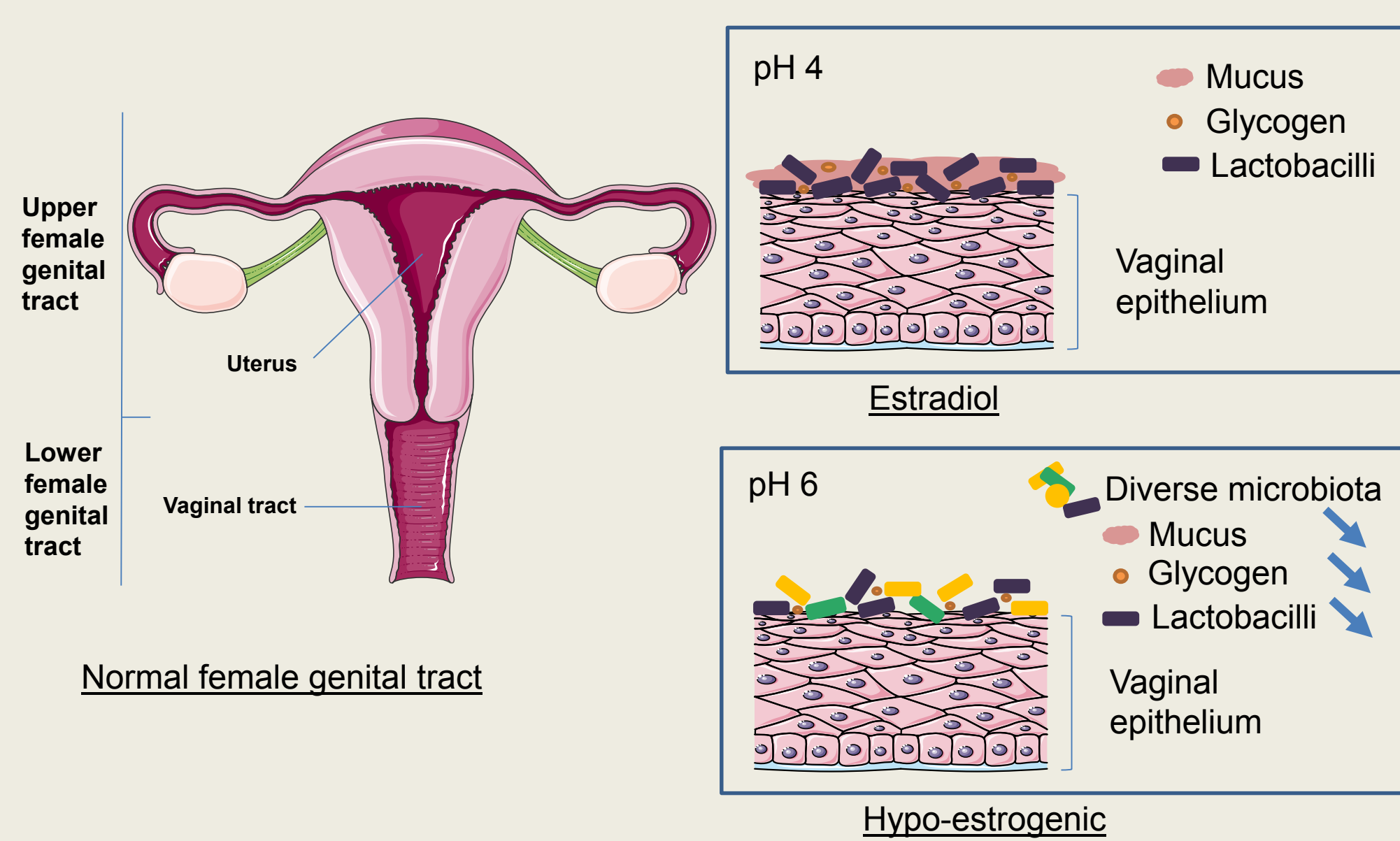
²Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Orléans, France, ³GimoPharm, Longjumeau, France, ⁴IDbio Novacap group, Limoges, ⁵Remedial Laboratoire, Paris, France, ⁶Cosmetic Intentions, Antony, France

Introduction

Lactobacilli are the major phylum of the normal human vaginal microbial community. Several studies have revealed that vaginal disorders and dysbiosis are associated to an important decrease of the Lactobacilli population and the emergence of pathogens. Many strategies have been proposed to protect the vaginal epithelium and re-equilibrate the microbiota to inhibit proliferation of undesired bacteria. Their real impact remains insufficient presumably because of the complex interactions between the microbiota and the host. Indeed, events such as menopause or child-birth are associated to both hormonal and microbiota variations. Moreover, a direct effect of estrogens on the vaginal microbiota has never been investigated. We choose to focus the present study on the potential effects of estradiol on *Lactobacillus crispatus*, one of the dominant species in the healthy vagina. *L. crispatus* strains CIP104459 (Institut Pasteur) and V4 from vaginal swab origin were chosen to investigate the effects of estradiol on their growth, biofilm formation, auto-aggregation and adhesion.

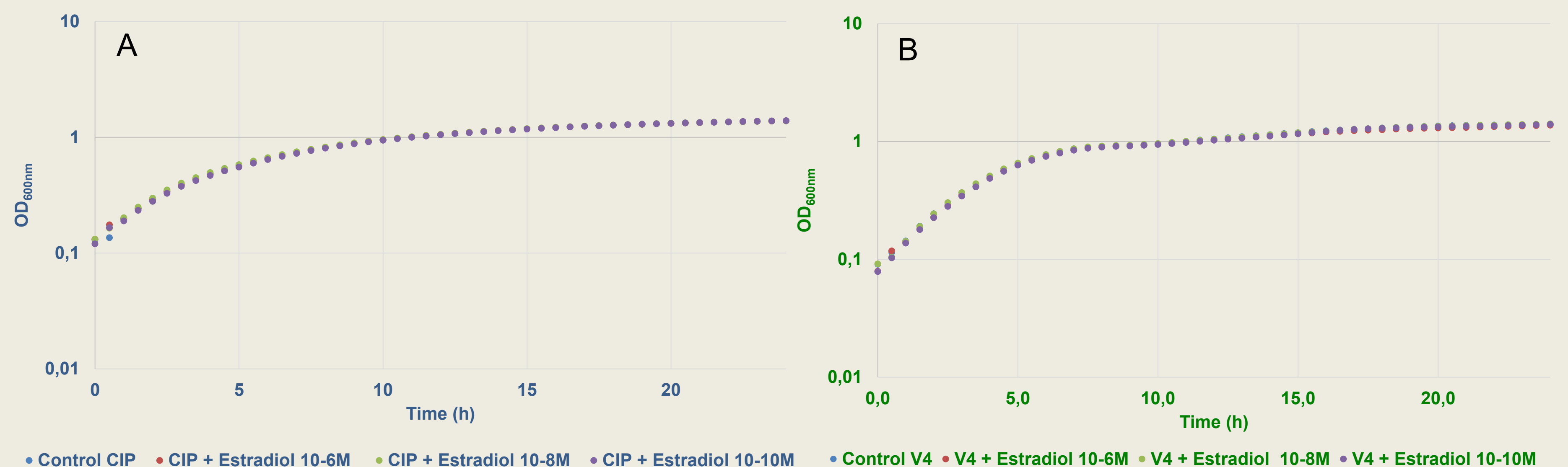
1

Vaginal environment



2

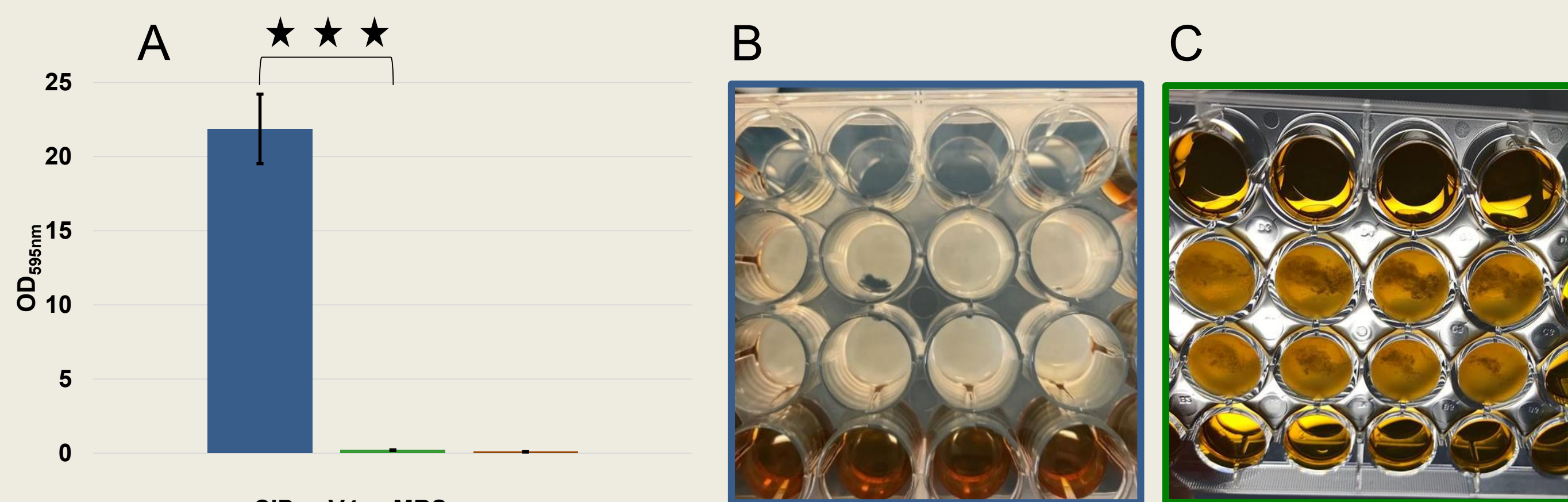
Effect of 17 β -estradiol on CIP and V4 strains growth



Kinetics of growth of *Lactobacillus crispatus* (A) CIP and (B) V4 strains with 17 β -estradiol at three concentrations under anaerobic conditions at 37°C for 24h in MRS broth. The optical density was measured each 15 minutes at 600nm. All data are the mean of four independent experiments.

3

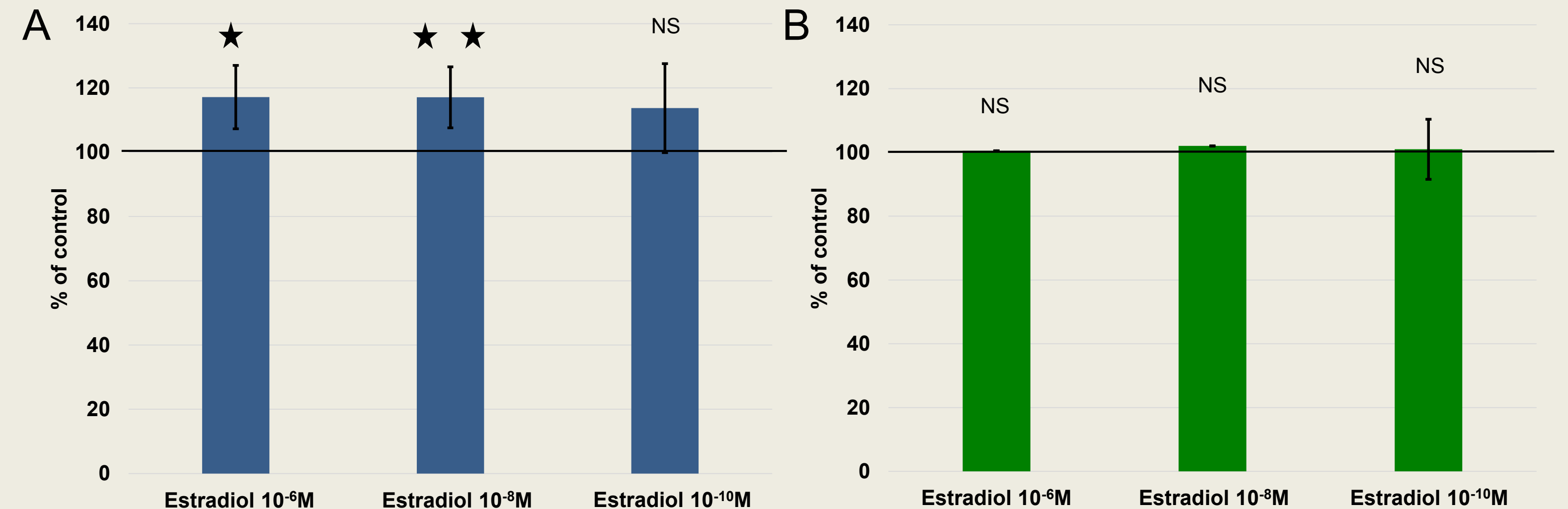
L. crispatus biofilm formation differences



