

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS
UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE «Philippe-Maupas»

Année 2024-2025

N° 68

THÈSE D'EXERCICE
pour le
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Par
Carla LEROY

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE VENDREDI 11 OCTOBRE 2024

**Étude du microbiote vaginal cultivable dans le cadre du dépistage
systématique du portage de *Streptococcus agalactiae* chez la
femme enceinte**

JURY

Président : **Professeur Philippe LANOTTE** – PU-PH, Faculté de pharmacie et
CHRU de Tours

Membres :

Professeur Franck PERROTIN - PU-PH, Faculté de médecine et CHRU de Tours

Docteur Adeline PASTUSZKA – PH, CHRU de Tours

Docteur Brice LE GALLOU – AHU, Faculté de médecine et CHRU de Tours

ANNEE : 2024 - 2025

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAudeau, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN, Mme GERMON Stéphanie

ENSEIGNANTS

16 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUESOCQUE-DELAIE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAudeau	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE
THIBAUT	Gilles	IMMUNOLOGIE

33 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE & TOXICOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
DELAIE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE

DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	PARASITOLOGIE & MYCOLOGIE MEDICALES, IMMUNITE ANTI-
LAJOIE	Laurie	IMMUNOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
VERCOILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	Filière Officine
---------------	----------	------------------

5 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE
POUPIN	Pierre	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistique & ÉPIDÉMIologie
VEYRAT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

3 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
TULOUP	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

GERBIER	Soledad	ANGLAIS
---------	---------	---------

3 CHARGÉS DE RECHERCHE

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 11 octobre 2024

L'étudiant Carla LEROY

*Le Doyen de la Faculté
Professeur Denys BRAND*

Table des matières

Liste des abréviations	7
Liste des figures	8
Liste des tableaux	9
Partie A : Généralités	10
1. Généralités sur le microbiote vaginal	10
2. Méthodes d'étude du microbiote vaginal	10
a. Bactériologie standard	10
b. Culturomique	12
c. Séquençage haut débit	13
3. Caractéristiques des principaux types de microbiote vaginal	15
a. Rôle protecteur des <i>Lactobacillus</i>	15
b. Variations et dynamique de la flore vaginale	15
c. Microbiotes pauvres en <i>Lactobacillus</i>	16
4. Rôle du microbiote vaginal au cours de la grossesse	18
a. Grossesse physiologique	18
b. Grossesse pathologique	18
i. Pré maturité	18
ii. Portage de bactéries pathogènes	20
5. Dépistage systématique de <i>Streptococcus agalactiae</i> chez la femme enceinte	22
a. Généralités sur <i>S. agalactiae</i>	22
b. Physiopathologie	23
c. Portage et recommandations	24
6. Objectifs	26
Partie B : Matériels et méthodes	27
1. Collecte et conservation des échantillons	27
2. Critères d'inclusion	27
3. Analyse par culture	27
a. Prise en charge des prélèvements	27
b. Identification bactérienne	28
c. Collecte des résultats	29
d. Tests statistiques	29
4. Analyse NGS	29
Partie C : Résultats	30
1. Description des échantillons	30
a. Résultats de l'examen microscopique	30
b. Résultats de la culture bactérienne	31
2. Apport de la culture sur milieux non sélectifs	31
a. Par rapport aux résultats du dépistage de la colonisation à <i>S. agalactiae</i>	31
b. Par rapport aux résultats de l'examen microscopique	31
3. Analyse des caractéristiques des différentes flores vaginales	33
a. Description des différents types de flores vaginales	33
i. Flores normales	34
ii. Flores intermédiaires	36

iii. Flores de vaginose	38
iv. Flores de type IV et autres.....	40
b. Description des bactéries associées aux flores annexes.....	41
c. Description des bactéries anaérobies cultivables et de la diversité bactérienne	42
4. Analyse du microbiote associé au portage de <i>Streptococcus agalactiae</i>	43
a. Association entre le portage de <i>S. agalactiae</i> et le type de flore.....	43
b. Association entre le portage de <i>S. agalactiae</i> et la présence de leucocytes à l'examen direct	44
c. Association entre le portage de <i>S. agalactiae</i> et la présence de bactéries anaérobies en culture ..	45
5. Comparaison des résultats de la culture à ceux obtenus en NGS.....	45
Partie D : Discussion	48
Bibliographie	57
Annexes.....	61

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
BHE	Barrière hémato-encéphalique
CC	Complexe clonal
CDC	<i>Center for disease control and prevention</i>
CHRU	Centre hospitalier régional universitaire
CNGOF	Collège national des gynécologues et obstétriciens français
CNR	Centre national de référence
CST	<i>Community state type</i>
ED	Examen direct
FV	Flore vaginale
GVA	<i>Gardnerella vaginalis</i>
HAS	Haute autorité de santé
IGH	Infection génitale haute
IMF	Infection materno-fœtale
INP	Infection néonatale précoce
Inserm	Institut national de la santé et de la recherche médicale
INT	Infection néonatale tardive
IST	Infection sexuellement transmissible
LAMP	<i>Loop mediated isothermal amplification</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization Time of flight</i>
MAP	Menace d'accouchement prématuré
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PBV	Produits biothérapeutiques vivants
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Potentiel hydrogène
PSM	Poste de sécurité microbiologique
RPM	Rupture prématurée des membranes
SA	Semaines d'aménorrhées
SAG	<i>Streptococcus agalactiae</i>
ST	<i>Sequence type</i>
UFC	Unité formant colonie
VB	Vaginose bactérienne
WGS	<i>Whole genome sequencing</i>

Liste des figures

Figure 1 : Représentation de la répartition des CST (en %) selon l'origine ethnique. L'effectif de chaque groupe est précisé entre parenthèses - D'après Ravel et al. 2011 (1).....	14
Figure 2 : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technique MALDI-TOF - D'après Gravet et al. 2013 (46)	28
Figure 3 : Représentation de la concordance entre l'examen direct des prélèvements vaginaux et la culture associée (n=70).....	32
Figure 4 : Représentation de la répartition des différents types de flore (n=70).....	33
Figure 5 : Prélèvement n°68, exemple de flore normale.....	34
Figure 6 : Histogramme représentant la répartition des espèces prédominantes de <i>Lactobacillus</i> au sein des flores normales (n=49).....	35
Figure 7 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores normales (n=49).....	35
Figure 8 : Prélèvement n°169, exemple de flore intermédiaire	36
Figure 9 : Histogramme représentant la répartition des différentes espèces de <i>Lactobacillus</i> au sein des flores intermédiaires (n=10).....	36
Figure 10 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores intermédiaires (n=10)	37
Figure 11 : Prélèvement n°112, exemple de flore de vaginose	38
Figure 12 : Histogramme représentant la répartition de <i>Gardnerella</i> spp. au sein des flores de vaginose (n=9).....	38
Figure 13 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores de vaginose (n=9).....	39
Figure 14 : Prélèvement n°104, exemple d'un autre type de flore	40
Figure 15 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores de type IV et autres (n=2)	40
Figure 16 : Représentation de la répartition des bactéries de la flore cutanée dans les prélèvements vaginaux (n=70)	41
Figure 17 : Histogramme représentant le nombre de prélèvements vaginaux présentant une prolifération de bactéries anaérobies en culture, en fonction des espèces de <i>Lactobacillus</i> prédominantes dans la flore (n=14)	42
Figure 18 : Histogramme représentant la répartition des prélèvements vaginaux au sein de chaque type de flore, chez les populations de femmes porteuses et non porteuses de <i>S. agalactiae</i> (n=70)	43
Figure 19 : Histogramme représentant le pourcentage de portage simple ou multiple de <i>Lactobacillus</i> spp. au sein des populations de femmes porteuses et non porteuses de <i>S. agalactiae</i> (n=70).....	44
Figure 20 : Histogramme représentant la proportion relative des espèces bactériennes identifiées en NGS	47
Figure 21 : Représentation de la famille des <i>Bifidobacteriaceae</i> sous forme d'arbre phylogénique - D'après Lugli et al. 2017 (48)	51
Figure 22 : Représentation des différents mécanismes de développement de vaginoses bactériennes - D'après France et al. 2022 (11)	53
Figure 23 : Diversité génétique de <i>Lactobacillus crispatus</i> - D'après Ravel 2024.....	54
Figure 24 : Réponses des différents hôtes en fonction de la formule des PBV-d'après Ravel 2024	55

Liste des tableaux

Tableau I : Classification de Spiegel - (4).....	11
Tableau II : Score de Nugent - (5)	11
Tableau III : Score d'Ison-Hay - (6)	12
Tableau IV : Semi-quantification à partir de l'examen microscopique.....	28

Liste des annexes

Tableau V : Tableau des résultats	61
Tableau VI : Tableau des espèces identifiées	62

Partie A : Généralités

1. Généralités sur le microbiote vaginal

Le microbiote est défini comme un ensemble de diverses bactéries, virus et champignons entretenant une relation mutualiste avec leur hôte, c'est-à-dire une relation à bénéfices réciproques. Chez l'Homme, de nombreuses équipes de recherche tentent de décrire et de comprendre le rôle et l'implication en pathogénie des différents microbiotes. Ce travail s'intéresse en particulier au microbiote vaginal, ou flore vaginale (FV). Cette entité désigne l'ensemble des microorganismes colonisant les voies génitales basses féminines, autrement dit, la cavité vaginale. Chez les femmes en âge de procréer, le genre *Lactobacillus*, décrit pour la première fois en 1892 par le gynécologue allemand Albert Döderlein, est la bactérie commensale majoritaire de la flore vaginale dite normale (ou flore de Döderlein). Chez ces femmes, on retrouve en moyenne 10^6 à 10^8 *Lactobacillus* spp. par gramme de sécrétion vaginale. Les autres genres bactériens sont nettement moins abondants, à raison de 10^4 bactéries par gramme de sécrétion vaginale (1).

2. Méthodes d'étude du microbiote vaginal

a. Bactériologie standard

Au laboratoire de bactériologie, l'étude de la FV à partir d'un écouvillon vaginal s'effectue en routine par la méthode conventionnelle faisant intervenir un examen direct associé à une culture bactérienne. L'examen direct consiste à observer au microscope une lame étalée à partir de l'écouvillon et colorée par la coloration de Gram, inventée en 1884 par Hans Christian Gram, un bactériologiste danois (2). L'observation microscopique permet d'évaluer la qualité du prélèvement par la présence de cellules épithéliales, mais aussi de détecter la présence de leucocytes pouvant être le reflet d'une inflammation locale (déséquilibre majeur, infections sexuellement transmissibles, vaginite, etc.), ainsi que d'évaluer l'équilibre de la flore. Des scores et classifications ont été créés pour uniformiser sa lecture. La première classification prenant en compte la coloration de Gram a été énoncée par Amsel et al. en 1983, dans le but de faciliter le diagnostic d'une vaginose bactérienne. Celui-ci reposait sur la présence d'au moins 3 critères parmi les suivants : écoulement blanc à jaune homogène ; présence de *Clue cells* à la coloration de Gram ; pH des sécrétions vaginales supérieur à 4,5 ; odeur caractéristique d'amine lors du contact entre les sécrétions vaginales et l'hydroxyde de potassium (3). Les *Clue cells* correspondent à des cellules épithéliales recouvertes de bactéries anaérobies, en particulier de *Gardnerella*.

La même année, la classification de Spiegel basée uniquement sur la lecture du Gram a catégorisé la flore vaginale en 3 grades (Tableau I)(4).

Tableau I : Classification de Spiegel - (4,5)

Classification de Spiegel		
Grade	Observations à la coloration de Gram	Interprétation
Grade 1	Prédominance de <i>Lactobacillus</i> spp.	Flore normale
Grade 2	Équilibre de <i>Lactobacillus</i> spp. et d'autres morphotypes	Flore intermédiaire
Grade 3	Disparition ou rares <i>Lactobacillus</i> spp. et prolifération des autres morphotypes	Flore de vaginose

En 1991, le score de Nugent, dérivé de la classification de Spiegel, a permis une lecture plus fine de la coloration de Gram à partir des sécrétions vaginales (Tableau II)(6).

Tableau II : Score de Nugent - (5,6)

Score de Nugent			
Score	<i>Lactobacillus</i> spp.	Bacilles à Gram négatif polymorphes	<i>Mobiluncus</i> spp.
0	≥ 30 bactéries/champ	Absence	Absence
1	5 à 29 bactéries/champ	≤ 1 bactérie/champ	1 à 4 bactéries/champ
2	1 à 4 bactéries/champ	1 à 4 bactéries/champ	≥ 5 bactéries/champ
3	≤ 1 bactérie/champ	5 à 29 bactéries/champ	-
4	Absence	≥ 30 bactéries/champ	-

Le score obtenu oriente vers l'un des trois principaux types de flore. Une flore normale (score de Nugent de 0 à 3) est caractérisée par une prédominance de *Lactobacillus* spp. Une flore intermédiaire (score de Nugent de 4 à 6) est composée d'une association de *Lactobacillus* spp. et d'autres morphotypes bactériens variés en quantités équivalentes. Enfin, une flore de vaginose (score de Nugent de 7 à 10) est caractérisée par la prédominance de bactéries anaérobies de type *Gardnerella vaginalis* (GVA), *Mobiluncus* spp., *Atopobium* spp., *Megasphaera* spp., *Dialister* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Anaerococcus* spp. etc. (6). Le score de Nugent est aujourd'hui considéré comme le score de référence, mais reste peu utilisé en routine, du fait de sa complexité de mise en œuvre.

Le score d'Ison et Hay, apparu en 2002, est plus simple et permet une utilisation en routine au laboratoire (Tableau III). Il propose 5 catégories de FV, basées sur l'observation des sécrétions vaginales colorées au Gram (7).

Tableau III : Score d'Ison-Hay - (5,7)

Score d'Ison et Hay		
Grade	Observations à la coloration de Gram	Interprétation
0	Présence de cellules épithéliales et absence de bactéries	-
I	Présence uniquement de <i>Lactobacillus</i> spp.	Flore normale
II	Présence réduite de <i>Lactobacillus</i> spp. associée à d'autres morphotypes bactériens	Flore intermédiaire
III	Absence ou rares <i>Lactobacillus</i> spp. associée à une prédominance d'autres morphotypes bactériens	Vaginose bactérienne
IV	Présence de cellules épithéliales et de cocci à Gram positif seulement	-

La vaginose bactérienne (VB) se définit comme une dysbiose, un déséquilibre de flore conduisant à une prolifération de bactéries anaérobies, une augmentation du pH local et une importante desquamation de l'épithélium vaginal. Elle a été décrite pour la première fois par Gardner et Dukes qui ont identifié la bactérie *Gardnerella vaginalis* et ont fait le lien avec la présentation clinique marquée par des pertes vaginales abondantes et malodorantes (8). La disparition totale de la flore de Döderlein est un paramètre inconstant dans la VB, de même que la présence de *Clue cells* à l'examen direct. En revanche, ces *Clue cells* sont pathognomoniques de la VB lorsqu'elles sont présentes.

En parallèle de l'évaluation de la flore par l'examen direct, une culture bactérienne sur milieux gélosés est systématiquement réalisée en routine. Les écouvillons vaginaux sont ensemencés en quadrants sur différents milieux, puis incubés sous diverses atmosphères, pendant 24 à 48 heures. La combinaison des résultats obtenus en culture sur les différents milieux permet la détection de pathogènes, mais également une estimation de l'équilibre de flore.

L'approche conventionnelle est à ce jour la méthode de référence pour l'analyse de routine des prélèvements vaginaux. Dans certaines équipes de recherche, la culture bactérienne est utilisée de manière étendue en parallèle des nouvelles techniques de biologie moléculaire dans le cadre de la description de microbiotes complexes, sous le nom de « culturomique ».

b. Culturomique

Le terme « culturomique » a été utilisé pour la première fois par des chercheurs français pour désigner une nouvelle méthode d'étude des microbiotes complexes, comme notamment le microbiote vaginal. Les échantillons complexes sont mis en culture sur de nombreux milieux différents avec une multitude de conditions de culture (de quelques dizaines à plus de 200 selon les échantillons). Les colonies obtenues sont ensuite identifiées

par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF et en cas d'échec, par un séquençage du gène codant l'ARN 16S ribosomal. Cette méthode a permis la découverte de nombreuses espèces bactériennes. La culturomique a été développée dans les années 2010 à partir du microbiote digestif, en vue de s'affranchir de certains biais des techniques de métagénomique comme par exemple le choix des amorces ou encore l'incapacité à détecter des microorganismes en faibles quantités (9,10).

Cette nouvelle méthode d'étude des microbiotes est tout à fait complémentaire des nouvelles techniques de biologie moléculaire. En effet, sur des prélèvements analysés de manière concomitante par les deux techniques, seulement 15 % des espèces détectées étaient concordantes (10).

La culturomique demeure cependant une technique marginale. Le développement des techniques de séquençage haut débit, moins longues et moins fastidieuses, ont ouvert de nouvelles perspectives dans l'étude des microbiotes complexes ; notamment par la mise en évidence d'espèces bactériennes non cultivables ou mal détectées en culture.

c. Séquençage haut débit

Le séquençage haut débit, ou *Next generation sequencing* (NGS), est une méthode utilisée en bactériologie depuis les années 2010. Ces techniques coûteuses permettent notamment de mieux décrire et de mieux comprendre le microbiote vaginal. A l'inverse du séquençage par technique Sanger qui ne permet l'analyse que d'échantillons monomicrobiens en ciblant un gène particulier, les différentes technologies NGS telles que celles développées par Nanopore® ou Illumina®, permettent l'étude d'échantillons polymicrobiens, et donc l'analyse du microbiote vaginal directement à partir de l'échantillon. On répertorie deux grands axes d'utilisation du séquençage haut débit : le séquençage ciblé et le séquençage non ciblé. En bactériologie, le NGS ciblé, ou métagénomique ciblée, est basé sur l'extraction, l'amplification, puis le séquençage du gène codant l'ARN ribosomal 16S, commun à tous les genres bactériens. Cette méthode permet d'identifier la ou les espèce(s) bactérienne(s) présente(s) dans l'échantillon ainsi que de décrire leur abondance relative, les unes par rapport aux autres.

En parallèle, le séquençage non ciblé, appelé métagénomique *shotgun* est basé sur un séquençage complet de toutes les séquences d'acides nucléiques, ADN et ARN, présentes dans l'échantillon. Cela permet de s'affranchir du biais introduit par l'utilisation d'amorces spécifiques de l'ADNr 16S et ainsi d'être plus exhaustif en ne se limitant pas à la mise en évidence de génomes bactériens. Le séquençage *shotgun* comprend une étape d'amplification minime, utile pour conserver les proportions entre les différents micro-organismes de l'échantillon. Pour les prélèvements d'origine humaine, cela implique un traitement des données en post-analytique visant à exclure le génome humain pour ne conserver que le génome exogène. Cette méthode d'analyse entraîne la gestion de grandes quantités de données, comprenant des analyses bio-informatiques et une capacité de stockage massive, ce qui en fait une technique extrêmement coûteuse.

Dès 2011, une étude américaine faisant intervenir du séquençage ciblé sur le gène codant l'ARNr 16S et incluant près de 400 femmes, propose une nouvelle méthode de description du microbiote vaginal (1). En effet, la notion de communautés bactériennes vaginales, appelées *Community State Type* (CST) est ainsi décrite. Les auteurs recensent cinq CST, définis comme un ensemble de bactéries d'abondance variable, présentant des cooccurrences préférentielles et étant dominés par une espèce. Par exemple, le CST I est caractérisé par une large prédominance de *Lactobacillus crispatus* au sein de la flore. De la même façon, les CST II, III et V sont dominés respectivement par *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* et *Lactobacillus jensenii*. En revanche, le CST IV est constitué de diverses bactéries sans réelle prédominance. Ce dernier groupe comprend surtout des bactéries anaérobies variées telles que des *Atopobium* spp., *Prevotella* spp., *Fingoldia* spp., etc... Des sous-types au sein des CST ont également été répertoriés pour permettre une meilleure classification des différentes flores vaginales, en particulier pour le CST IV qui présente une grande variété bactérienne (1,11).

Dans cette même étude, l'équipe suggère que la prévalence vaginale du genre *Prevotella* spp. serait sous-estimée en bactériologie standard alors que les nouvelles méthodes de biologie moléculaire décriraient mieux la diversité bactérienne, notamment des anaérobies. En effet, l'utilisation du séquençage haut débit, a permis de montrer que presque 70 % des femmes de l'étude sont porteuses de *Prevotella* spp. au niveau vaginal, à des niveaux d'abondance différents.

En parallèle, cette étude présente la répartition des 5 CST selon les origines ethniques des patientes, mettant en avant des différences notables. Au sein de la population caucasienne, le CST majoritaire est le type I, dominé par *L. crispatus* alors que dans la population asiatique, le CST le plus répandu est le type III dominé par *L. iners*. Les populations africaines et hispaniques présentent aussi majoritairement un CST III ou un CST IV (Figure 1)(1).