(A) Comparison of capacities of biofilm formation by *Lactobacillus crispatus* CIP and V4. The two strain were compared under the same culture conditions in MRS broth. Plates were incubated anaerobically at 37°C for 48 hours. (B) Biofilm formed by the CIP strain at the bottom of the well. (C) Biofilm formed by the V4 strain: aggregative form, not attached at the well's bottom. The relative propensities of *L. crispatus* to form biofilms were measured by absorbance spectrophotometry after staining with crystal violet 0,1%. All data are the mean of four independent experiments. *** P<0,001

4

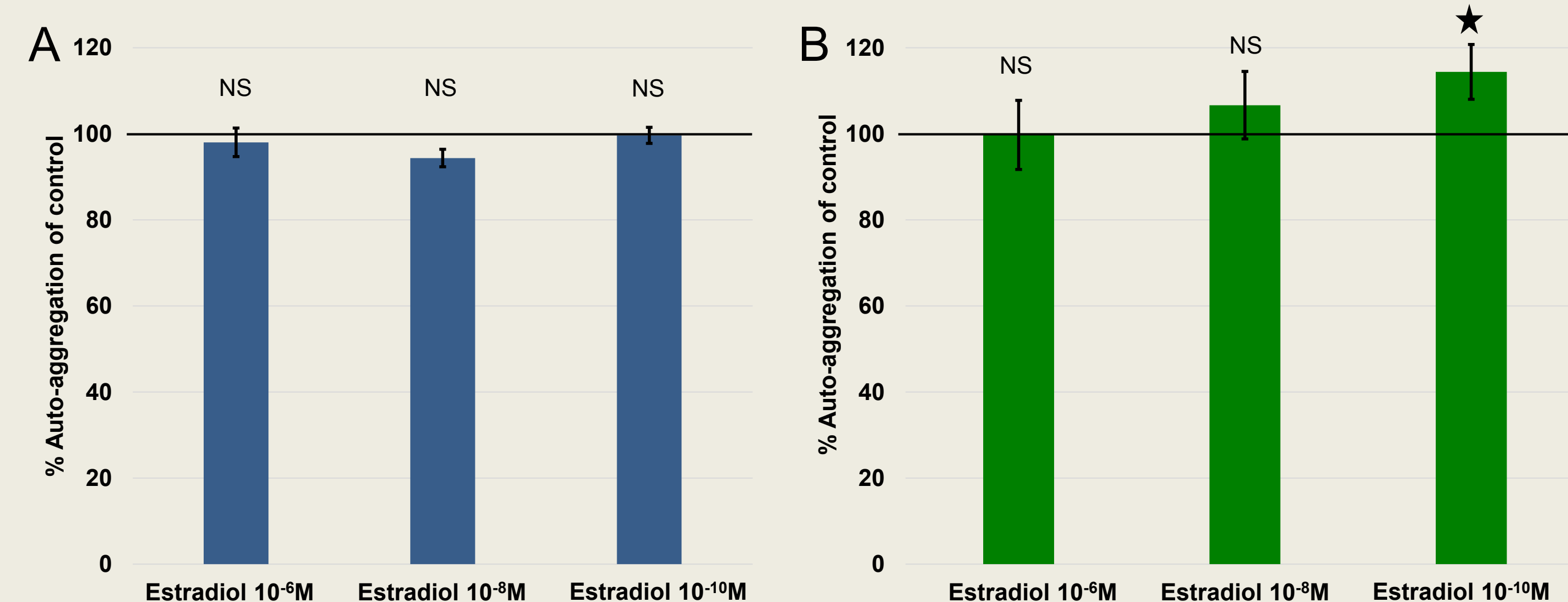
Effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* biofilm formation



Biofilm formation by *Lactobacillus crispatus* (A) CIP and (B) V4 treated with 17 β -estradiol. The two strains were grown under the same culture conditions in MRS broth with three estradiol concentrations. Plates were incubated anaerobically at 37°C for 48 hours. The relative propensities of *L. crispatus* to form biofilms were measured by absorbance spectrophotometry after staining with crystal violet 0,1%. And the percentage was compared to control 100% (black line). All data are the mean of four independent experiments. * P<0,05; ** P<0,01; NS: No significantly different.

5

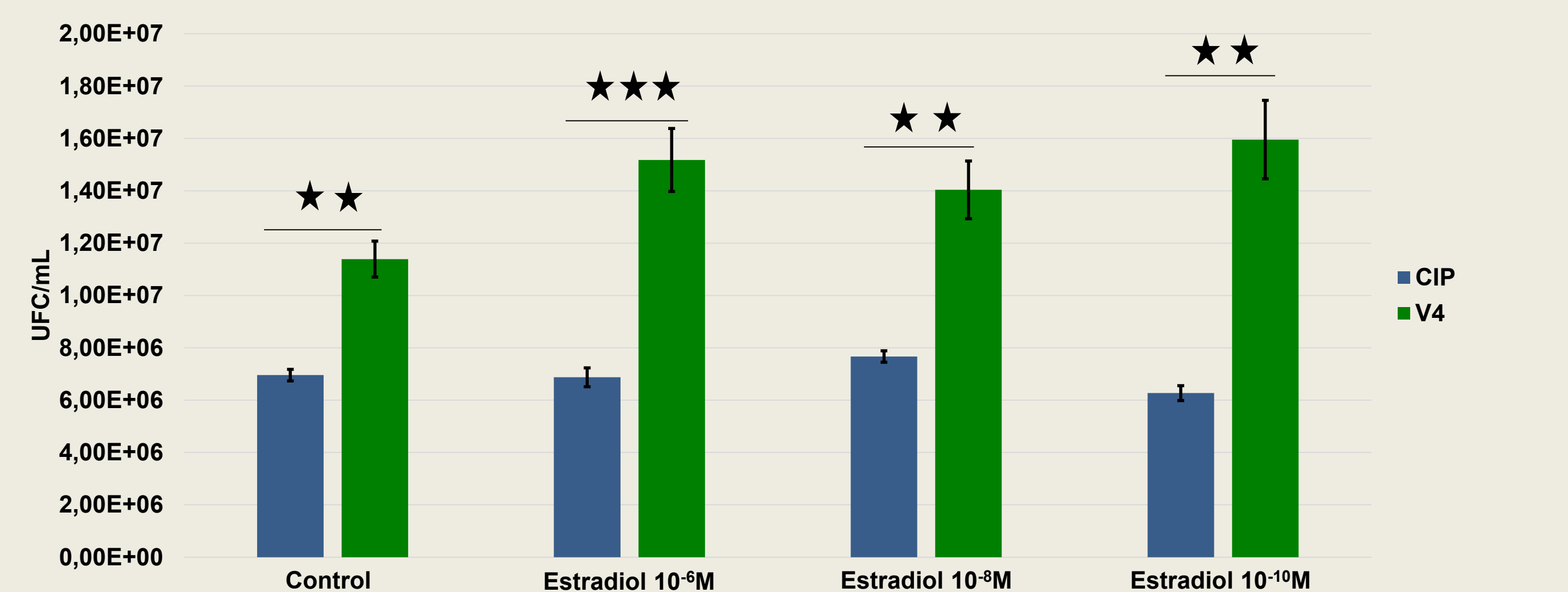
Effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* auto-aggregation ability



Comparison of the autoaggregation ability of *Lactobacillus crispatus* (A) CIP and (B) V4 strain with 17 β -estradiol at three concentrations to compare with the control (black line). Under static conditions 18 hours of incubation at 37°C in anaerobic atmosphere. The auto-aggregation was measured after 30 minutes resuspended in MRS culture supernatant fluids. Error bars represent standard deviations of the mean values of results from four independent experiments. * P<0,05; NS: No significantly different.

6

Effect of 17 β -estradiol on *L. crispatus* adhesion on vaginal cells





Adherence of *L. crispatus* CIP and V4 to vaginal epithelial cells VK2/E6E7 (ATCC® CRL-2616™) with 17 β -estradiol. The strains was incubated with 17 β -estradiol 18h in MRS media before adhesion test. Epithelial cells were incubated with bacterial inocula of MOI:100 and incubated for 2 hour. The number of viable CIP and V4 adhering to the cell monolayer surface was determined by plating onto MRS agar. The data are averages of three independent experiments performed in triplicate. Error bars indicate standard deviations of the mean values of results from three independent experiments. *** P<0,001

Conclusion

This study revealed that CIP and V4 strains have different behaviors in terms of biofilm forming potential and auto-aggregation abilities, and that estradiol can modulate these activities. In addition, *in silico* studies suggest that the effects of estradiol on *L. crispatus* could be explained by the expression of ortholog(s) of the human estradiol receptor allowing bacteria to adapt their physiology in response to estradiol.

Article en co-auteur

Dialog between skin and its microbiota: Emergence of “Cutaneous Bacterial Endocrinology”

Pierre-Jean Racine | Xavier Janvier  | Maximilien Clabaut | Chloe Catovic |
Djouhar Souak | Amine M. Boukerb | Anne Groboillot | Yoan Konto-Ghiorghi |
Cécile Duclairoir-Poc | Olivier Lesouhaitier | Nicole Orange | Sylvie Chevalier |
Marc G. J. Feuilleley 

Laboratory of Microbiology Signals and
Microenvironment LMSM EA4312,
University of Rouen Normandy, Normandie
Université, Evreux, France

Correspondence: Marc G. J. Feuilleley,
Laboratory of Microbiology Signals and
Microenvironment LMSM EA4312,
University of Rouen Normandy, Normandie
Université, 27000 Evreux, France.
Email: marc.feuilleley@univ-rouen.fr

Funding information

LMSM is supported by the Evreux
Agglomeration, Region Normandie, Rouen
University, BPI, ANSES, ANR and European
Union (FEDER).

Abstract

Microbial endocrinology is studying the response of microorganisms to hormones and neurohormones and the microbiota production of hormones-like molecules. Until now, it was mainly applied to the gut and revealed that the intestinal microbiota should be considered as a real organ in constant and bilateral interactions with the whole human body. The skin harbours the second most abundant microbiome and contains an abundance of nerve terminals and capillaries, which in addition to keratinocytes, fibroblasts, melanocytes, dendritic cells and endothelial cells, release a huge diversity of hormones and neurohormones. In the present review, we will examine recent experimental data showing that, in skin, molecules such as substance P, calcitonin gene-related peptide, natriuretic peptides and catecholamines can directly affect the physiology and virulence of common skin-associated bacteria. Conversely, bacteria are able to synthesize and release compounds including histamine, glutamate and γ -aminobutyric acid or peptides showing partial homology with neurohormones such as α -melanocyte-stimulating hormone (α MSH). The more surprising is that some viruses can also encode neurohormones mimicking proteins. Taken together, these elements demonstrate that there is also a cutaneous microbial endocrinology and this emerging concept will certainly have important consequences in dermatology.

KEYWORDS

bacterial communication, calcitonin gene-related peptide, catecholamines, natriuretic factors, skin microbiota, substance P

1 | INTRODUCTION

The pioneering work of Kaplan and Greenberg^[1] led to admit that, as eukaryotic cells, bacteria can communicate. In fact, many multi-cellular social bacterial behaviours such as swarming type motility,^[2] biofilm formation^[3] and virulence expression,^[4] require population

synchronization and that is performed at least partly through a highly regulated cell-to-cell communication system called quorum sensing (QS). QS is based on the bacterial population density, which is performed through secretion and sensing of specific signal molecules named autoinducers. Nowadays, many QS autoinducers, such as the N-acyl homoserine lactones (AHL) and quinolones (Gram-negative

bacteria)^[5] and linear or cyclic peptides (Gram-positive bacteria)^[6] or furanosyl autoinducer 2,^[7] produced by both type of microorganisms have been identified. Some species would also communicate through volatile organic compounds (nitrogen oxides)^[8] and/or specific needle-like structures (type VI secretion system).^[9] Within natural microbiota, the bacterial chat is intense and modulated by degradation enzymes as AHL-lactonases-acylases, or peptidases, targeting specific QS factors through a mechanism designated as "Quorum Quenching."^[10] In parallel, bacteria also communicate with eukaryotic cells. As initially demonstrated by Wu et al,^[11] a bacterium such as *Pseudomonas aeruginosa* can detect the presence of interferon γ in the environment and adapt its behaviour (adhesion potential, QS activity, virulence factors production) to the pre-existing inflammatory state of the host. There is now ample evidence that bacteria can sense many cytokines and chemokines.^[12] This phenomenon can find its origin in co-evolution between bacteria and eukaryotes and the required adaptation of bacteria to the host immune system.^[13] Nevertheless, the more surprising is that bacteria can also detect host neurotransmitters or neurohormones and sometimes produce some of these molecules. This original scientific field was entitled microbial endocrinology.^[14] Microbial endocrinology was particularly investigated in the gut,^[15] because it harbours the major microbiota of the human body, but also as the dispersed enteric endocrine system expresses a large diversity of neuropeptides.^[16] In addition, food itself contains neuroendocrine factors and precursors, which can directly act on the intestinal microbiota.^[17]

The skin harbours the second most abundant microbiome of the human body in terms of mass and diversity.^[18] As the gut, skin is a major neuroendocrine organ^[19,20] innervated by a dense network of nerve fibres^[20] and in constant interaction with the environment.^[21] Keratinocytes, fibroblasts, melanocytes, Langerhans cells and dermal microvascular endothelial cells themselves release a variety of neurohormones almost equivalent to that produced by the enteroendocrine system.^[19,20] These molecules are poorly stable but as paracrine factors, they are continuously renewed.^[22] Moreover, they can diffuse in the tissue matrix^[23] and in sweat,^[24] where their concentrations change according to the host neurophysiological activity or disorders. In this context, the question then arises whether one can speak of cutaneous microbial endocrinology, or at least cutaneous bacterial endocrinology.

2 | BACTERIAL SENSING OF SKIN NEUROHORMONES AND NEUROTRANSMITTERS

2.1 | Substance P

Substance P (SP) was the first neuropeptide identified in skin nerve endings and is essentially located in primary afferent C-fibres.^[25] SP has multiple bioactivities in addition to neurotransmission. Indeed, this undecapeptide of the tachykinin family leads to capillary vasodilatation, fibroblasts and keratinocyte proliferation, and mast

cell degranulation.^[26] It is a major mediator of neurogenic inflammation that is particularly involved in itching pathophysiology.^[27] SP has both direct and indirect antimicrobial activities by acting as a weak cationic antimicrobial peptide^[28] and by stimulating the release of cathelicidins and defensins by cutaneous cells.^[29] However, as shown with many other skin neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NPY) or natriuretic peptides, these activities are only observed at high concentrations ($>10^{-4}$ mol/L).^[12] At physiological sub-micromolar concentrations, some of these skin neuropeptides, such as dynorphin^[30] or natriuretic peptides,^[31,32] induce at the opposite a stimulatory effect on bacterial virulence, leading to a transition of bacteria from a commensal to an opportunistic pathogen behaviour. These effects were poorly investigated, as they are generally not related to any growth rate variation or dysbiosis.

The first study of the effect of SP on cutaneous bacteria was performed on *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* is a low-level skin bacterium, which is responsible for acute cutaneous infections.^[33] *Bacillus cereus* strain MFP01 was collected from a healthy volunteer skin.^[34] Even at the highest concentration tested (10^{-6} mol/L), SP was showing no effect on *B cereus* growth, while stimulating rapidly cytotoxicity on HaCaT keratinocytes ($>90\%$ maximal response is achieved within 5 minutes).^[35] The threshold of SP activity on *B cereus* was low, in the nanomolar range. In mammals, SP is acting through neurokinin 1 receptors, also known as tachykinin receptors 1 (TACR1).^[36] Remarkably, the SP related tachykinin neurokinin A, as well as the SP reversed sequence, had no effects on *B cereus*, suggesting that SP was acting through recognition of a specific target sequence. Mass spectrometric analysis of *B cereus* secretome after SP exposition revealed that the cytotoxicity increase should be attributed to overproduction of collagenase. In addition, cell death is associated to the release of oxygen reactive species, which can be toxic for bacteria^[37] and, in the presence of SP, *B cereus* also overproduced superoxide dismutase, probably as a defense mechanism. Altogether, these data suggest that SP was stressful for the bacterium as much as *B cereus* reacted to SP by a peel-off of the outer wall (bacterial S-Layer) releasing its constituents in the medium, a process known as a bacterial defense reaction. In addition to *B cereus*, the effects of SP were also investigated on cutaneous strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Exposure of *S aureus* and *S epidermidis* to SP was leading to an increased bacterial cytotoxicity on keratinocytes and a decreased viability on reconstructed human epidermis (RHE).^[38] The response of RHE to SP-treated *S aureus* was typical of an inflammatory reaction, with overexpression of the chemokines (CCL5 and CXCL1) and interleukin-8 (IL8) mRNAs.^[38] By contrast, SP-treated *S epidermidis* led to a substantial increased integrin $\alpha 5$ and chemokine ligand 10 expression in RHE. Since these proteins are markers of psoriasis, these data suggest a possible link between the effect of SP on *S epidermidis* and psoriasis. Analysis of *S aureus* secretome showed that this bacterium reacted to SP by overproduction of C2 enterotoxin (SEC2). Conversely, *S epidermidis* did not show any variation of secretome composition but a marked stimulation of biofilm production. Biofilm matrix components can themselves exert

toxic activities on eukaryotic cells.^[39] Accordingly, SP led to increased bacterial colonization potential and persistence abilities favouring chronic inflammation. These data suggesting that SP could act on a large diversity of cutaneous Gram-positive bacteria, it was of major interest to verify if Gram-negative bacteria should be also sensitive to SP. Gram-negative bacteria are generally considered as representing a minor population of the cutaneous microbiota. However, as shown by Grice et al, in moist and sometimes sweaty areas such as the antecubital fossa, proteobacteria and particularly *Pseudomonas* of the fluorescent group can be present in abundance.^[40] The effect of SP was studied on *Pseudomonas fluorescens* MFP05 collected from the skin of a healthy donor.^[34] As in all other studies, SP had

no effect on the growth of this bacterium. *Pseudomonas fluorescens* is generally considered as a low virulence bacterium, and SP did not modify its cytotoxic activity. Nevertheless, *P fluorescens* was also sensitive to SP and, as *S. epidermidis*, responded by an increase in biofilm formation activity.^[41] Then, SP appears capable to modify the physiology and virulence of different unrelated bacterial species and therefore could act as a general regulator of cutaneous microbiota homeostasis (Figure 1).

A crucial point in microbial endocrinology is the identification, if there is one, of the bacterial sensor for the eukaryotic factor. Since the response of *B. cereus* to SP is rapid and since SP is an amphiphilic peptide, with a flexible hydrophilic N-terminal domain and a

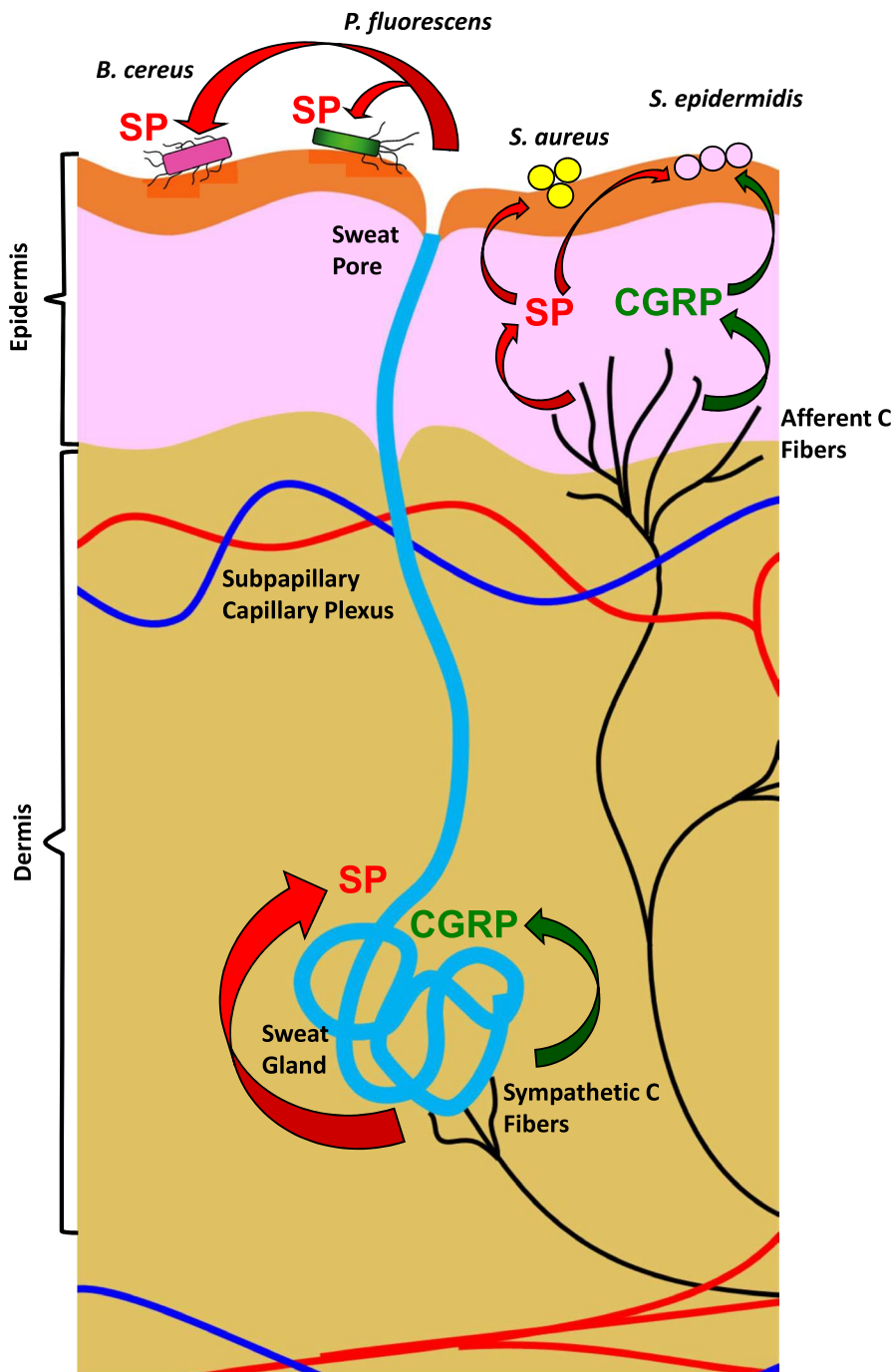


FIGURE 1 Sources of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in skin and known cutaneous bacterial targets. SP and CGRP are released by afferent C-type nerve fibres in sweat and epidermis. SP and CGRP stimulate virulence in *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas fluorescens*