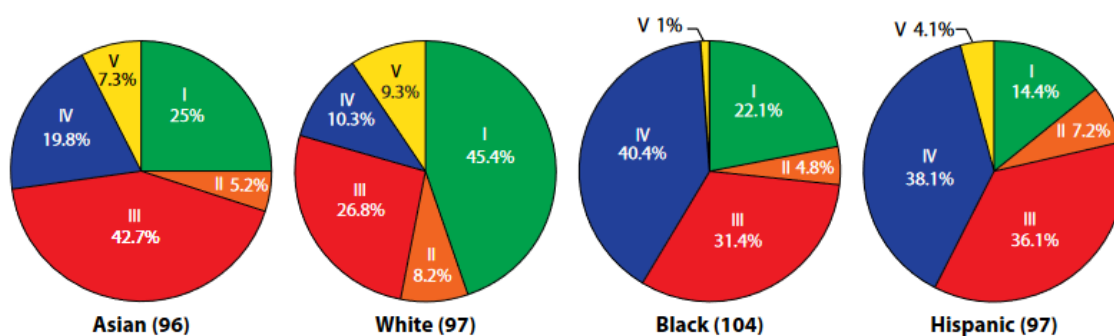


Figure 1 : Représentation de la répartition des CST (en %) selon l'origine ethnique. L'effectif de chaque groupe est précisé entre parenthèses - D'après Ravel et al. 2011 (1)

En dehors des variations liées à l'origine ethnique, il a également été démontré que la FV variait selon l'âge, les facteurs hormonaux (grossesse, ménopause...), l'environnement, l'hygiène, les pratiques sexuelles ou même certains facteurs héréditaires. Cependant, nos connaissances actuelles à ce sujet restent partielles (12).

3. Caractéristiques des principaux types de microbiote vaginal

a. Rôle protecteur des *Lactobacillus*

Les *Lactobacillus* sont des bacilles à Gram positif anaérobies préférentiels. La plupart des espèces de *Lactobacillus* présentes dans la flore vaginale sont strictement humaines et ont la capacité de fermenter des substrats du micro-environnement vaginal, comme le glycogène produit par les cellules épithéliales vaginales. L'un des produits finals de ce métabolisme est l'acide lactique qui permet le maintien d'un pH acide au niveau vaginal. Deux isomères existent pour ce métabolite, la forme dextrogyre appelée acide D-lactique et la forme lévogyre appelée acide L-lactique. La forme dextrogyre a un pouvoir acidifiant supérieur à la forme lévogyre. Or, les différentes espèces de *Lactobacillus* ont un métabolisme légèrement différent, par conséquent l'acide lactique produit diffère quantitativement et qualitativement. En effet, le pH vaginal des femmes dont le microbiote appartient au CST I est le plus acide (pH moyen = 4), alors que les femmes présentant un CST II, III ou V ont des pH moyens respectifs de 5, 4,4 et 4,7. L'acidité vaginale est un élément limitant majeur de diversité bactérienne, et donc un élément protecteur, propice à une bonne santé gynécologique. Ainsi, la capacité protectrice du microbiote vaginal est variable selon l'espèce de *Lactobacillus* prédominante au sein de la flore. En effet, *Lactobacillus crispatus*, bactérie prédominante du CST I est capable de produire les deux isomères de l'acide lactique. En plus de la production d'acide D-lactique, cette espèce possède une paroi cellulaire épaisse appelée « couche S » qui lui confère une faculté d'adhésion à l'épithélium vaginal, formant une barrière sur les cellules, ainsi que des propriétés immunomodulatrices. Ces éléments permettent au CST I de maintenir une faible diversité globale et par conséquent, d'offrir une meilleure protection contre les agents pathogènes (12,13). Par ailleurs, la population de *Lactobacillus* au sein d'un CST ne représente pas une seule entité, mais une multitude de clones qui présentent une importante diversité génétique au sein de l'espèce. En effet, différents gènes peuvent être exprimés selon les clones. Cette dispersion génétique est un déterminant essentiel de la stabilité du CST et donc du rôle protecteur (12).

b. Variations et dynamique de la flore vaginale

La composition de la flore vaginale varie avec l'âge, le cycle menstruel, les rapports sexuels non protégés, etc... Ces modifications sont à relier notamment aux variations de pH au niveau vaginal en lien avec certaines situations de modification de la physiologie locale. Au début des menstruations, les facteurs hormonaux notamment un faible taux de progestérone, permettent une fluidification de la glaire cervicale qui se répand dans la cavité vaginale, de même que le sang provenant de la desquamation utérine, entraînant alors une légère augmentation globale du pH local et par conséquent une diversification des communautés bactériennes. Dans le cas de rapports sexuels non protégés, le sperme engendre d'une part une augmentation du pH local et d'autre part introduit des espèces bactériennes extérieures au niveau vaginal (12). Cette combinaison de facteurs explique que la composition de la flore vaginale varie régulièrement, en fonction de nombreux éléments extérieurs.

Les variations de CST sont donc en partie causées par les facteurs liés à l'hôte, mais également par des facteurs bactériens. Il existe des interactions compétitives entre les différents membres d'une communauté bactérienne, notamment par la production de bactériocines qui inhibent la croissance des bactéries concurrentes, les variations génétiques aléatoires, et la capacité à résister aux bactériophages de l'environnement. L'équilibre résultant de l'accumulation de ces facteurs est dynamique ; les espèces bactériennes dominantes et par conséquent les CST changent chez une même femme au cours du temps (12).

D'autre part, *Lactobacillus iners*, prédominant au sein du CST III, produit seulement l'isomère lévogyre de l'acide lactique, qui possède un plus faible pouvoir acidifiant. De plus, contrairement aux espèces *L. crispatus*, *L. gasseri* et *L. jensenii*, l'espèce *L. iners* est incapable de produire du peroxyde d'hydrogène, qui est une substance inhibitrice de la croissance des bactéries concurrentes (14). Ainsi, *Lactobacillus iners*, a un rôle protecteur suboptimal. Une association statistiquement significative entre une consommation réduite de produits laitiers et l'appartenance au CST III a par ailleurs été démontré par une équipe brésilienne (14). De la même manière, il existerait une corrélation positive avec le nombre de partenaires sexuels et avec une faible utilisation du préservatif sans lien de causalité prouvé. En comparaison avec *L. crispatus*, *L. iners* possède un génome de petite taille, ce qui lui confère une diversité génétique globale plus faible et expliquant ses limites à maintenir un pH plus acide. Les microbiotes vaginaux classés en CST III sont alors les moins stables dans le temps et ont une tendance à se déplacer fréquemment vers le CST IV, constitué de bactéries diverses majoritairement anaérobies. De plus, à la coloration de Gram, *L. iners* adopte parfois une conformation cocco-bacillaire, pouvant aisément être confondu avec le genre *Gardnerella*, généralement présent dans le CST IV et impliqué dans la vaginose bactérienne. À l'inverse, les autres espèces de *Lactobacillus* possèdent un peptidoglycane plus épais que celui de *L. iners* et apparaissent au Gram sous forme de bacilles épais et longs. Les examens directs d'une flore vaginale de CST III et d'une vaginose bactérienne ne sont donc pas toujours évidents à différencier. On peut d'ailleurs noter qu'il existe une association positive entre appartenance au CST III et antécédent de vaginose bactérienne (14).

c. Microbiotes pauvres en *Lactobacillus*

Un microbiote vaginal non dominé par des *Lactobacillus* spp. est considéré comme un microbiote déséquilibré. Cependant, certaines flores vaginales dites déséquilibrées ne sont pas pour autant pathologiques. Par exemple, chez les jeunes filles prépubères, l'épithélium vaginal est plus fin que celui des femmes en âge de procréer. Cet épithélium est aussi moins riche en glycogène, donc moins propice au développement de la flore de Döderlein (12). Il en est de même pour certaines femmes ménopausées qui subissent des modifications hormonales avec une réduction des taux d'œstrogènes circulants, entraînant une modification de l'épithélium vaginal, une atrophie vaginale, et donc une diminution de la production de glycogène. Leur cavité vaginale est alors colonisée progressivement par des bactéries de la flore de proximité majoritairement digestive avec notamment des entérobactéries et des anaérobies, mais aussi par des bactéries de la flore cutanée.

En dehors des quatre CST (I, II, III et V) dominés par une espèce de *Lactobacillus*, le CST IV est le seul caractérisé par une disparition ou une faible abondance de *Lactobacillus* associée à une prolifération d'autres bactéries telles que les anaérobies qui sont parfois difficilement ou non cultivables. En lien avec sa diversité importante, le CST IV présente une sous-classification plus large. Le CST IV-A présente une forte proportion de *Gardnerella vaginalis* ainsi que du *Candidatus Lachnocurva vaginae* (anciennement BVAB1). Le sous-groupe B est associé à une abondance relative élevée ou modérée de *G. vaginalis* et d'*Atopobium vaginae* tandis que le sous-groupe C est lui-même réparti en CST IV-C0 riche en *Prevotella* spp., C1 dominé par du *Streptococcus* spp., C2 par de l'*Enterococcus* spp., C3 par du *Bifidobacterium* spp. et enfin C4 par du *Staphylococcus* spp. Les FV classées à la coloration de Gram *via* le score de Nugent en tant que flores déséquilibrées (score de 7 à 10) correspondent généralement aux CST IV A et B en particulier et sont caractérisées comme des flores de vaginoses bactériennes (1,11).

La relation entre une partie des CST IV et la vaginose bactérienne est étroite, notamment en termes de population bactérienne et de pH (pH moyen de 5,3 dans le CST IV). La vaginose bactérienne symptomatique se décrit cliniquement par l'apparition de démangeaisons, d'une irritation vaginale, de brûlures mictionnelles et par des leucorrhées malodorantes, tandis qu'il n'existe aucune définition clinique associée aux flores vaginales appartenant au CST IV. Dans les populations africaines et asiatiques principalement, le CST IV est fortement prévalent (environ 50 %), notamment chez les femmes asymptomatiques et en bonne santé (13). Une femme présentant une flore de CST IV peut donc être asymptomatique ou symptomatique, auquel cas, elle pourrait correspondre à la définition de la vaginose bactérienne. Le passage d'une flore de CST IV asymptomatique à une VB pourrait être vu comme un continuum plutôt que comme une rupture d'un état sain à un état pathologique. Certains points restent à élucider, comme l'existence potentielle de sous-types de CST IV évoluant préférentiellement vers la vaginose bactérienne.

Par ailleurs, le genre *Prevotella* spp., caractéristique du CST de sous-type IV-C0, favoriserait la croissance de *G. vaginalis* et de *Peptostreptococcus anaerobius* par production de nutriments nécessaires à leur développement (1). Or, ce sont des bactéries largement mises en évidence dans des VB symptomatiques. À l'échelle mondiale, un quart des femmes en âge de procréer ont une VB biologique et beaucoup d'entre elles sont asymptomatiques (15). Aucun consensus n'existe sur la nécessité de traiter des VB asymptomatiques. Le traitement actuel de la vaginose est un antibiotique, en général le métronidazole, qui ne permet pas l'obtention d'une réponse durable la plupart du temps. En vue d'éviter les récives, une réorientation du microbiote vaginal des femmes atteintes, vers un CST plus stable, dominé par des *Lactobacillus* spp. qui maintiennent une faible diversité bactérienne, serait probablement préférable.