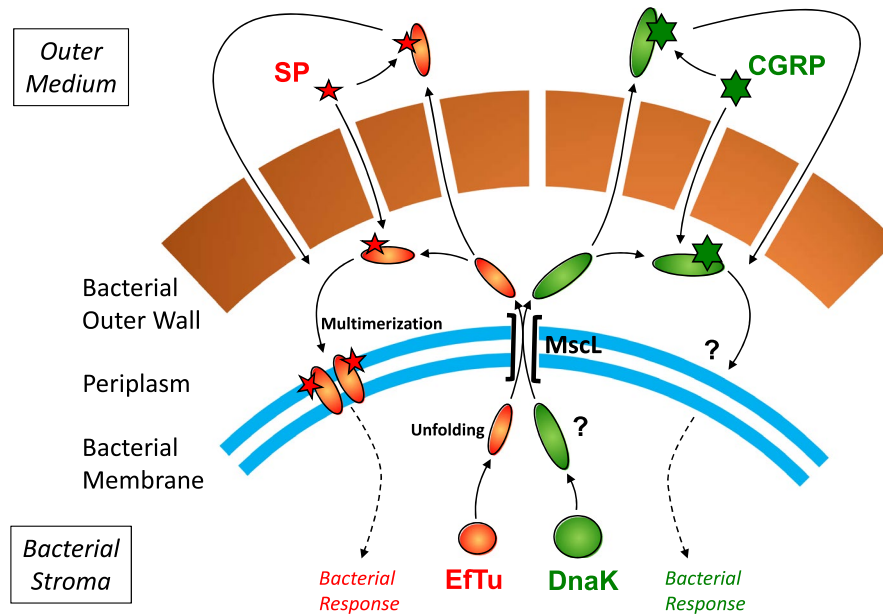


FIGURE 2 Postulated mechanism of action of substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) in *Staphylococcus epidermidis*. The thermos-unstable ribosomal elongation factor EfTu is translocated to the bacteria surface. It requires an unfolding step to be translocated through large mechanosensitive channels MscL. In the bacterial periplasm, it diffuses through the outer wall and acts as an environmental sensor. SP is binding to EfTu and this association promotes the interaction of EfTu multimers to the bacterial membrane. The Hsp70 chaperone DnaK is bigger than EfTu and necessarily also requires an unfolding step to go through MscL. It is also diffusing in the environment through the bacterial wall. DnaK binds to CGRP and, as SP, this interaction is leading to an increase of *Staphylococcus epidermidis* virulence

rigid hydrophobic C-terminal part^[42] which is unable to cross freely the bacterial envelope, the existence of a bacterial membrane SP sensor was postulated. Remarkable, immunoprecipitation assays using SP-treated *B. cereus* membrane proteins and SP antibody-associated beads led to demonstrate that the thermo-unstable ribosomal elongation factor EfTu^[35] was interacting with SP. Studies realized on *S. aureus* and *S. epidermidis* membrane extracts were leading to the same unexpected result.^[38] EfTu has no sequence or structural homology with the eukaryotic SP receptor TACR1.^[43] However, EfTu is produced in large amounts in bacteria (5% of total proteins), which is much more than required for its stoichiometric association with ribosomes.^[44] Moreover, other studies have shown that EfTu can be expressed at the bacterial cell surface where it could act as an adhesin.^[45,46] Such multifunctional proteins able to exert different functions in the bacterial stroma and in the membrane have been designated as “moonlighting proteins.”^[47] Moonlighting proteins have no specific sequence but they generally change of structure and multimerize during membrane interaction.^[48] About one hundred moonlighting proteins have been identified until now, mainly in prokaryotes.^[48] It was confirmed by confocal and electron microscopy that EfTu is not exposed to *B. cereus* cell surface without SP-treatment, while it is recruited in the membrane after exposure to SP.^[49] SP also acts as a positive transcriptional regulator of the *tuf* gene encoding EfTu and leads to overexpression of EfTu. However, if EfTu is the unique SP sensor but is not present in the bacterial membrane in basal condition, it should have been impossible to initiate the bacterial response to SP. In fact, analysis of EfTu in different

bacterial compartments revealed that, in the absence of exogenous signal, EfTu is present both in the bacterial stroma and in the external environment, but it is probably not bound to the membrane.^[49] Electrophysiological and pharmacological approaches have shown that EfTu can be exported through the bacterial membrane by the large mechanosensitive channel MscL.^[49,50] These data suggest the following putative mode of action of EfTu. EfTu has a globular structure in the bacterial cytoplasm and in this configuration could not interact with the membrane. In addition, because of its size, EfTu should need to unfold for translocation through the MscL channel. This unfolded form should allow interaction of EfTu with SP in the microenvironment and promote EfTu multimerization and insertion in the bacterial membrane^[49] (Figure 2). While the final part of the process leading to the bacterial response remains to be identified, it appears that cutaneous bacterial endocrinology may apply in this case.

2.2 | Calcitonin gene-related peptide

Nevertheless, we cannot exclude that SP should have been an exception rather than the rule. In the skin, sensory C-type nerve terminals from which SP is released frequently also produce another neuropeptide, namely the CGRP.^[51] Two types of this 37 amino acids peptide, α - and β -CGRP, are generated by alternative splicing, but in skin α -CGRP is the predominant form.^[20] This peptide has physiological functions close to that of SP, such as pain, itch and neurogenic

inflammation.^[52] Until now, the effect of CGRP on bacteria was only investigated in *S aureus* and *S epidermidis*.^[53] All studies indicate that *S aureus* is not sensitive to CGRP. As in the case of SP, CGRP has no influence on the growth of *S epidermidis* but stimulates its virulence on both HaCaT keratinocytes and RHE models. The increase is the same as observed with SP (about 400% on keratinocytes at 10^{-6} mol/L) but the threshold is extremely low ($<10^{-12}$ mol/L) and clearly in the physiological range of concentrations.^[53] Exposure of keratinocytes and RHE to CGRP-treated *S epidermidis* showed increased IL8 secretion and bacterial adhesion on the cell surface, but decreased of cellular invasivity and biofilm formation.^[53] These results are consistent with a shift of the bacterium towards an acute virulence behaviour. Given that SP and CGRP can be released by the same nerve fibres, their combined effect was studied. No synergy was observed and, if the two peptides were tested at high concentrations, they were even partially antagonists suggesting at least a partial common mode of action. However, co-immunoprecipitation studies followed by MS analysis revealed that CGRP is not recognized by EfTu but by the chaperone protein DnaK,^[53] a protein of the Hsp70 family. A bioinformatics study showed that DnaK shares partial homology with a eukaryotic protein, the CGRP receptor component protein (CGRP-RCP).^[43] In yeast, CGRP-RCP is known as a multifunctional protein^[54] and in *S epidermidis*, DnaK was also identified as a membrane protein mediating interaction with endothelial cells.^[55] DnaK is then considered as a moonlighting protein.^[48] As EfTu, DnaK appears to be exported through the *S epidermidis* membrane by the large type subset of mechanosensitive channels, MscL.^[53] Then, DnaK and EfTu could compete for their uptake by the same type of transmembrane channel (Figure 2). Considering that DnaK and EfTu are respectively the sensors for CGRP and SP, that should explain the partial antagonism of the two peptides.^[53] Noticeably, DnaK (73 kDa) is much bigger than EfTu (43 kDa), and as the mass exclusion limit of MscL type channels is not the same in all bacterial species, if we hypothesize that in *S epidermidis* this channel is large enough to allow the passage of DnaK and EfTu, but is smaller in *S aureus* and only admits EfTu, that could explain why *S epidermidis* is sensible to SP and CGRP while *S aureus* is only responding to SP.

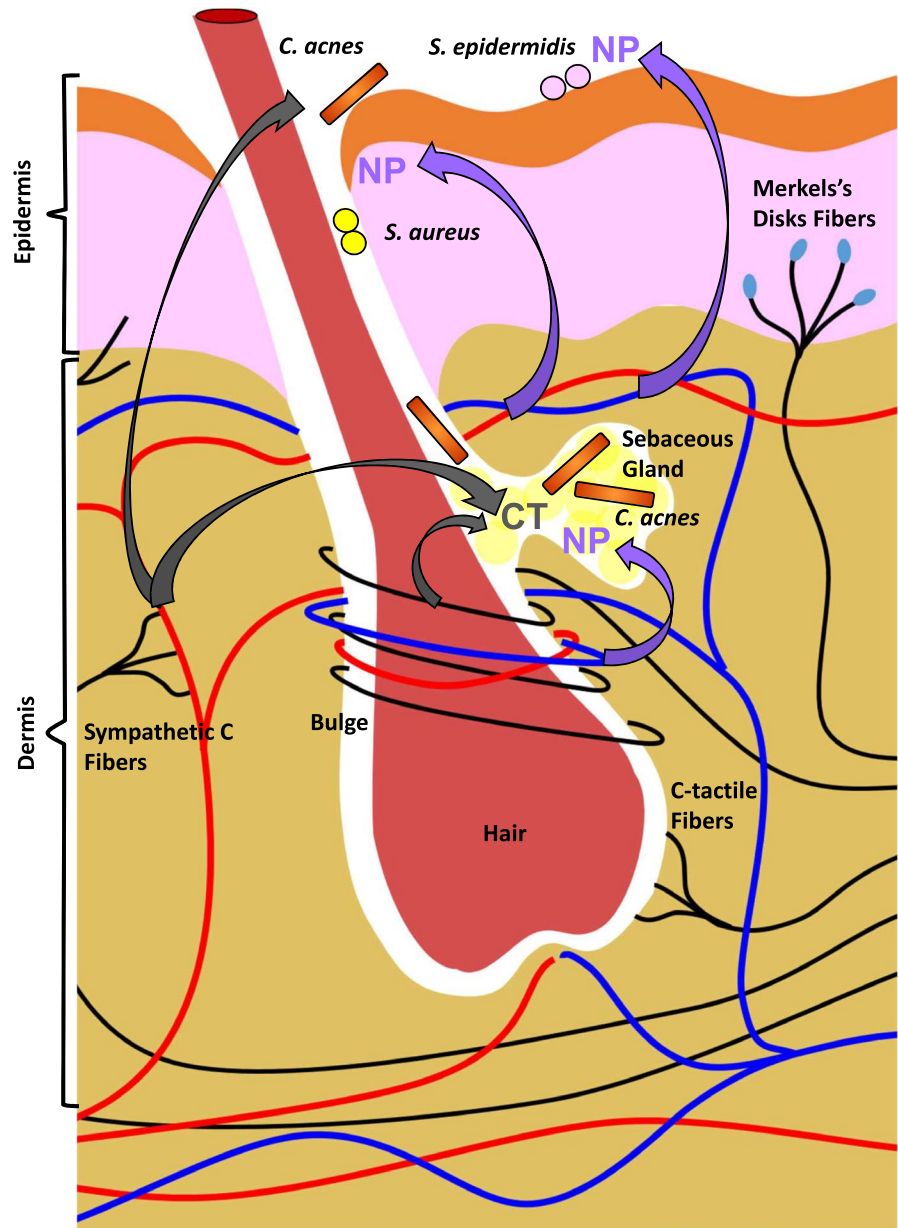
The mechanism of action of CGRP is still under investigation, but these further studies revealed that SP is not an exception and that CGRP can also regulate the interaction of a major component of the cutaneous bacterial microbiota with the skin.

2.3 | Natriuretic peptides

Natriuretic peptides form a small family of omega shaped peptides designated as atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP) and C-type natriuretic peptide (CNP).^[61] In the human skin, histochemical studies have shown the presence of ANP-like immunoreactive peptides in nerves terminals surrounding the secretory ducts of eccrine sweat glands.^[57] More recently, the study of itch revealed that BNP present by skin primary sensory afferent fibres should be a key mediator in a specific itch neurotransmission

pathway.^[58] Natriuretic peptides, and especially CNP, are also produced locally by endothelial cells and ANP, synthesized by cardiomyocytes, is circulating in blood as an hormone.^[56] In this regard, in skin the bulge of the hair follicle is a region of special interest because of the presence of a dense network of capillary vessels at the immediate vicinity of the hair follicle hollow^[59] where gland ducts open to a rich microbial community. Indeed, it has been demonstrated that bacteria, such as *P aeruginosa*, can detect and respond to sub-micromolar concentrations of CNP and to lesser extend to BNP.^[32,60] Moreover, the bacterial sensor protein for the CNP was identified as the protein AmiC. This AmiC protein, which has been initially identified as a bacterial sensor for acetamide, has been also characterized as a structural and functional ortholog of the human type C natriuretic peptide receptor (NPR-C).^[61] In the case of cutaneous bacteria, studies on the effects of natriuretic peptides focused on *S aureus*, *S epidermidis* and *Cutibacterium acnes*, as the principal bacterial species present in the hair follicle. As in the case of SP or CGRP, CNP and ANP have no appreciable effect on the growth parameters of *S aureus* and *S epidermidis* but modulate their biofilm formation activities.^[62] One property of natriuretic peptides is their temperature-dependent activities. At 37°C, the development of *S epidermidis* biofilms is stimulated whereas that of *S aureus* is inhibited. Conversely, at 33°C, the mean temperature on the skin surface, ANP and CNP reduce the biofilm formation activity of *S epidermidis* while that of *S aureus* is increased.^[62] *Staphylococcus aureus* generally possesses a considerable competitive advantage over *S epidermidis*, both in planktonic co-culture and mixed biofilms. However, of special relevance, it was observed that in biofilms at 37°C natriuretic peptides increase the competitiveness of *S epidermidis* against *S aureus*.^[62] By consequence, natriuretic peptides should exert a protective function against potential *S aureus* infections during inflammation when the local temperature increases. ANP and CNP have also a strong effect on *C acnes* biofilm formation activity but this effect is variable between strains and, as previously described, following the temperature. For instance, in an acneic strain of *C acnes* of ribotype 5, both natriuretic peptides inhibit biofilm formation at 37°C and 33°C but in another acneic strain of ribotype 4, the peptides are only active at 37°C.^[63] An influence of the oxygenation conditions was also reported. As observed with *S epidermidis*, in mixed biofilms ANP and CNP provide an important competitive advantage to *C acnes* against *S aureus*.^[63] In fact, *C acnes* appears to interfere with the initial adhesion step of *S aureus*. Taken together, these results were leading to the hypothesis that, in the skin, natriuretic peptide should serve as thermostats regulating the biofilm formation activity of the different bacterial species following the temperature and presumably the inflammatory conditions^[63] (Figure 3). The sensor for natriuretic peptides in *S aureus*, *S epidermidis* and *C acnes* was not identified until now. However, bioinformatic studies performed on the sequenced genome of *C acnes* revealed the presence of an amidase showing 69% homology with the *P aeruginosa* AmiC protein previously identified as the sensor for CNP in this bacterium.^[63] No protein ortholog to the human natriuretic peptide receptor (NPR-C) was found in the genome of *S aureus* but this bacterial species also

FIGURE 3 Sources of natriuretic peptides (NP) and catecholamines (CT) in skin and known cutaneous bacterial targets. NP and CT are released by blood, capillary endothelial cells, C-tactile fibres and sympathetic C-fibres. NP and CT essentially modulate *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *C. acnes* biofilm formation



express enzymes showing partial homology with the bacterial sensor for CNP, AmiC.^[63]

Therefore, as SP and CGRP, in skin, natriuretic peptides should also regulate the behaviour of cutaneous bacteria, but through an original way involving a mechanism dependent of the temperature.