4. Rôle du microbiote vaginal au cours de la grossesse

a. Grossesse physiologique

Au cours de la grossesse, le rôle protecteur du microbiote vaginal de la femme prend une importance majeure. Les *Lactobacillus* maintiennent une faible diversité bactérienne et inhibent le développement d'agents pathogènes, jouant un rôle de barrière physique pour assurer la protection du fœtus. Ce rôle protecteur se renforce de manière physiologique pendant la grossesse, notamment grâce à des modifications hormonales qui entraînent un changement de composition de la flore vaginale avec une domination accrue des *Lactobacillus* (13). En effet, une prévalence significativement plus élevée des CST I, II, III et V, dominés respectivement par *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* et *L. jensenii* chez les femmes enceintes a été mise en évidence (16).

À partir de la 24^e semaine de grossesse, le microbiote vaginal se modifie une seconde fois, de manière progressive jusqu'à l'accouchement. Une augmentation de la diversité bactérienne globale survient, associée à une diminution des *Lactobacillus* (17). Lors de la naissance par voie basse, le nouveau-né se colonise pour la première fois au niveau buccal, intestinal et respiratoire avec les bactéries vaginales et digestives de sa mère, par ingestion et inhalation lors du passage de la filière génitale. Cette modification tardive de la composition en bactéries de la flore vaginale chez les femmes enceintes, est probablement une aide à la colonisation des cavités du nouveau-né (13). Certains auteurs suggèrent que ces changements d'équilibre de flore proviennent de modifications hormonales, mais aussi de fluctuations au sein du système immunitaire avec une production variable de cytokines pro-inflammatoires, au cours de la grossesse (17).

b. Grossesse pathologique

i. Prématuration

La prématurité est définie par une naissance à un terme inférieur à 37 semaines d'aménorrhée (SA) pour un terme normal à 41 SA. On distingue trois niveaux de prématurité que sont la prématurité moyenne entre 32 et 36 SA révolues, la grande prématurité entre 28 et 32 SA et enfin la très grande prématurité avant 28 SA. Aucune naissance viable n'a été décrite avant 22 SA. Les naissances prématurées représentent environ 11 % des naissances dans le monde et 6,9 % des naissances vivantes en France sur la période 2015-2019, soit environ 55 000 naissances par an (18,19). La prématurité est une cause importante de morbi-mortalité infantile. En France, deux tiers des décès infantiles sont recensés chez des nouveau-nés prématurés. Néanmoins, la répartition de ces décès est visiblement dépendante du terme, avec la grande majorité (60 à 70 %) chez les très grands prématurés et moins de 1 % pour les naissances entre 35 et 36 SA. Soixante-dix pour cent des naissances pré-terme sont spontanées et largement dues à une cause infectieuse, les autres étant provoquées sur décision médicale.

Cependant, la compréhension des causes de prématurité reste insuffisante à ce jour. Une vaginose bactérienne en début de grossesse est statistiquement reliée à l'apparition de complications obstétricales et d'accouchements pré-terme. Depuis plusieurs dizaines d'années, des publications évoquent un risque globalement deux fois supérieur chez les femmes enceintes présentant une VB par rapport aux femmes enceintes non atteintes par

cette affection (20,21). En effet, dans une cohorte française, la prévalence de la VB était plus élevée en début qu'en fin de grossesse et 30 à 60 % d'entre elles étaient spontanément résolutive (21). À l'inverse, moins de 10 % des femmes enceintes ayant une flore vaginale normale en début de grossesse développaient une vaginose en fin de grossesse. Le mécanisme par lequel une VB conduit à un accouchement prématuré est partiellement élucidé. En effet, cette affection qui est associée à un pH vaginal supérieur à 4,5 engendre un environnement local moins stable et moins protecteur, donc un risque accru d'infections sexuellement transmissibles, mais aussi d'infections génitales hautes, de ruptures prématurées des membranes (RPM), de chorioamniotites, etc... Cet ensemble d'éléments implique un risque accru de naissance prématurée.

Les implications obstétricales de la vaginose bactérienne ne sont pas négligeables, la prévalence de la vaginose au premier trimestre de grossesse en France étant d'environ 7 % (22). Néanmoins, le dépistage de la VB n'est pas recommandé de manière systématique. Le Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français (CNGOF) recommande une recherche de vaginose en début de grossesse seulement en cas d'antécédent d'accouchement prématuré dans un contexte d'infection materno-fœtale (IMF) bactérienne (23). Ces situations d'accouchement prématuré et d'IMF sont également des complications consécutives à une rupture prématurée des membranes.

Une rupture prématurée des membranes est définie comme une libération de tout ou partie du liquide amniotique dans lequel baigne le fœtus, avant le début du travail. Le terme « prématurée » se réfère au délai d'apparition par rapport au début du travail et non à l'âge gestationnel. On différencie tout de même les RPM pré-terme qui surviennent entre 14 et 37 SA, des RPM à terme à partir de 37 SA. La majorité des RPM (60 à 80 %) surviennent à terme (24). Néanmoins, la RPM pré-terme est une complication obstétricale qui touche 5 à 10 % des grossesses et précède 20 à 40 % des naissances prématurées (25). Cet événement augmente le risque secondaire de position anormale du fœtus, de décollement placentaire, mais aussi d'infections intra-amniotique et d'infections fœtales (26). La rupture des membranes entourant le fœtus que sont l'amnios et le chorion, met en continuité la cavité vaginale avec la cavité amniotique. Une contamination des membranes ainsi que du liquide amniotique, voire du fœtus, peut survenir par voie ascendante depuis le vagin. Les infections induites par une RPM sont variées :

- L'infection materno-fœtale est définie comme une infection néonatale mettant en jeu un ou plusieurs germe(s) transmis par la mère. Cette dernière ne présente pas systématiquement de signes cliniques, car le germe transmis n'est pas toujours pathogène pour la mère.
- La chorioamniotite est un type d'infection materno-fœtale touchant le placenta et les membranes contenant le liquide amniotique. Cette entité clinique concerne à la fois la mère qui peut présenter un syndrome inflammatoire et/ou une fièvre, et le fœtus, se manifestant par une tachycardie fœtale notamment.
- L'endométrite est une infection de l'endomètre en *post-partum*, qui se développe consécutivement à une contamination de l'endomètre au moment de l'accouchement. Il s'agit d'une infection maternelle uniquement.

Le risque infectieux lors d'une RPM est variable en fonction de l'âge gestationnel et du délai entre la survenue de la RPM et le début du travail. Par exemple, dans une étude menée en 2017 au Maroc, le développement d'une chorioamniotite représente 5 % des RPM à terme contre 20 % des RPM entre 26 et 35 SA et jusqu'à plus de 40 % des RPM survenant avant 24 SA (26). Le risque d'infection materno-fœtale est donc inversement proportionnel à l'âge gestationnel. De plus, le risque infectieux pour la femme et son fœtus est majoré lorsque le travail ne débute pas dans les 18 heures après la rupture des membranes, d'où l'importance de déclencher le travail lors d'une RPM à terme (26). Dans le contexte de RPM pré-terme, le travail est retardé pour cause d'immaturité fœtale. Cette complication entraîne la mise au repos de la femme ainsi qu'une hospitalisation pour effectuer une surveillance rapprochée, avec détection des éventuels signes précoces d'infection comme une fièvre, des pertes vaginales malodorantes ou des douleurs abdominales qui entraîneront le déclenchement du travail par l'équipe médicale. Dans ce cas, des complications néonatales peuvent survenir en lien avec l'immaturité du fœtus au moment de la naissance, telles qu'une insuffisance respiratoire, des convulsions, des troubles neurologiques associés ou non à une infection materno-fœtale. Il est recommandé de traiter les nouveau-nés symptomatiques par une antibiothérapie probabiliste constituée d'amoxicilline associée à un aminoside, et additionnée d'une céphalosporine de 3^e génération s'il existe des critères de gravité (27). L'administration d'antibiotiques chez la femme enceinte présentant une RPM est discutable et variable selon les pratiques usuelles des centres hospitaliers. En effet, le risque d'IMF est non négligeable même lorsque la femme ne présente aucun signe d'infection. L'OMS (Organisation mondiale de la santé) recommande tout de même l'administration d'un antibiotique à visée prophylactique, de préférence de l'érythromycine, chez les femmes présentant une RPM pré-terme (25).

La menace d'accouchement prématuré (MAP) est une entité clinique différente de la RPM. Il s'agit d'une association de modifications cervicales (dilatation, longueur du col...) et de contractions régulières et douloureuses, survenant entre 22 et 36 SA et 6 jours. En l'absence d'intervention médicale, ce phénomène conduit à un accouchement prématuré. C'est la première cause d'hospitalisation pendant la grossesse (28).

ii. Portage de bactéries pathogènes

Les bactéries en cause dans les infections associées aux RPM sont le plus souvent des bactéries de la flore vaginale qui possèdent un pouvoir pathogène chez le fœtus, telles que *Streptococcus agalactiae* détaillé ultérieurement, ou *Escherichia coli*, en particulier les souches de sérotype K1. D'autres bactéries parfois retrouvées au sein de la FV comme *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et les streptocoques bêta-hémolytiques tels que *Streptococcus pyogenes* ou *Streptococcus dysgalactiae* sont parfois impliquées. De manière beaucoup plus marginale, des anaérobies stricts tels que des *Bacteroides* du groupe *fragilis*, d'autres bacilles à Gram négatif ou encore *Streptococcus pneumoniae* peuvent être en cause (29).

L'interprétation d'une culture issue d'un prélèvement vaginal devient plus complexe lorsque ces bactéries opportunistes sont mises en évidence. Il s'agit de bactéries pouvant appartenir à la flore vaginale normale, mais potentiellement responsables d'infections génitales hautes (IGH) et d'infections materno-fœtales. Les deux principales bactéries à haut risque en contexte de grossesse sont *Streptococcus agalactiae* et *Escherichia coli*. Les situations particulièrement à risque d'infection sont les RPM, les MAP, mais aussi la VB qui crée un environnement vaginal moins protecteur et permet l'ascension des bactéries potentiellement pathogènes jusqu'aux voies génitales hautes. *Escherichia coli*, en particulier de sérotype K1, est une entérobactérie à risque d'infection invasive chez le fœtus et le nouveau-né, responsable de bactériémies associées parfois à des méningites. D'autres bactéries sont moins fréquemment retrouvées, mais entraînent plus souvent des complications graves : *Haemophilus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* etc... (29). Par exemple, le portage vaginal ou périnéal de *Streptococcus pyogenes* chez une femme enceinte, peut être à l'origine d'une fièvre du *post-partum* chez la mère (fièvre puerpérale), et potentiellement d'une infection chez le nouveau-né. La présentation clinique, liée à son caractère invasif, est en général une bactériémie, suivie d'un état de choc septique survenant fréquemment chez la mère. De la même manière, *Haemophilus influenzae* et *Haemophilus parainfluenzae* se comportent comme des pathogènes opportunistes parfois responsables de vaginites et d'infections utéro-annexielles et néonatales dans les situations à risque citées précédemment. Cependant, plus de la moitié des endométrites à *Haemophilus spp.* seraient en lien avec la présence d'un dispositif intra-utérin, donc surviendraient en dehors de tout contexte de grossesse (30).

Également, le portage de bactéries strictement pathogènes qui sont essentiellement des bactéries responsables d'infections sexuellement transmissibles, comme *Neisseria gonorrhoeae* ou *Chlamydia trachomatis*, est possible pour tout type de flore vaginale. Ces agents peuvent être à l'origine d'infections génitales hautes. En particulier, *C. trachomatis* est la bactérie la plus fréquemment mise en cause dans les IGH et les grossesses extra-utérines chez la femme jeune. Ces bactéries ont la capacité de passer au niveau des voies génitales hautes par ascension et sont à l'origine d'atteintes de l'endocol (endocervicites), de l'utérus (endométrites), des trompes (salpingites), voire d'abcès tubo-ovariens, pouvant aller jusqu'à la péritonite. La mise en évidence de ces bactéries strictement pathogènes dans un prélèvement vaginal doit mener à un traitement de manière systématique. Chez la femme enceinte, une transmission au nouveau-né est possible lors de l'accouchement, se traduisant par une conjonctivite à inclusions ou une pneumopathie pour *Chlamydia trachomatis*. La conjonctivite du nouveau-né à *Neisseria gonorrhoeae* s'observe très rarement en France depuis la mise en place d'une prophylaxie systématique par collyre à la rifampicine au moment de la naissance (31).

Enfin, quelques bactéries peuvent se comporter comme des pathogènes lorsqu'elles colonisent la flore vaginale sans que l'on connaisse réellement leur impact sur le fœtus lors d'une grossesse. Par exemple, *Mycoplasma genitalium* est une bactérie intracellulaire, non cultivable sur des milieux classiques, considérée comme pathogène et responsable d'infections génitales hautes. Néanmoins, le portage de *M. genitalium* n'est pas toujours symptomatique. De plus, il est classique de mettre en évidence cette bactérie chez une femme présentant une vaginose bactérienne. Dans ce contexte, la symptomatologie est difficilement imputable directement à *M. genitalium*. De manière empirique, le portage

vaginal de mycoplasmes génitaux et d'autres intracellulaires comme *Ureaplasma* spp. est associé à une augmentation des naissances prématurées, des RPM et des endométrites du *post-partum*. Cependant, aucun lien statistique n'est prouvé (13,31).

En parallèle, *Streptococcus agalactiae* possède un statut particulier parmi les bactéries à haut risque d'IMF. Contrairement aux bactéries citées précédemment, un dépistage du portage vaginal de *S. agalactiae* est effectué de manière systématique lors d'une grossesse en France.

5. Dépistage systématique de *Streptococcus agalactiae* chez la femme enceinte

a. Généralités sur *S. agalactiae*

Streptococcus agalactiae est une bactérie se présentant sous forme de diplocoques ou courtes chaînettes à Gram positif. Elle est immobile, ne possède pas de catalase et peut produire un pigment orange appelé granadaene. En culture, cette bactérie exigeante anaérobie préférentielle forme des colonies bombées de taille moyenne, blanches brillantes, entourées d'une zone étroite d'hémolyse complète (ou bêta hémolyse) sur gélose au sang frais. La couleur de la colonie peut parfois virer à l'orangé selon l'expression du pigment. *Streptococcus agalactiae* appartient au groupe B de la classification de Lancefield, classification basée sur la nature antigénique du polysaccharide C de paroi, par technique d'agglutination. L'existence d'une capsule polysaccharidique permet de regrouper les souches de *S. agalactiae* sous 10 sérotypes capsulaires (32–34).

Historiquement, *S. agalactiae* fut nommée « *Streptococcus* de la mammite bovine » par le vétérinaire Edmond Nocard qui décrit pour la première fois cette bactérie comme impliquée dans la mammite chez des vaches laitières. Le nom d'espèce « *agalactiae* » signifiant « absence de lait » est donné en 1896, en lien avec sa responsabilité dans la mammite bovine. Elle est isolée pour la première fois à partir de prélèvements vaginaux par la microbiologiste américaine Rebecca Lancefield et le médecin bactériologiste Ronald Hare dans les années 1930, alors qu'ils étudiaient les agents responsables de fièvre puerpérale. C'est le professeur émérite de maladies infectieuses Théodore Eickhoff qui décrit pour la première fois *S. agalactiae* comme l'un des principaux agents d'infections néonatales dans les années 1970 (32,33).

Aujourd'hui cette bactérie est bien identifiée comme commensale des voies digestives et génito-urinaires de diverses espèces animales et de l'Homme. Elle colonise la cavité vaginale des femmes de manière asymptomatique, chronique ou transitoire. Sa prévalence varie de 6,5 % à 36 % selon les régions du monde, en particulier entre 11 et 21 % en Europe de l'Ouest (35). Elle est également considérée comme un pathogène opportuniste chez les patients aux nombreuses comorbidités et comme un pathogène émergent chez les personnes âgées et les patients immunodéprimés. Son pouvoir pathogène, en dehors des infections materno-fœtales, s'étend des infections urinaires aux infections invasives (bactériémies, infections des tissus mous et infections ostéo-articulaires) (34,36). Certains facteurs de risque d'infections invasives à *S. agalactiae* ont été identifiés, tels que le tabagisme ou certaines pathologies comme le diabète, l'asthme ou encore l'obésité.

b. Physiopathologie

S. agalactiae peut être responsable d'infections materno-fœtales, parfois graves, selon les facteurs de virulence qu'il exprime. En effet, il possède une faculté d'adhérence aux cellules de l'hôte *via* des protéines hydrophobes à sa surface, mais également *via* des pili permettant la fixation aux cellules de la barrière hémato-encéphalique (BHE) de l'hôte. Notamment, le clone hypervirulent ST-17 associé aux formes graves de méningites néonatales tardives à *S. agalactiae*, possède une adhésine hypervirulente HvgA qui participe activement à son passage à travers la BHE (37). De même, la glycoprotéine Srr2 exprimée par ce clone, lui confère une capacité d'adhésion majeure au fibrinogène, limitant ainsi les mécanismes de coagulation et le piégeage de *S. agalactiae* au sein de caillots. L'expression du facteur de virulence Srr2 favorise la dissémination de la bactérie dans l'organisme (33,38). La capacité d'invasion cellulaire dépend également du potentiel de virulence de la souche. Elle met en jeu un mécanisme de transcytose suivie d'une lyse cellulaire par création de pores au sein de la membrane de la cellule hôte (33). L'échappement de la bactérie au système immunitaire provient de plusieurs mécanismes. Certaines protéines bactériennes comme la bêta hémolysine sont capables d'inhiber la réponse immunitaire de l'hôte par fixation des immunoglobulines. La capsule a aussi un rôle de blocage de la voie alterne du complément, et de masquage des protéines de paroi qui sont alors moins propices à être reconnues par le système immunitaire de l'hôte (39).

Les infections néonatales invasives à *Streptococcus agalactiae* constituent la première cause d'IMF bactériennes en France. En effet, d'après le réseau Epibac et Santé Publique France, en 2022, près de 59 nourrissons de moins de 1 an sur 100 000 ont développé une infection invasive à *S. agalactiae* (40). Ces pathologies conduisent à une mortalité importante et à des séquelles neurologiques chez 30 % des patients ayant survécu.

Les infections néonatales à *S. agalactiae* sont réparties en deux catégories : les infections néonatales précoces (INP) et les infections néonatales tardives (INT). Les INP représentent la moitié des infections à *S. agalactiae*. Elles surviennent durant la première semaine de vie du nourrisson, dont 80 % dans les 24 premières heures. La contamination se fait majoritairement par inhalation ou ingestion des sécrétions vaginales contaminées au moment du passage de la filière génitale en *per-partum* et de manière moins fréquente, la contamination peut se faire *in utero* par voie ascendante depuis la cavité vaginale, en particulier dans le cadre d'une RPM. La présentation clinique des INP est généralement une pneumopathie et une détresse respiratoire pouvant se compliquer d'une bactériémie et plus rarement d'une méningite (moins de 10 % des cas d'infections invasives). La porte d'entrée de ces infections serait *a priori* pulmonaire, d'après les connaissances actuelles. Près de la moitié des INP impliquent le sérotype III (41). En parallèle, les INT surviennent entre une semaine et 3 mois de vie. L'expression clinique est principalement une bactériémie sans point d'appel évident, parfois associée à des localisations secondaires, avec en particulier une atteinte méningée, plus fréquente que dans les INP. Le mode de transmission serait similaire à celui des INP mais la physiopathologie n'est pas encore complètement élucidée (32,35). Il s'agirait d'une colonisation digestive persistante qui conduirait à une translocation sanguine. Le sérotype capsulaire III est surreprésenté dans ce type d'infections, en particulier les souches appartenant au complexe clonal hypervirulent CC17 responsables à elles seules de 80 % des méningites à *S. agalactiae* (41).

L'un des éléments d'explication de la physiopathologie pourrait provenir des capacités accrues de colonisation des voies digestives par le CC17 et de sa faculté de franchissement des barrières physiologiques intestinales et hémato-encéphaliques via ses facteurs de virulence HvgA et Srr2 cités précédemment (33,37,38).

En marge des infections néonatales, *Streptococcus agalactiae* est également responsable d'infections maternelles lors de la grossesse et en *post-partum*. Au cours de la grossesse, une contamination par voie ascendante est possible, menant à des infections placentaires et du liquide amniotique. Ces pathologies représentent la moitié des infections de la femme enceinte et touchent à la fois la mère et le fœtus pour qui l'issue peut être une mort fœtale *in utero*. Durant le *post-partum*, des infections graves à *S. agalactiae* peuvent également survenir, telles que des bactériémies ou des endométrites. Les infections maternelles et néonatales graves sont traitées par amoxicilline associée à de la gentamicine dans la plupart des cas (33).

c. Portage et recommandations

Les infections néonatales et maternelles à *S. agalactiae* proviennent d'une contamination à partir des souches colonisant la cavité vaginale des femmes enceintes. Avant les années 1990, un peu plus de 50 % des nouveau-nés de femmes colonisées étaient à leur tour colonisés par *S. agalactiae* et 1 à 2 % d'entre eux développaient une infection invasive (42).