2.4 | Catecholamines

Catecholamines (adrenalin and noradrenalin) have been the first neurohormones identified for their activity on bacteria and were at the origin of the concept of microbial endocrinology.^[14] The skin contains an abundance of sympathetic nerve terminals making catecholamines the principal autonomic skin neurotransmitters.^[64,65] Moreover, keratinocytes and melanocytes can be also local sources of catecholamines.^[20,66] Nowadays, many bacterial species have

been characterized for their response to catecholamines^[67] but the effect of these neurohormones was rarely studied on bacteria isolated from the human skin. The unique study realized on the effect of adrenalin and noradrenalin on cutaneous bacterial strains was performed on *C. acnes* using acneic (ribotype 4, RT4) and non-acneic strains (ribotype 6, RT6).^[68] As observed with all cutaneous factors discussed herein, catecholamines have no influence of the growth of these bacteria. However, adrenalin and noradrenalin strongly stimulate the biofilm formation by the acneic RT4 strain. The response of the RT6 non-acneic strain is generally limited to adrenalin. The different strains of *C. acnes* have a very low intrinsic cytotoxicity and inflammatory potential on keratinocytes^[69] and sebocytes^[68] and catecholamines have no apparent effect on virulence. However, it is interesting to note that both adrenalin and noradrenalin modify the surface properties (hydrophobicity) of *C. acnes* and potentiate its effect on lipid production by sebocytes in vitro.^[68] Considering

that acne is linked to hyper-seborrhoea, these results suggest that catecholamines should indirectly stimulate seborrhoea by acting on *C. acnes* and therefore that the cutaneous microbiota should be a relay between stress and acne (Figure 3). Different bacterial sensors for catecholamines have been identified. The principal one, initially found in *Escherichia coli*, is the QseBC system^[70] but alternative receptors such as QseEF, BasRS or CpxAR were also described. Unexpectedly, no sequence encoding for homologous proteins was found in *C. acnes* genome.^[68] Only an osmosensitive K⁺ channel histidine kinase, KdpD, showed partial homology with QseC. Deeper studies indicated that this protein probably originates from duplication and inversion of a sequence encoding for a QseC related protein. Moreover, 3D modelling and molecular docking revealed that this transmembrane protein shows an extracellular loop comprising the same amino acids as an insect catecholamine receptor.^[68] Information can be also deduced from studies achieved on typical microorganisms of the cutaneous microbiota but collected from other environments. For instance, it has been shown in an infectious strain of *S. aureus* that, because of their affinity to iron, catecholamines can act as secondary siderophores for the bacterium and increase its pathogenicity.^[71] Studies performed on intestinal colonocytes also indicate that catecholamines increase the virulence of *P. fluorescens*, leading to destabilization of the intestinal epithelial barrier.^[72]

The effect of catecholamines on *C. acnes* and probably other cutaneous bacteria is thus supported by physiological and molecular demonstrations.

2.5 | Involvement of other cutaneous hormones and neurohormones

A multitude of neuropeptides is present in skin and, for the great majority, their potential interaction with the cutaneous microbiota remains to be investigated. This is the case of α -MSH and proopiomelanocortin (POMC) related peptides, which are synthesized in the epidermis^[73] and can exert antimicrobial activity^[74] but have not been considered in the context of skin physiology. Other skin neuropeptides, such as NPY, vasoactive intestinal polypeptide and galanin related peptides, have antimicrobial activity, generally at high non-physiological concentrations, against microorganisms including members of the cutaneous microbiota such as *S. aureus*, *Streptococcus mutans* or *Candida* sp.^[75,76] That is not indicating that those molecules take part to the dialog with the microbiota but it should be noticed that, before further studies, at high non-physiological concentrations SP, CGRP and natriuretic peptides have been all initially associated to antimicrobial activities.^[75,77] Serotonin and melatonin are both synthesized by keratinocytes and melanocytes.^[78-80] Serotonin is also produced by different bacterial species, as revealed by a study realized on the gut microbiota^[81] and should be essential in the crosstalk between the intestinal microbiota and its host.^[82] It was even demonstrated that serotonin can regulate the pathogenic potential of bacteria, such as *P. fluorescens*, on enterocytes.^[72]

Melatonin, which derives from serotonin, is also produced by cyanobacteria and α -proteobacteria,^[83,84] whose ancestors are considered at the origin of mitochondria.^[85] Melatonin has been shown to exert an antimicrobial activity, particularly against Gram-negative bacteria.^[86] It was also observed that the activity of gut bacteria is submitted to a melatonin dependent circadian rhythm.^[87] Serotonin and melatonin synthesis by common cutaneous bacteria and occurrence in the skin microbiota of serotonin and melatonin dependent regulatory activities were not investigated until now. A particular attention should be given to γ -aminobutyric acid (GABA) which in skin is produced by fibroblasts^[88] and immune cells,^[89] and released by interneurons involved in itch transmission.^[58] GABA exerts multiple local effects in skin, including fibroblasts proliferation and regulation of collagen I expression.^[90,91] However, GABA is also known as a universal inter-kingdom communication molecule.^[92,93] The effect of GABA on cutaneous bacteria was not specifically investigated, but studies were performed on an environmental strain of *P. fluorescens*, one of the rare species of commensal skin proteobacteria, and on *P. aeruginosa*, essentially identified in skin in pathogenic conditions. These works worth being mentioned since, besides observation of the stimulatory effect of GABA on *P. fluorescens* and *P. aeruginosa* cytotoxicity and biofilm formation activity,^[94,95] the GABA binding site in *P. aeruginosa* was identified as the EfTu protein,^[95] also known as the SP sensor in *B. cereus*, *S. aureus* and *S. epidermidis* as previously discussed. This is suggesting that EfTu should play a role of large spectrum sensor allowing bacteria to detect simultaneously different host factors. This is coherent with the need of microorganisms to adapt in permanence to multiple environmental variations but using the limited number of proteins encoded in their genome.

3 | BACTERIAL SYNTHESIS OF NEUROHORMONES AND NEUROTRANSMITTERS

If we consider the definition of microbial endocrinology given by its author as the study of the ability of microorganisms to respond and produce neurochemicals,^[96] we can see that the first aspect of the definition is well supported by experimental data. The second is probably more hazardous as most of neurochemicals are difficult to assay because of their low stability and also depend on the growing conditions of the microorganisms. This question has been particularly investigated in the gut microbiota^[97] but there are also indications that members of the cutaneous microbiota can synthesize and release molecules with potential neurotransmitter and/or neuromodulatory activity.

Concerning bacterial molecules capable to act as neurotransmitters, it has been demonstrated that *S. epidermidis*^[98] and *C. acnes*^[99] have all the enzymatic equipment required for histamine biosynthesis and the role of histamine in itch and pruritis is well known.^[100,101] Glutamate, another neurotransmitter released in skin by primary sensory neurons,^[102] is also synthesized by different microorganisms including corynebacteria.^[103] As demonstrated in gut, glutamate

should contribute to a bidirectional communication between the cutaneous microbiota and skin.^[104] On another side, both prokaryotes and eukaryotes synthesize GABA and the key enzyme, glutamate decarboxylase, has been found in many Gram-positive and Gram-negative bacteria including *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Streptococcus* and *Pseudomonas*.^[97,105] Even typical bacterial QS factors can act as neurotransmitters. This is particularly the case of N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone produced by Gram-negative bacteria.^[106]

Occurrence of cutaneous bacterial peptidic factors with neuromodulatory activity is a more complex question that remains almost entirely to investigate. Gram-positive bacteria synthesize cyclic and linear peptides as QS factors. In a recent paper, it was demonstrated that some of these peptides can affect neurite outgrowth and glial cell physiology.^[107] In the gut, cyclic and linear peptides produced by bacteria, but also fungi, specifically interfere with angiogenesis, cancer cells development and metastasis.^[108] Similar processes should exist in skin but presently they remain hypothetical. Another source of peptidic molecules susceptible to mediate bacteria-host communication was discovered studying bacterial chemoreception. Indeed, bacteria express a large number of chemoreceptors, mostly of unknown function. Those chemoreceptors can mediate the uptake of metabolites by themselves but generally, they require the help of accessory proteins designated as solute binding proteins (SBP).^[109] Only a

few of SBP have been studied in details. An essential property of these proteins is that they possess additional functions and can bind other targets than chemoreceptors.^[110] For instance, as shown in some strains of *Lactobacillus*, SBP mediate the uptake of biogenic amines from the host.^[111] Authors consider that this process should be a new form of inter-kingdom signalling.^[111] However, one of the more surprising mechanism is bacterial proteins hormones chemical mimicry. Recent studies revealed that *E coli* synthesizes a protease, ClpB, showing conformational homology with α -MSH.^[112] Released in the gut, this bacterial protein can translocate through the intestinal barrier and diffuse in blood. Then, ClpB is interfering with the endogenous role of α -MSH by inducing the production of α -MSH-cross-reactive antibodies.^[112,113] Existence in skin of bacterial antigens leading to the expression of antibodies capable to cross-react with cutaneous neuroendocrine hormones such as α -MSH and POMC derived peptides remains to be investigated. However, this process is certainly essential in skin, as for instance it was demonstrated that bacterial superantigens showing homology with cutaneous proteins (particularly keratin) should be involved in diseases such as cutaneous sarcoidosis^[114] and psoriasis.^[115] Bacteria are then capable to interfere with cutaneous physiology by producing molecules showing total or partial homology with skin neurohormones and neurotransmitters (Figure 4). Finally, it is also essential to keep in mind that the cutaneous

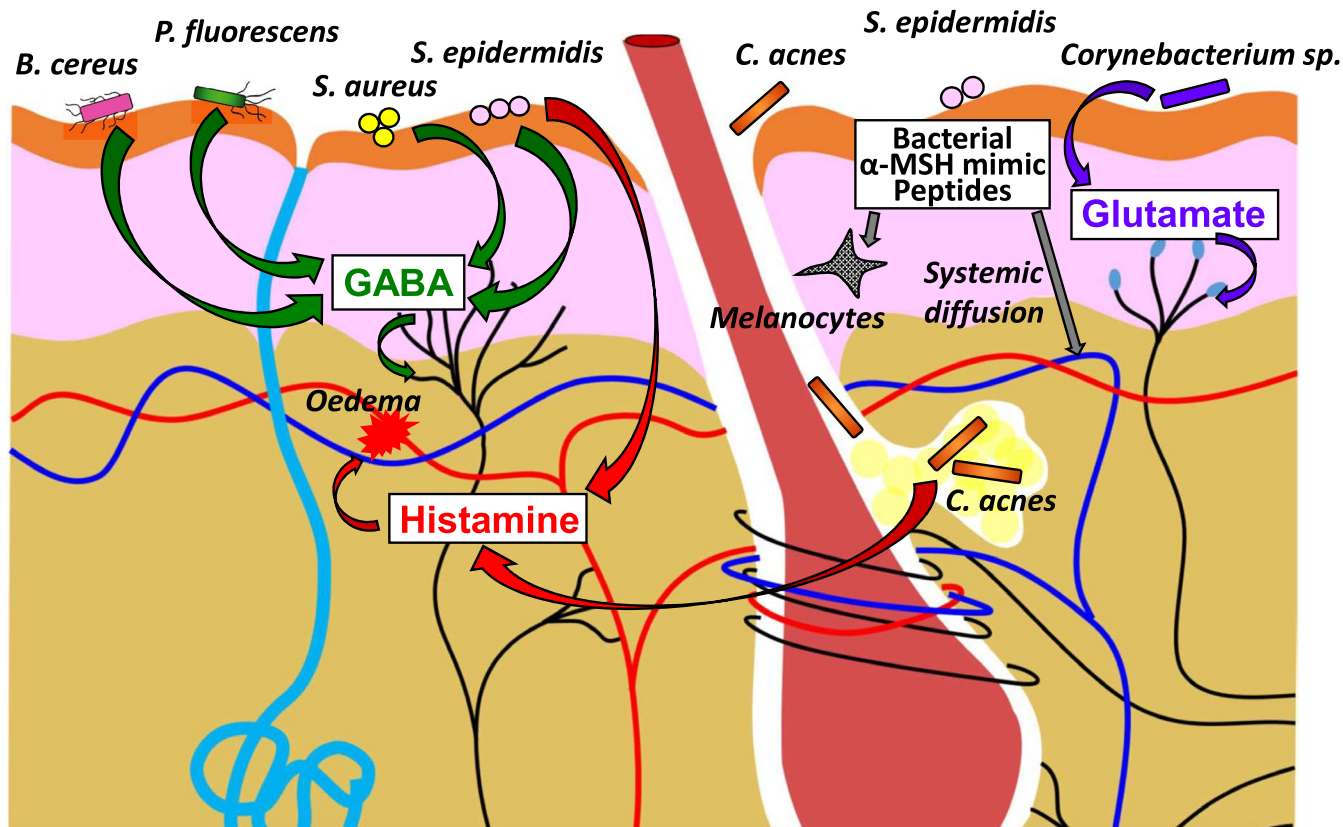


FIGURE 4 Principal known neurohormones or neurohormones-like molecules synthesized by cutaneous bacteria and potential targets in skin

microbiota is not limited to bacteria but also includes viruses. The cutaneous virome of health individuals is at the minimum equivalent to that of the bacterial microbiome ($<10^6$ viruses/cm²) and includes DNA viruses, including bacteriophages, polyomaviruses, papillomaviruses or circoviruses,^[116,117] and RNA viruses such as retroviridae.^[118] Recent studies have been leading to the astonishing result that, as bacterial proteins, viral proteins can act like eukaryotic factors. A minimum of 16 different viral proteins, with high sequence similarity to human hormones and neurohormones including α -MSH, fibroblast growth factor and endothelin, have been identified.^[119] These studies only cover a very limited part of the viral diversity and we can hypothesize that many other viral proteins having the same properties will be discovered in a short future. The impact of those molecules on skin physiology needs to be investigated but it appears nowadays that the cutaneous virome should also participate to the dialog with the host.

Then, by interacting with the different cutaneous hormones and neurohormones, the skin microbiota appears nowadays as an intrinsic factor of cutaneous homeostasis and an essential component of the barrier against environmental aggressions, such as UV.^[120,121]

4 | CONCLUSION

This analysis of the literature shows that cutaneous bacterial endocrinology, and probably cutaneous microbial endocrinology, is an important emerging scientific domain with potential high impact in dermatological sciences. Presently, a major weakness of the concept is the lack of clinical validation, except if we consider the success of cosmetic compounds developed to interfere with skin-bacteria communication.^[122] Besides the cost of clinical studies, we face technical limitations due to the complexity and variability of the cutaneous microbiota and to the need of very high sensitivity and selective technologies to reach compounds potentially active at femtomolar concentrations. With the advancement of massive "omic" technologies (metagenomics, metatranscriptomic, metaproteomic and metabolomic) and the increase of sensitivity of mass spectrometry, we will have in a short future the possibility to confirm the role of cutaneous microbial endocrinology in skin physiology by in vivo clinical data.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors would like to thank GDR CNRS 3711 *Cosm'Actifs* and the world cluster *Cosmetic Valley* for their key role in LMSM activity and visibility.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have no conflict of interest to declare.

AUTHORS CONTRIBUTION

MGJF drafted the first version of the manuscript. P-JR, XJ, MC, CC, DS, AMB, AG, YK-G, CD-P, OL, NO and SC made substantial

contributions by reviewing the manuscript for intellectual content, language and design.

ORCID

Xavier Janvier  <https://orcid.org/0000-0002-6189-2896>

Marc G. J. Feuilloley  <https://orcid.org/0000-0001-6467-4336>

REFERENCES

- [1] H. B. Kaplan, E. P. Greenberg, *J Bacteriol.* **1985**, *163*, 1210.
- [2] R. Daniels, J. Vanderleyden, J. Michiels, *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 261.
- [3] C. Solano, M. Echeverez, I. Lasa, *Curr. Opin. Microbiol.* **2014**, *18*, 96.
- [4] T. Defoirdt, *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 313.
- [5] K. Papenfort, B. L. Bassler, *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 576.
- [6] V. Monnet, V. Juillard, R. Gardan, *Crit. Rev. Microbiol.* **2016**, *42*, 339.
- [7] X. Bivar, *C R Biol.* **2018**, *341*, 297.
- [8] S. Depayras, T. Kondakova, N. Merlet-Machour, H. J. Heipieper, M. Barreau, C. Catovic, M. Feuilloley, N. Orange, C. Duclairoir-Poc, *Int J. Environ. Impacts* **2018**, *1*, 1.
- [9] M. Gallique, M. Bouteiller, A. Merieau, *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1454.
- [10] C. Grandclément, M. Tannières, S. Moréra, Y. Dessaux, D. Faure, *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 86.
- [11] L. Wu, O. Estrada, O. Zaborina, M. Bains, L. Shen, J. E. Kohler, N. Patel, M. W. Musch, E. B. Chang, Y. X. Fu, M. A. Jacobs, M. I. Nishimura, R. E. Hancock, J. R. Turner, J. C. Alverdy, *Science* **2005**, *309*, 774.
- [12] O. Lesouhaitier, W. Veron, A. Chapalain, A. Madi, A.-S. Blier, A. Dagorn, N. Connil, S. Chevalier, N. Orange, M. Feuilloley, *Sensors* **2009**, *9*, 6967.
- [13] J. Barroso-Batista, J. Demengeot, I. Gordo, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8945.
- [14] M. Lyte, *Trends Microbiol.* **2004**, *12*, 14.
- [15] B. C. Lustri, V. Sperandio, C. G. Moreira, *Infect. Immun.* **2017**, *85*, e00476.
- [16] J. B. Furness, *Adv. Exp. Med. Biol.* **2016**, *891*, 159.
- [17] J. M. Lyte, *Front. Endocrinol.* **2019**, *9*, 796.
- [18] E. A. Grice, J. A. Segre, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 244.
- [19] A. Slominski, J. Wortsman, *Endocr. Rev.* **2000**, *21*, 457.
- [20] D. Roosterman, T. Goerge, S. W. Schneider, N. W. Bunnett, M. Steinhoff, *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 1309.
- [21] A. T. Slominski, M. A. Zmijewski, C. Skobowiat, B. Zbytek, R. M. Slominski, J. D. Steketee, *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.* **2012**, *212*, 1.
- [22] L. N. Handly, A. Pilko, R. Wollman, *eLife* **2015**, *4*, e09652.
- [23] S. Harrison, P. Geppetti, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **2001**, *33*, 555.
- [24] G. Cizza, A. H. Marques, F. Eskandari, I. C. Christie, S. Torvik, M. N. Silverman, T. M. Phillips, E. M. Sternberg; POWER Study Group, *Biol. Psychiatry.* **2008**, *64*, 907.
- [25] C. Severini, G. Improta, G. Falconieri-Erspamer, S. Salvadori, V. Erspamer, *Pharmacol. Rev.* **2002**, *54*, 285.
- [26] E. M. Peters, M. E. Ericson, J. Hosoi, K. Seiffert, M. K. Hordinsky, J. C. Ansel, R. Paus, T. E. Scholzen, *J. Invest. Dermatol.* **1937**, *2006*, 126.
- [27] U. Raap, S. Ständer, M. Metz, *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **2011**, *11*, 420.
- [28] C. J. Hansen, K. K. Burnell, K. A. Brogden, *J. Neuroimmunol.* **2006**, *177*, 215.
- [29] K. A. Brogden, *Nat. Rev. Microbiol.* **2005**, *3*, 238.
- [30] O. Zaborina, F. Lepine, G. Xiao, V. Valuckaite, Y. Chen, T. Li, M. Ciancio, A. Zaborin, E. O. Petrof, J. R. Turner, L. G. Rahme, E. Chang, J. C. Alverdy, *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e35.
- [31] W. Veron, N. Orange, M. G. J. Feuilloley, O. Lesouhaitier, *BMC Microbiol.* **2008**, *8*, 114.