Aujourd'hui en France, un dépistage de la colonisation vaginale par *S. agalactiae* est recommandé chez les femmes enceintes entre 34 et 38 SA. Le portage étant souvent transitoire, il est préférable d'effectuer ce dépistage en fin de grossesse. Il s'effectue *a minima* par culture sur gélose au sang frais, parfois additionnée d'antibiotiques pour rendre le milieu sélectif. Lorsque le dépistage de fin de grossesse est positif, une antibioprophylaxie *per-partum* est administrée de manière systématique. Une bêta-lactamine (pénicilline G ou amoxicilline) est administrée par voie intra veineuse, avec une dose de charge dès le début du travail, suivie d'une dose d'entretien toutes les 4 heures jusqu'à la délivrance. En cas d'allergie aux pénicillines, une antibioprophylaxie par céphalosporine ou par un apparenté aux macrolides comme la clindamycine est aussi possible (29,32). Une antibioprophylaxie *per-partum* est également mise en place dans les situations suivantes :

- ✓ Prélèvement vaginal positif à *S. agalactiae* durant la grossesse
- ✓ Bactériurie à *S. agalactiae* durant la grossesse
- ✓ Antécédent d'infection néonatale à *S. agalactiae* lors d'une précédente grossesse
- ✓ Fièvre > 38°C en *per-partum*
- ✓ RPM supérieure à 12 heures
- ✓ Prématuration spontanée et inexplicite < 37 SA

Ce dépistage est recommandé par le CDC (*Center for disease Control and prevention*) depuis les années 1990 aux États-Unis et par la HAS (Haute Autorité de Santé) en France depuis 2001 (42). Ces mesures de santé publique ont largement contribué à faire diminuer le taux de colonisation des nouveau-nés de 50 % à seulement 2 % ; ainsi que l'incidence des infections néonatales précoces. En effet, les INP représentaient 80 % des infections néonatales avant les années 1990 contre 30 à 50 % aujourd'hui. Le dépistage et les mesures prophylactiques restent néanmoins imparfaits car aucun bénéfice n'a été observé sur l'incidence des infections néonatales tardives (42). De plus, certaines femmes négatives au moment du dépistage se colonisent ultérieurement et n'accèdent pas toujours à l'antibioprophylaxie qui serait alors nécessaire (43). Cependant, le portage est souvent transitoire et intermittent, la femme peut éliminer la bactérie en l'absence d'antibiothérapie et à l'inverse, la bactérie peut recoloniser la cavité vaginale après une antibiothérapie. D'autre part, la HAS ne recommande pas le traitement systématique du portage vaginal asymptomatique de *S. agalactiae* au cours de la grossesse car il ne permet pas de réduire le taux de portage (29). Dans ce contexte, il faut aussi prendre en compte l'écologie bactérienne et le risque d'augmentation des résistances de la bactérie aux antibiotiques. À ce jour en France, aucune souche de *S. agalactiae* de sensibilité diminuée aux bêta-lactamines n'a été répertoriée d'après le Centre National de Référence (CNR) des streptocoques. En revanche, la résistance à la tétracycline touche près de 85 % des souches (44).

Les conditions de portage vaginal de *S. agalactiae*, en particulier chez les femmes enceintes, sont encore mal connues. En 2017, malgré une large cohorte de 432 femmes américaines non enceintes, aucune association significative entre la colonisation vaginale par *S. agalactiae* et la classification en CST de la flore vaginale associée n'a pu être démontrée (45). Il apparaît également que la diversité bactérienne, ou les caractéristiques démographiques des patientes, ne présentent aucun lien significatif avec cette colonisation à *S. agalactiae*. En revanche, une étude égyptienne publiée en 2022 et portant sur 44 femmes enceintes a pu mettre en évidence une relation entre le portage de *S. agalactiae* et une importante diversité bactérienne (46). Les données contradictoires de la littérature justifient l'intérêt d'explorer d'éventuelles particularités de la flore vaginale chez les femmes colonisées par *S. agalactiae*.

6. Objectifs

L'objectif principal de ce travail était d'étudier et de caractériser les communautés bactériennes qui constituent le microbiote vaginal, en lien avec la colonisation par *Streptococcus agalactiae*. En effet, les différentes communautés bactériennes présentes au sein de la flore vaginale sont bien décrites, mais leur lien avec le portage de bactéries responsables d'infections materno-fœtales comme *Streptococcus agalactiae* reste peu connu. Dans un premier temps, ce travail a pour objectif de décrire de la manière la plus exhaustive possible la composition du microbiote vaginal en bactéries cultivables chez des femmes enceintes colonisées par *S. agalactiae* en comparaison à des femmes enceintes non colonisées. Ainsi, le but est de mettre en évidence des différences entre ces deux populations et d'identifier d'éventuels marqueurs ou facteurs jouant un rôle sur la colonisation par *S. agalactiae* au sein de la flore vaginale.

En parallèle, une analyse complémentaire par métagénomique 16S a été réalisée sur une partie des prélèvements. Cette combinaison de techniques offrant une description potentiellement plus exhaustive, en permettant la description de bactéries difficilement ou non cultivables, a pour but de compléter les résultats obtenus en culture. L'utilisation de ces deux méthodes complémentaires devrait permettre une caractérisation complète du microbiote vaginal.

Partie B : Matériels et méthodes

1. Collecte et conservation des échantillons

L'étude présentée dans ce manuscrit est adossée à une étude plus large menée au CHRU de Tours, ayant obtenu une autorisation (référence : Étude MIVAGAL, mise en conformité vis-à-vis de la CNIL le 22/02/2024, n°2024_040). Une fraction des écouvillons vaginaux prélevés dans le cadre du dépistage systématique de *Streptococcus agalactiae* chez les femmes enceintes par le service d'obstétrique du CHRU de Tours, entre le 01/03/2024 et le 01/07/2024, a été stockée en vue d'une analyse ultérieure. Aucun prélèvement supplémentaire n'est requis pour ce travail et toutes les données sont anonymes. Les écouvillons utilisés, commercialisés par BD®, possèdent un milieu de transport qui maintient une conservation des bactéries viables pendant 48 heures. Tout d'abord, une partie de ce milieu de transport est aliquotée sous PSM (Poste de sécurité microbiologique) puis congelée à -20°C, avant la prise en charge des écouvillons au laboratoire. La réalisation du dépistage systématique survient dans un second temps. Au CHRU de Tours, le dépistage du portage vaginal de *S. agalactiae* repose sur la mise en culture de l'écouvillon sur une gélose *biplate* composée d'une part d'une gélose au sang frais sélective par addition d'antibiotiques actifs sur les bactéries à Gram négatif, et d'autre part d'une gélose chromogène sélective. Les écouvillons sont conservés 7 jours au réfrigérateur. Dans un troisième temps, les écouvillons inclus dans l'étude sont mis en culture secondairement sur géloses non sélectives.

2. Critères d'inclusion

Tous les prélèvements, dont le dépistage de *S. agalactiae* a été rendu positif en routine sont inclus dans cette étude. Pour chaque dépistage positif, les quatre dépistages négatifs suivants sont également inclus. Ce ratio a été choisi pour respecter au mieux la prévalence du portage de *S. agalactiae* dans la population française, proche de 20 %.

3. Analyse par culture

a. Prise en charge des prélèvements

Les prélèvements inclus sont réensemencés en quadrants sur les trois milieux gélosés non sélectifs suivants :

- ✓ Gélose trypticase soja au sang frais (TSS de Biomérieux®), incubée en aérobiose à 35 ± 2°C
- ✓ Gélose au sang cuit dite « chocolat », additionnée de suppléments vitaminiques Polyvitex (PVX de Biomérieux®), incubée sous CO₂ à 35 ± 2°C
- ✓ Gélose Columbia (COLS de Thermo Scientific®), incubée en anaérobiose à 35 ± 2°C

Ces milieux de culture sont incubés de manière prolongée en vue d'obtenir une meilleure exhaustivité et sont donc observés à 24 h, à 48 h puis à 5 jours d'incubation. Une lame est également étalée et colorée par la coloration de Gram à l'aide du PREVI COLOR GRAM de Biomérieux®. A l'examen microscopique après coloration, les paramètres suivants sont observés : cellules épithéliales, leucocytes, levures, flore de Döderlein, et leur proportion relative est caractérisée selon le consensus suivant : absence, rare, présence, nombreux (Tableau IV). La flore vaginale est ensuite décrite selon les critères d'Ison-Hay à partir de la coloration de Gram.

Tableau IV : Semi-quantification à partir de l'examen microscopique

Semi-quantification	Absence	Rare	Présence	Nombreux
Nombre d'éléments	0	1 à 5/champ	5 à 10/champ	> 10/champ

b. Identification bactérienne

Afin d'optimiser l'identification de toutes les bactéries cultivables, chaque type de colonie, ou morphotype, peut être isolé au préalable. L'identification est réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation, Time Of Flight*). Cette technologie repose sur l'ionisation des protéines bactériennes par un laser puis la mesure d'un temps de vol au sein d'un couloir de vide. Le temps de vol varie selon le rapport masse sur charge (m/z) des ions créés (Figure 2). Un ion qui possède un rapport m/z plus faible atteint le détecteur avant un ion de rapport m/z plus élevé. Un spectre de masse des protéines ribosomales de la bactérie est alors généré et comparé à une base de données. Un score de probabilité est attribué à chaque identification en fonction du pourcentage de concordance du spectre obtenu avec les spectres de référence. Lors de ce travail, les identifications sont faites à l'aide du spectromètre de masse Microflex LT de Bruker®.

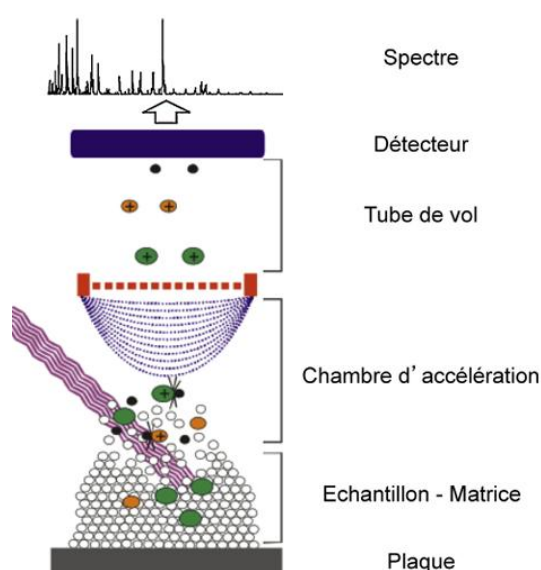


Figure 2 : Schéma du spectromètre de masse et principe de la technique MALDI-TOF - D'après Gravet *et al.* 2013 (46)

À chaque série d'identifications, un contrôle de qualité interne est déposé sur un spot libre d'une plaque MALDI puis une partie de chaque colonie à identifier est déposée sur la même plaque et recouverte d'une matrice permettant l'ionisation. La plaque est ensuite insérée dans le spectromètre pour démarrer l'analyse.

c. Collecte des résultats

Dès la fin de l'analyse par spectrométrie de masse, les résultats sont recueillis dans le système informatique, et collectés dans un tableau récapitulatif des résultats obtenus, présenté en annexes (Tableau V). Chaque prélèvement a été numéroté de 1 à 185 pour faciliter l'analyse et la présentation des résultats.

d. Tests statistiques

Des tests de comparaison de fréquences observées ont été réalisés. Les conditions de validité du test de l'écart-réduit n'étant pas respectées, des tests du χ^2 d'indépendance avec application d'une correction de Yates ont été effectués.