- [32] A.-S. Blier, W. Veron, A. Bazire, E. Gerault, L. Taupin, J. Vieillard, K. Rehel, A. Dufour, F. Le Derf, N. Orange, C. Hulen, M. G. J. Feuilleley, O. Lesouhaitier, *Microbiology* **2011**, 157, 1929.
- [33] E. J. Bottone, *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, 23, 382.
- [34] M. Hillion, L. Mijouin, T. Jaouen, M. Barreau, P. Meunier, L. Lefevre, E. Lati, S. Chevalier, M. G. J. Feuilleley, *Microbiologyopen* **2013**, 2, 953.
- [35] L. Mijouin, M. Hillion, Y. Ramdani, T. Jaouen, C. Duclairoir-Poc, M.-L. Follet-Gueye, E. Lati, F. Yvergnaux, A. Driouich, L. Lefevre, C. Farmer, L. Misery, M. G. J. Feuilleley, *PLoS One* **2013**, 8, e78773.
- [36] Y. Takeda, K. B. Chou, J. Takeda, B. S. Sachais, J. E. Krause, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 179, 1232.
- [37] S. Y. Kim, C. Park, H. J. Jang, B. O. Kim, H. W. Bae, I. Y. Chung, E. S. Kim, Y. H. Cho, *J. Microbiol.* **2019**, 57, 203.
- [38] A. N'Diaye, L. Mijouin, M. Hillion, S. Diaz, Y. Konto-Ghiorghi, G. Percoco, S. Chevalier, L. Lefevre, N. J. Harmer, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilleley, *Front. Microbiol.* **2017**, 8, 15.
- [39] W. H. De Pas, M. R. Chapman, *Res. Microbiol.* **2012**, 163, 592.
- [40] E. A. Grice, H. H. Kong, G. Renaud, A. C. Young, G. G. Bouffard, R. W. Blakesley, T. G. Wolfsberg, M. L. Turner, J. A. Segre, *Genome Res.* **2008**, 18, 1043.
- [41] M. Hillion, L. Mijouin, A. N'Diaye, G. Percoco, J. Esnault, M.-L. Follet-Gueye, F. Yvergnaux, L. Lefevre, M. G. J. Feuilleley, *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2014**, 3, 910.
- [42] D. A. Keire, T. G. Fletcher, *Biophys. J.* **1996**, 70, 1716.
- [43] A. N'Diaye, A. Gannesen, V. Borrel, O. Maillot, J. Enault, P.-J. Racine, V. Plakunov, S. Chevalier, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilleley, *Front. Endocrinol.* **2017**, 8, 15.
- [44] B. D. Beck, *Eur. J. Biochem.* **1979**, 97, 495.
- [45] D. Granato, G. E. Bergonzelli, R. D. Pridmore, L. Marvin, M. Rouvet, I. E. Corthésy-Theulaz, *Infect. Immun.* **2004**, 72, 2160.
- [46] S. F. Dallo, B. Zhang, J. Denno, S. Hong, A. Tsai, W. Haskins, J. Y. Ye, T. Weitaio, *ScientificWorld J.* **2012**, 2012, 128705.
- [47] C. J. Jeffery, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, 24, 8.
- [48] V. Amblee, C. J. Jeffery, *PLoS One* **2015**, 10, e0130575.
- [49] A. R. N'Diaye, V. Borrel, P.-J. Racine, T. Clamens, S. Depayras, O. Maillot, B. Schaack, S. Chevalier, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilleley, *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1304.
- [50] C. Berrier, A. Garrigues, G. Richarme, A. Ghazi, *J. Bacteriol.* **2000**, 182, 248.
- [51] I. L. Gibbins, D. Wattchow, B. Coventry, *Brain Res.* **1987**, 414, 143.
- [52] J. E. Choi, A. Di Nardo, *Semin. Immunopathol.* **2018**, 40, 249.
- [53] A. R. N'Diaye, C. Leclerc, T. Kentache, J. Hardouin, C. Poc, Y. Konto-Ghiorghi, S. Chevalier, O. Lesouhaitier, M. G. J. Feuilleley, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 35379.
- [54] M. Siaux, C. Zaros, E. Levivier, M. L. Ferri, M. Court, M. Werner, I. Callebaut, P. Thuriaux, A. Sentenac, C. Conesa, *Mol. Cell. Biol.* **2003**, 23, 195.
- [55] N. Hirschhausen, T. Schlesier, M. A. Schmidt, F. Götz, G. Peters, C. Heilmann, *Cell. Microbiol.* **2010**, 12, 1746.
- [56] L. R. Potter, A. R. Yoder, D. R. Flora, L. K. Antos, D. M. Dickey, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2009**, 191, 341.
- [57] H. Tainio, A. Vaalasti, L. Rechartd, *Histochem J.* **1987**, 19, 375.
- [58] M. Schmelz, *Front. Med.* **2019**, 6, 167.
- [59] Y. Xiao, W.-M. Woo, K. Nagao, W. Li, A. Terunuma, Y. S. Mukoyama, A. E. Oro, J. C. Vogel, I. Brownell, *J. Invest. Dermatol.* **2013**, 133, 2324.
- [60] W. Veron, O. Lesouhaitier, X. Pennanec, K. Rehel, P. Leroux, N. Orange, M. G. J. Feuilleley, *FEBS J.* **2007**, 274, 5852.
- [61] T. Rosay, A. Bazire, S. Diaz, T. Clamens, A.-S. Blier, L. Mijouin, B. Hoffmann, J.-A. Sergent, E. Bouffartigues, W. Boireau, J. Vieillard, C. Hulen, A. Dufour, N. J. Harmer, M. G. J. Feuilleley, O. Lesouhaitier, *mBio* **2015**, 6, e01033-e1115.
- [62] A. V. Gannesen, O. Lesouhaitier, A. I. Netrusov, V. K. Plakunov, M. G. J. Feuilleley, *Microbiol. Russia* **2018**, 87, 597.
- [63] A. V. Gannesen, O. Lesouhaitier, P.-J. Racine, M. Barreau, A. I. Netrusov, V. K. Plakunov, M. G. J. Feuilleley, *Front. Microbiol.* **2018**, 9, 2912.
- [64] I. L. Gibbins, *The Autonomic Nervous System. Autonomic Innervation of the Skin*, Taylor & Francis Harwood Academic Publisher, Amsterdam **1997**.
- [65] V. Donadio, M. Nolano, V. Provitiera, A. Stancanelli, F. Lullo, R. Liguori, L. Santoro, *Ann. Neurol.* **2006**, 59, 376.
- [66] K. U. Schallreuter, J. M. Wood, R. Lemke, C. LePoole, P. Das, W. Westerhof, M. R. Pittelkow, A. J. Thody, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 189, 72.
- [67] E. K. Sarkodie, S. Zhou, S. A. Baidoo, W. Chu, *Microb. Pathog.* **2019**, 131, 270.
- [68] V. Borrel, P. Thomas, C. Catovic, P.-J. Racine, Y. Konto-Ghiorghi, L. Lefevre, C. Duclairoir-Poc, C. C. Zouboulis, M. G. J. Feuilleley, *Front. Med.* **2019**, 6, 155.
- [69] J. Enault, T. Saguet, F. Yvergnaux, M. G. J. Feuilleley, *IFSCC Mag.* **2014**, 10.
- [70] M. H. Karavolos, K. Winzer, P. Williams, C. M. Khan, *Mol. Microbiol.* **2013**, 87, 455.
- [71] F. C. Beasley, C. L. Marolda, J. Cheung, S. Buac, D. E. Heinrichs, *Infect. Immun.* **2011**, 79, 2345.
- [72] K. Biaggini, C. Barbey, V. Borrel, M. Feuilleley, P. Déchelotte, N. Connil, *Arch. Microbiol.* **2015**, 197, 983.
- [73] A. Slominski, J. Wortsman, T. Luger, R. Paus, S. Solomon, *Physiol. Rev.* **2000**, 80, 979.
- [74] A. Catania, G. Colombo, C. Rossi, A. Carlin, A. Sordi, C. Lonati, F. Turcatti, P. Leonardi, P. Grieco, S. Gatti, *ScientificWorldJournal.* **2006**, 6, 1241.
- [75] I. A. El Karim, G. L. Linden, D. F. Orr, F. T. Lundy, *J. Neuroimmunol.* **2008**, 200, 11.
- [76] B. S. Holub, I. Rauch, S. Radner, W. Sperl, M. Hell, B. Kofler, *Int. J. Antimicrob. Agents* **2011**, 38, 76.
- [77] A. Krause, C. Liepke, M. Meyer, K. Adermann, W. G. Forssmann, E. Maronde, *Eur. J. Med. Res.* **2001**, 6, 215.
- [78] A. T. Slominski, M. A. Zmijewski, I. Semak, T.-K. Kim, Z. Janjetovic, R. M. Slominski, J. W. Zmijewski, *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 74, 3913.
- [79] A. T. Slominski, R. Hardeland, M. A. Zmijewski, R. M. Slominski, R. J. Reiter, R. Paus, *J. Invest. Dermatol.* **2018**, 138, 490.
- [80] A. T. Slominski, I. Semak, T. W. Fischer, T.-K. Kim, K. Kleszczynski, R. Hardeland, R. J. Reiter, *Exp. Dermatol.* **2017**, 26, 563.
- [81] J. M. Yano, K. Yu, G. P. Donaldson, G. G. Shastri, P. Ann, L. Ma, C. R. Nagler, R. F. Ismagilov, S. K. Mazmanian, E. Y. Hsiao, *Cell* **2015**, 161, 264.
- [82] X. Ge, J. Pan, Y. Liu, H. Wang, W. Zhou, X. Wang, *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2018**, 19, 190.
- [83] L. C. Manchester, B. Poeggeler, F. L. Alvares, G. B. Ogden, R. J. Reiter, *Cell. Mol. Biol. Res.* **1995**, 41, 391.
- [84] A. R. Tilden, M. A. Becker, L. L. Amma, J. Arciniega, A. K. McGaw, *J. Pineal Res.* **1997**, 22, 102.
- [85] C. Esser, N. Ahmadinejad, C. Wiegand, C. Rotte, F. Sebastiani, G. Gelius-Dietrich, K. Henze, E. Kretschmann, E. Richly, D. Leister, D. Bryant, M. A. Steel, P. J. Lockhart, D. Penny, W. Martin, *Mol. Biol. Evol.* **2004**, 21, 1643.
- [86] O. F. Tekbas, R. Ogur, A. Korkmaz, A. Kilic, R. J. Reiter, *J. Pineal Res.* **2008**, 44, 222.
- [87] J. K. Paulose, J. M. Wright, A. G. Patel, V. M. Cassone, *PLoS One* **2016**, 11, e0146643.
- [88] K. Ito, K. Tanaka, Y. Nishibe, J. Hasegawa, H. Ueno, *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, 1770, 291.
- [89] R. Nigam, H. El-Nour, B. Amatya, K. Nordlind, *Arch. Dermatol. Res.* **2010**, 302, 507.
- [90] D. Han, H. Y. Kim, H. J. Lee, I. Shim, D. H. Hahm, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 17, 1661.

- [91] E. Uehara, H. Hokazono, T. Sasaki, H. Yoshioka, N. Matsuo, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2017**, *81*, 376.
- [92] D. F. Owens, A. R. Kriegstein, *Nat. Rev. Neurosci.* **2002**, *3*, 715.
- [93] N. Bouché, B. Lacombe, H. Fromm, *Trends Cell. Biol.* **2003**, *13*, 607.
- [94] A. Dagorn, A. Chapalain, L. Mijouin, M. Hillion, C. Duclairoir-Poc, S. Chevalier, L. Taupin, N. Orange, M. G. J. Feuilloley, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 12186.
- [95] A. Dagorn, M. Hillion, A. Chapalain, O. Lesouhaitier, C. Duclairoir-Poc, J. Vieillard, S. Chevalier, L. Taupin, F. Le Derf, M. G. J. Feuilloley, *Microbiology* **2013**, *159*, 339.
- [96] M. Lyte, D. N. Villageliú, B. A. Crooker, D. R. Brown, *J. Dairy. Sci.* **2018**, *101*, 5619.
- [97] R. Mazzoli, E. Pessione, *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1934.
- [98] K. J. Yokoi, Y. Harada, K. Shozen, M. Satomi, A. Taketo, K. Kodaira, *Gene* **2011**, *477*, 32.
- [99] R. P. Allaker, J. Greenman, R. H. Osborne, *Microbios* **1986**, *48*, 165.
- [100] J. Wallengren, *Dermatol. Ther.* **2005**, *18*, 292.
- [101] H. O. Handwerker, *Neurosci. Lett.* **2010**, *470*, 193.
- [102] K. E. Miller, E. M. Hoffman, M. Sutharshan, R. Schechter, *Pharmacol. Ther.* **2011**, *130*, 283.
- [103] M. Persicke, A. Albersmeier, H. Bednarz, K. Niehaus, J. Kalinowski, C. Rückert, *Stand. Genomic Sci.* **2015**, *10*, 5.
- [104] A. Baj, E. Moro, M. Bistoletti, V. Orlandi, F. Crema, C. Giaroni, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E1482.
- [105] T. Vo, J. H. Park, *J. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *29*, 209.
- [106] D. T. Hughes, V. Sperandio, *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 111.
- [107] Y. Janssens, E. Wynendaele, F. Verbeke, N. Debunne, B. Gevaert, K. Audenaert, C. Van DeWiele, B. De Spiegeleer, *Peptides* **2018**, *101*, 150.
- [108] A. L. Tornesello, L. Buonaguro, M. L. Tornesello, F. M. Buonaguro, *Mini Rev. Med. Chem.* **2018**, *18*, 1567.
- [109] G. H. Scheepers, A. Lycklama, B. Poolman, *FEBS Lett.* **2016**, *590*, 4393.
- [110] M. Fernández, M. Rico-Jiménez, A. Ortega, A. Daddaoua, A. I. García García, D. Martín-Mora, N. M. Torres, A. Tajuelo, M. A. Matilla, T. Krell, *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, E5156.
- [111] M. Lyte, D. R. Brown, *PLoS One* **2018**, *13*, e0191037.
- [112] N. Tennoune, P. Chan, J. Breton, R. Legrand, Y. N. Chabane, K. Akkermann, A. Järv, W. Ouelaa, K. Takagi, I. Ghoulali, M. François, N. Lucas, C. Bole-Feysot, M. Pestel-Caron, J.-C. do Rego, D. Vaudry, J. Harro, E. Dé, P. Déchelotte, S. O. Fetissov, *Transl. Psychiatry* **2014**, *4*, e458.
- [113] S. O. Fetissov, R. Legrand, N. Lucas, *Curr. Med. Chem.* **2019**, *26*, 546.
- [114] H. Valdimarsson, R. H. Thorleifsdottir, S. L. Sigurdardottir, J. E. Gudjonsson, A. Johnston, *Trends Immunol.* **2009**, *30*, 494.
- [115] G. Tchernev, U. Wollina, *Wien. Med. Wochenschr.* **2014**, *164*, 260.
- [116] V. Foulongne, V. Sauvage, C. Hebert, O. Dereure, J. Cheval, M. A. Gouilh, K. Pariente, M. Segondy, A. Burguière, J. C. Manuguerra, V. Caro, M. Eloit, *PLoS One* **2012**, *7*, e38499.
- [117] G. D. Hannigan, J. S. Meisel, A. S. Tyldsley, Q. Zheng, B. P. Hodkinson, A. J. SanMiguel, S. Minot, F. D. Bushman, E. A. Grice, *mBio* **2015**, *6*, e01578-15.
- [118] A. L. Byrd, Y. Belkaid, J. A. Segre, *Nat. Rev. Microbiol.* **2018**, *16*, 143.
- [119] Q. Huang, C. R. Kahn, E. Altindis, *Endocrinology* **2019**, *160*, 2165.
- [120] M. G. J. Feuilloley, *Semin. Immunopathol.* **2018**, *40*, 281.
- [121] A. T. Slominski, M. A. Zmijewski, P. M. Plonka, J. P. Szaflarski, R. Paus, *Endocrinology* **2018**, *159*, 1992.
- [122] M. Feuilloley, *Pour la Sci.* **2015**, *453*, 3.

How to cite this article: Racine P-J, Janvier X, Clabaut M, et al. Dialog between skin and its microbiota: Emergence of "Cutaneous Bacterial Endocrinology". *Exp Dermatol.* 2020;29:790–800. <https://doi.org/10.1111/exd.14158>

Curriculum vitae



maximilien.clabaut93@gmail.com

+33(0) 6.89.86.50.64

27 ans

Permis B



Maximilien Clabaut

Doctorant en Microbiologie

Parcours professionnel



- Depuis décembre 2017** **Doctorant en Microbiologie sous la direction de Marc Feuilloley (Pr) et Sylvie Chevalier-Laurency (Pr)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen
« Effet de l'hormone stéroïdienne 17 β -estradiol sur deux souches de *Lactobacillus crispatus*, marqueur de l'homéostasie vaginale » Projet GYNCEUTICS
- 2017** **Stage de Master 2 recherche sous la direction de Sylvie Chevalier-Laurency (Pr)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen
« Etude de l'effet des phtalates sur la virulence et la formation de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* »
- 2016** **Vendeur/Hôte CDI 10 heures hebdomadaires**
DECATHLON Beauvais (60)
- 2016** **Stage de Master 1 recherche sous la direction de Marc Feuilloley (Pr)**
Laboratoire de Microbiologie - Signaux et Microenvironnement, EA4312, Université de Rouen
« Etude de l'activité des phtalates sur *Pseudomonas aeruginosa* »
- 2015** **Stage de recherche sous la direction de Guy Ladam (Pr)**
laboratoire Polymères, Biopolymères, Surfaces (PBS, UMR CNRS 6270), Université de Rouen
« Réticulation et vectorisation d'actifs au sein de films layer-by-layer biomimétiques »
- 2014** **Stage de fin d'étude de DUT**
Centre de Biologie Oise Picardie, Beauvais (60)
« Mise en place de la méthode HACCP sur le processus pré-analytique en vue de la version 2012 de la norme ISO 15189. »
- 2013** **Stage dans le service qualité d'une Industrie Alimentaire**
Le Petit Cuisinier, Vitry en Artois (62) « Mise en place d'un audit hygiène et révision du dossier d'agrément sanitaire »

Parcours académique & universitaire



- 2017-** **Doctorant en Microbiologie, option** Université de Rouen Normandie
- 2016-17** **Master 2 Biosciences, parcours Microbiologie finalité Recherche (Mention AB),** Université de Rouen
- 2015-16** **Master 1 Biosciences, parcours Microbiologie option Immunologie et Immunorégulation,** Université de Rouen
- 2014-15** **Licence Science et Vie de la Terre, parcours Ingénierie de la Santé,** Université de Rouen
- 2012-14** **DUT Génie Biologique, option Industries Alimentaires et Biologiques,** UPJV Amiens
- 2012** **Baccalauréat Scientifique option SVT,** Lycée Félix Faure, Beauvais

Compétences scientifiques & techniques



- Microbiologie** Culture de bactéries en condition d'aérobiose / anaérobiose (niveau de sécurité 1 & 2) ; tests physiologiques
- Biologie Cellulaire** Veille scientifique, technique et technologique
- Biologie moléculaire** Culture cellulaire (infection, adhésion)
- Biochimie** Extraction et purification d'ADN, d'ARN; PCR et RTqPCR
- Imagerie** Extraction de lipides et protéines, Spectrométrie de Masse MALDI-TOF/TOF
- Immunologie** Microscopie confocale ; Microscopie à épifluorescence ; Microscopie à amplification de contraste
- Bioinformatique** Elisa, Co-immunoprécipitation
- Enseignement** Analyses, représentation de données, Biostatistiques
- 64h travaux pratiques en pharmacologie et protéomique (gels 2D-E)
- 64h travaux pratiques biochimie et microbiologie

Articles scientifiques

Clabaut M., Boukerb A.M., Racine P.-J., Pichon C., Kremser C., Queiroz A., Karsybayeva M., Redziniak G., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Draft genome sequence of *Lactobacillus crispatus* strain V4 isolated from a vaginal swab from a young healthy non-menopausal women. *Microbiology Resource Announcements*

Clabaut M., Boukerb A.M., Racine P.-J., Pichon C., Kremser C., Queiroz A., Karsybayeva M., Redziniak G., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Draft genome sequence of the reference strain *Lactobacillus crispatus* CIP 104459 from vaginal swab origin. *Microbiology Resource Announcements*

Racine P.J, Borrel V., Janvier X., **Clabaut M.**, Catovic C., Souak D., Gannesen A.V., Boukerb A.M., Clamens T., Roweczyk L., Groboillot A., Konto-Ghiorgi Y., Duclairoir-Poc C., Lesouhaitier O., Orange N., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Dialog between skin and its microbiota: Emergence of “Cutaneous Bacterial Endocrinology”. *Exp Dermatol.* 2020 Sep;29(9):790-800. doi: 10.1111/exd.14158. Epub 2020 Aug 3. PMID: 32682345 Review.

Clabaut M., Suet A, Racine PJ, Tahrioui A, Verdon J, Barreau M, Maillot O, Le Tirant A, Karsybayeva M, Kremser C, Redziniak G, Duclairoir-Poc C, Pichon C, Chevalier S, Feuilloy MGJ. Effect of 17 β -estradiol on a human vaginal *Lactobacillus crispatus* strain. *Sci Rep.* 2021 Mar 30;11(1):7133. doi: 10.1038/s41598-021-86628-x. PMID: 33785829; PMCID: PMC8010061.

Maximilien CLABAUT, Amine M. BOUKERB, Amine Ben MLOUKA, Amandine SUET, Ali TAHRIOUI, Julien VERDON, Magalie BARREAU, Olivier MAILLOT, Agathe LE TIRANT, Madina KARSYBAYEVA, Coralie KREMSER, Gérard REDZINIAK, Cécile DUCLAIROIR-POC, Chantal PICHON, Julie HARDOUIN, Pascal COSETTE, Sylvie CHEVALIER, Marc G.J. FEUILLOLEY. Variability of human vaginal *Lactobacillus crispatus* response to 17 β -estradiol. *Scientific reports.* (Soumis)

Communications orales et affichées

Clabaut M., Kremser C, Karsybayeva M., Picot J.P., Pichon C., Redziniak G., Racine P.J., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Influence of estradiol on vaginal microbiota *Lactobacillus crispatus*. Journée de l'École Doctorale EdNBISE 2019

Clabaut M., Kremser C, Karsybayeva M., Picot J.P., Pichon C., Redziniak G., Racine P.J., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Rôle des œstrogènes dans l'homéostasie de la microflore lactobacillaire féminine. GDR cosm'actifs, 24 mai 2019, Vannes.

Clabaut M., Boukerb A.M., Racine P.-J., Pichon C., Kremser C., Queiroz A., Karsybayeva M., Redziniak G., Chevalier S., Feuilloy M.G.J. Estradiol effect on vaginal *Lactobacillus crispatus*. 8th Congress of European Microbiologists (FEMS2019) Abstract ID 995, Glasgow Scotland, 7-11 July 2019.

Autres activités



Président de NormaDoc

Associations de doctorants
Et jeune docteurs en Biologie



Comité d'organisation

23ème édition des journées de
l'école doctorale EdNBISE 497



Sauveteur Secouriste du Travail

Habilitation à la conduite,
maintenance d'autoclaves
Gestion des risques chimiques et
biologiques



Résumé

La microflore lactobacillaire colonise et protège les muqueuses génitales. *Lactobacillus crispatus* est une des espèces majoritaires du microbiote vaginal et est associée à un environnement asymptomatique. Les troubles gynécologiques sont souvent associés à un déséquilibre de cette microflore et à une chute de la population en lactobacilles. Cette dysbiose est concomitante à une baisse des œstrogènes et à une augmentation du pH vaginal laissant place à des germes pathogènes. Sachant que les bactéries peuvent détecter et répondre à de nombreuses hormones, les travaux que j'ai menés durant cette thèse visent à rechercher un éventuel effet des œstrogènes sur la flore lactobacillaire, et en particulier sur *L. crispatus*. Du fait de la grande variabilité entre les souches de lactobacilles, deux souches de *L. crispatus* ont été sélectionnées, une provenant de l'Institut Pasteur (CIP 104459) et l'autre d'un écouvillonnage vaginal (V4). Ces souches ont été caractérisées par un séquençage du génome complet. J'ai pu mettre en évidence que les souches CIP et V4 ont des comportements différents en termes d'adhérence, de biofilm, et d'auto-agrégation et le 17 β -estradiol semble moduler ces réactions en faveur d'une implantation favorisée dans le microenvironnement vaginal. Ces phénomènes semblent être liés en partie à l'effet du 17 β -estradiol sur les propriétés physico-chimiques de leur surface ainsi que par la production de biosurfactants, le tout créant un microenvironnement favorable à leur colonisation. Afin de comprendre les mécanismes moléculaires associés à cette réponse hormonale, une analyse du protéome total a été réalisée. L'effet de l'hormone sur la fluidité membranaire suggère qu'elle fait suite à une réponse adaptative et une étude *in silico* a permis d'identifier un site de liaison du 17 β -estradiol parmi les protéines codées dans le génome de *L. crispatus*, la SPFH domain containing protein. L'interaction avec ce senseur pourrait expliquer le fait qu'en présence de l'hormone, la taille des bacilles est diminuée. Ces travaux suggèrent qu'il serait possible de favoriser l'implantation de *L. cristapatus* et rééquilibrer la microflore vaginale en mimant l'effet du 17 β -estradiol sur les lactobacilles.

Abstract

Lactobacilli colonizes and protects the genital mucosa. *Lactobacillus crispatus* is one of the major species of the vaginal microbiota and is associated with an asymptomatic environment. Gynecological disorders are often associated with an imbalance of this microbiota and a drop in the lactobacilli population. This dysbiosis is concomitant with a decrease in estrogens and an increase in vaginal pH, giving rise to pathogenic germs development. Knowing that bacteria can detect and respond to many hormones, the work that I carried out during this thesis aimed at investigating a possible effect of estrogens on the lactobacilli flora, and in particular on *L. crispatus*. Because of the great variability between *Lactobacillus* strains, two strains of *L. crispatus* were selected, one from the Institut Pasteur (CIP 104459) and the other from a vaginal swab (V4). These strains were characterized by complete genome sequencing. It was observed that the CIP and V4 strains have different behaviors in terms of adhesion, biofilm, and auto-aggregation and 17 β -estradiol seems to modulate these reactions in favor of animplantation in the vaginal microenvironment. These events seem to be linked by part to the effect of 17 β -estradiol on the physico-chemical properties of their surface andto the production of biosurfactants, all of this creating a microenvironment favorable to their colonization. In order to understand the molecular mechanisms associated to this hormonal response, an analysis of the total proteome was performed. The effect of the hormone on the membrane fluidity suggesting that it resulted from an adaptive response of *L. crispatus*. , an *in silico* study allowed to identify the SPFH domain containg protein as potential 17 β -estradiol binding site in the *L. crispatus* genome. Interaction with this sensor could also explain that in the presence of the hormone, the size of the bacilli was reduced Taken together these results suggest that it should be possible to favour *L. cristapatus* implantation and re-equilibrate the vaginal microflora by mimicking the effect of 17 β -estradiol on lactobacilli.