4. Analyse NGS

Une analyse NGS est réalisée conjointement sur une partie des échantillons inclus dans l'étude, par séquençage ciblé de l'ADN ribosomal 16S, à l'aide de la technologie Nanopore®. Dans un premier temps, une étape de pré-traitement de l'échantillon et d'extraction de l'ADN est réalisée à partir de la fraction congelée de l'échantillon. Ensuite la préparation des librairies peut débuter, à l'aide d'une PCR ciblée sur la région d'intérêt afin d'amplifier le signal. Ici, il s'agit de la séquence codant l'ADNr 16S, d'environ 1500 paires de bases composée des courtes régions hypervariables, spécifiques des genres et espèces bactériennes, intercalées de régions très conservées et permettant le design des amorces d'amplification universelles pan-bactérienne. Avec le kit utilisé, le 16S *barcoding* kit Nanopore®, cette étape se réalise en même temps que l'étape de *barcoding*, permettant d'identifier chaque échantillon. Une étape de lavage des librairies et de normalisation précède l'addition de l'adaptateur nécessaire au séquençage.

Le séquençage s'effectue sur automate MinION, à l'aide d'une *flowcell* constituée d'une membrane contenant des nanopores, dans laquelle circule un courant électrique. L'adaptateur additionné aux librairies est une protéine motrice permettant la séparation des deux brins complémentaires d'ADN à la surface des nanopores, et ainsi le passage de la séquence d'ADN simple brin à travers ces nanopores. Au passage des différents nucléotides dans les pores, le courant électrique est modifié spécifiquement et un détecteur permet de convertir ce signal électrique en séquence nucléotidique. Enfin, une analyse bio-informatique des résultats bruts est réalisée à l'aide du pipeline Emu qui permet d'attribuer à chaque séquence, une identification bactérienne au rang de l'espèce, et ainsi déterminer l'abondance relative de ces dernières dans le prélèvement.

Partie C : Résultats

1. Description des échantillons

Au cours de la période de recueil, un total de 185 prélèvements ont été conservés, parmi lesquels 14 dépistages de *S. agalactiae* se sont révélés positifs. Ces 14 prélèvements positifs ainsi que 56 prélèvements négatifs ont été inclus pour l'étude, représentant un total de 70 échantillons.

a. Résultats de l'examen microscopique

La coloration de Gram réalisée sur les 70 prélèvements vaginaux étudiés, a mis en évidence des cellules épithéliales en quantité satisfaisante sur la quasi-totalité des prélèvements, reflétant un prélèvement de bonne qualité, à l'exception de 3 prélèvements pour lesquels des cellules épithéliales ont été observées en faible quantité. Concernant la présence de leucocytes, leur semi-quantification a permis de dégager 20 prélèvements, soit près de 30% des échantillons, pour lesquels les leucocytes ont été observés comme « nombreux » ou « présents », reflétant une potentielle réaction inflammatoire locale.

La coloration de Gram a également permis de mettre en évidence la présence de levures et d'apprécier leur morphologie. Classiquement, les levures bourgeonnantes et les formes filamenteuses sont témoins d'une multiplication du champignon à l'origine d'une mycose vaginale ou vaginite candidosique. Dans notre étude, des levures ont été observées à l'examen direct sur 8 échantillons, dont 2 présentaient des formes filamenteuses.

Une observation méticuleuse de la composition bactérienne de la flore a été réalisée, comprenant une semi-quantification de la flore de Döderlein et une estimation du type de flore vaginale selon la classification d'Ison-Hay. Des bactéries possédant un aspect typique de *Lactobacillus* au Gram ont été observées sur 55 prélèvements, en quantité notable. L'aspect général de l'examen direct, prenant en considération la morphologie et la disposition bactérienne ainsi que la quantité relative des différents aspects, a permis dans la plupart des cas de classer les prélèvements en « flore normale », « flore intermédiaire » ou « flore de vaginose ». Parmi les 70 prélèvements inclus, 46 ont été classés en « flore normale », 11 en « flore intermédiaire » et 8 en « flore de vaginose ». Ainsi, 5 prélèvements n'ont pas pu être classés selon cette méthode à partir de l'examen direct, car ne présentaient pas de critère permettant de les classer dans ces catégories.

b. Résultats de la culture bactérienne

Après mise en culture des 70 écouvillons sur les 3 milieux de culture, 345 identifications ont été effectuées par spectrométrie de masse sur 293 colonies différentes. Ainsi, 67 espèces bactériennes ont pu être identifiées (Annexes : Tableau VI). Les *Lactobacillus* spp. ont majoritairement été identifiés sur géloses Columbia incubées en anaérobiose en lien avec le type respiratoire anaérobie préférentiel de ce genre bactérien. En effet, 49 identifications de *Lactobacillus* spp. ont été effectuées sur COLS contre 10 sur TSS incubées en aérobie et 8 sur PVX incubées sous CO₂. Neuf espèces différentes de *Lactobacillus* ont été mises en évidence : *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners*, *L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. rhamnosus* et *L. amylovorus*. Chaque morphotype bactérien identifié a été semi-quantifié de manière visuelle en « microorganisme majoritaire » correspondant à une quantité comprise entre 10⁶ et 10⁷ UFC ; « microorganisme d'abondance relative » correspondant à environ 10⁵ UFC et enfin « microorganisme rare » correspondant à 10³ ou 10⁴ UFC. Un seul échec d'identification par spectrométrie de masse est répertorié, à partir d'une petite colonie sur gélose Columbia.

2. Apport de la culture sur milieux non sélectifs

a. Par rapport aux résultats du dépistage de la colonisation à *S. agalactiae*

Quatorze dépistages de *S. agalactiae* rendus positifs en routine ont été inclus dans l'étude et réensemencés sur les 3 milieux gélosés non sélectifs. Deux d'entre eux n'ont pas été retrouvés en culture. Au contraire, une colonie de *Streptococcus agalactiae* a été identifiée sur un prélèvement vaginal dont le dépistage a été rendu négatif en routine.

b. Par rapport aux résultats de l'examen microscopique

L'équilibre de flore est d'abord estimé à partir de la coloration de Gram lors de l'examen direct selon la classification d'Ison-Hay, puis à partir de la culture 24 à 48 heures plus tard. Ce délai de rendu des résultats justifie l'importance de l'examen direct et de sa concordance avec les résultats obtenus en culture pour une prise en charge optimale des patientes. Toutes les lames ont été relues en aveugle par un second opérateur.

Les 70 prélèvements inclus ont été classés en 3 catégories en fonction de l'adéquation entre le type de flore rendu à l'examen direct et le type de flore rendu à la suite de la culture. Ainsi, 62 prélèvements sont classés dans la catégorie « très bonne concordance », 6 dans la catégorie « bonne concordance » et 2 dans la catégorie « concordance moyenne à mauvaise » (Figure 3).

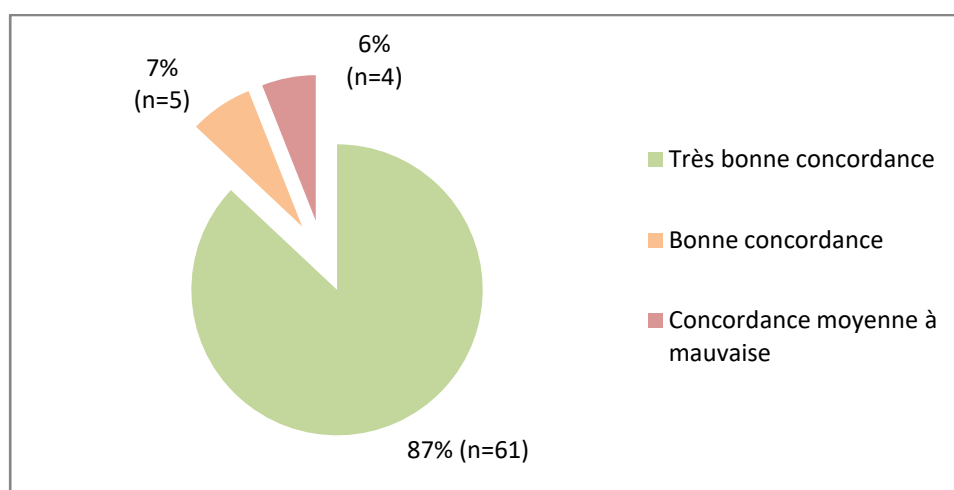


Figure 3 : Représentation de la concordance entre l'examen direct des prélèvements vaginaux et la culture associée (n=70)

Les 6 échantillons classés dans la catégorie « bonne concordance » présentent une légère différence entre l'examen direct et les résultats de la culture, sans pour autant modifier la caractérisation du type de flore. Par exemple, le prélèvement n°18 était pauvre avec peu de bactéries observables à la coloration de Gram. De plus, les prélèvements n°2, n°35, n°142 et n°184 possédaient des *Lactobacillus* qui ont été visualisés à l'examen microscopique mais n'ont pas été retrouvés en culture. Cela peut s'expliquer par la difficulté à cultiver de certaines souches de ce genre, ou par la croissance importante d'autres bactéries plus facilement cultivables, masquant la culture des *Lactobacillus*. De la même manière, le prélèvement n°180 présentait à l'examen direct de nombreux bacilles à Gram négatif évocateurs d'anaérobies, probablement non ou difficilement cultivables.

Deux échantillons possèdent une concordance moyenne à mauvaise entre l'ED et la culture. La coloration de Gram du prélèvement n°163 a permis de catégoriser la flore comme intermédiaire alors que la culture a révélé une flore plutôt assimilée à une vaginose bactérienne. Enfin, le prélèvement n°185 correspond à une flore normale en culture dominée par *L. jensenii*, or aucun *Lactobacillus* n'a été observé à l'ED.

3. Analyse des caractéristiques des différentes flores vaginales

a. Description des différents types de flores vaginales

Les résultats combinés de l'examen direct et de la culture sur les 70 prélèvements ont permis de classer les flores vaginales en 4 catégories principales (Figure 4). Les flores normales représentent 70% des prélèvements (49/70), tandis que les flores intermédiaires et les flores de vaginose représentent respectivement 14% (10/70) et 13% (9/70). Les 3% restants (2/70) sont des flores de type IV d'Ison-Hay (définies comme la présence uniquement de cocci à Gram positifs) ou autres, désignant des flores inclassables, généralement une absence de *Lactobacillus* et une colonisation par d'autres bactéries non responsables de vaginose, appartenant notamment à la flore de proximité, telles que des entérobactéries.

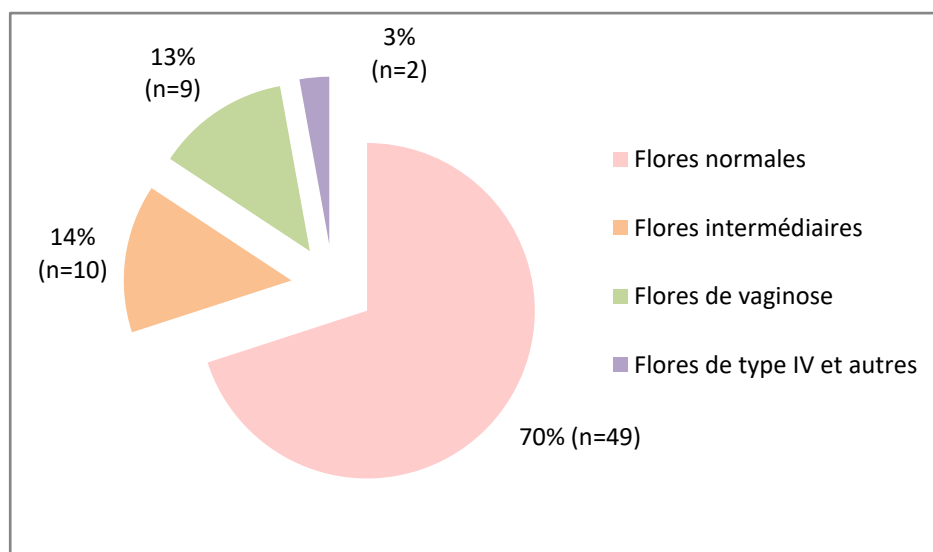


Figure 4 : Représentation de la répartition des différents types de flore (n=70)

i. Flores normales

Les éléments décrits lors l'examen microscopique, associés à l'observation et l'identification par spectrométrie de masse des colonies retrouvées sur les milieux de culture, ont permis de classer 49 flores sur 70 comme normales (Figure 5).

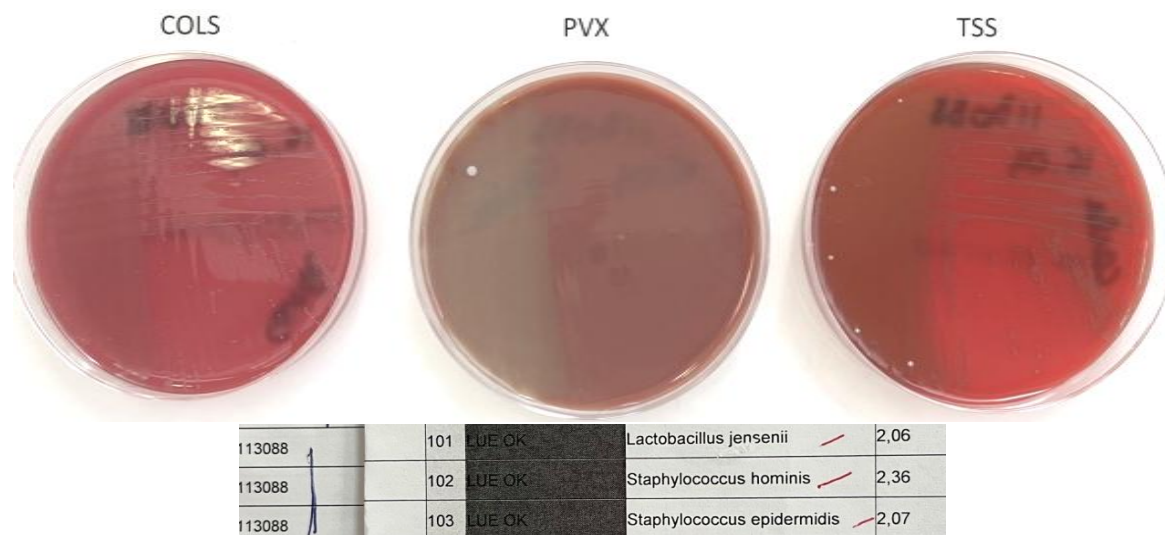


Figure 5 : Prélèvement n°68, exemple de flore normale

De manière plus précise, les flores normales ont été sous catégorisées en fonction de l'espèce de *Lactobacillus* prédominante, afin de les assimiler aux catégories de flores décrites en biologie moléculaire par Ravel et al., sous la dénomination de CST I, II, III ou V.

Ainsi, 23% (11/49) des flores normales sont dominées par *L. crispatus* et peuvent être assimilées au CST I ; 23% (11/49) sont dominées par *L. gasseri* et donc associées au CST II ; 20% (10/49) sont dominées par *L. jensenii* et donc associées au CST V et 8% (4/49) présentent majoritairement du *L. iners* et peuvent donc être associées au CST III (Figure 6). Certaines flores vaginales normales sont co-dominées en quantités équivalentes par deux espèces de *Lactobacillus* et n'ont pu être assimilé à aucun CST par méthode culturale. Une partie des flores normales n'a pas pu être classée car les *Lactobacillus* n'ont pas été détectés en culture. Cependant ils ont été observés sur l'examen direct donc la flore a tout de même été considérée comme normale. Ces flores sont regroupées dans la catégorie « CST indéterminé », représentant 20% (10/49) des flores normales. Enfin, 6% (3/49) des flores normales sont considérées comme non classables car l'espèce de *Lactobacillus* prédominante est différente des espèces strictement humaines classiquement retrouvées : *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* ou encore *Lactobacillus fermentum*. Ces dernières sont généralement présentes dans les produits laitiers ou dans les probiotiques, à l'instar des *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus casei* etc... La répartition des flores normales apparaît équilibrée au sein des différents CST, avec le CST III qui semble légèrement sous représenté.

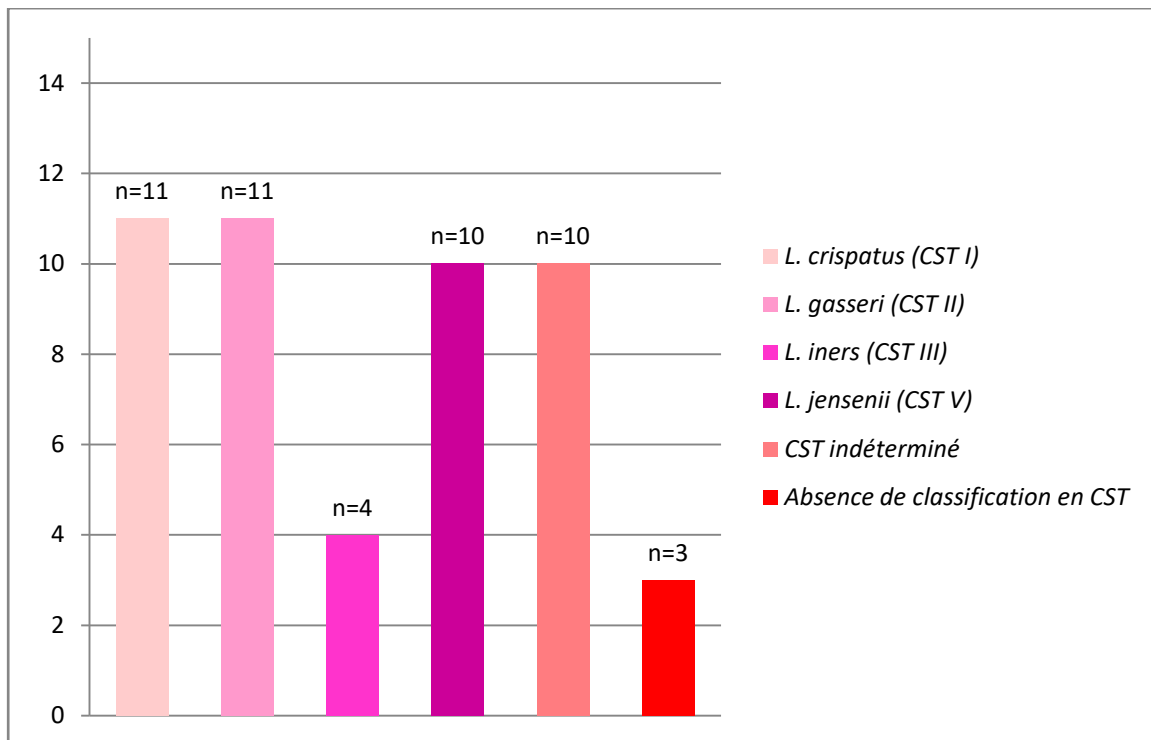


Figure 6 : Histogramme représentant la répartition des espèces prédominantes de *Lactobacillus* au sein des flores normales (n=49)

Parmi cet échantillonnage de flores normales, la majorité des prélèvements (25/49 ; 51%) est associée à une absence de réaction inflammatoire locale, objectivée par une absence de leucocytes à l'examen direct, ainsi que 9 prélèvements, (9/49 ; 19%), associés à de rares leucocytes. En revanche, des leucocytes ont été semi-quantifiés comme « présents » ou « nombreux » pour respectivement 7 et 8 prélèvements, (7/49 ; 14%) (8/49 ; 16%) (Figure 7).

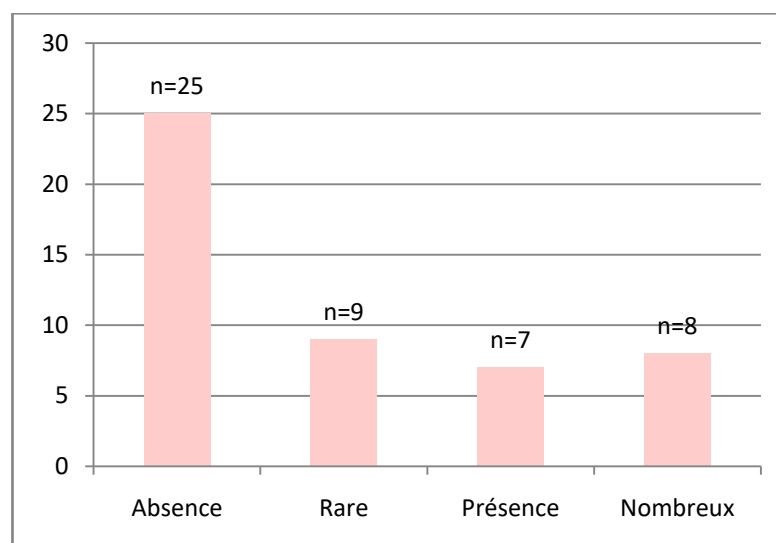


Figure 7 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores normales (n=49)

ii. Flores intermédiaires

Les éléments décrits à l'examen microscopique, associés à l'observation et l'identification par spectrométrie de masse des colonies retrouvées sur les milieux de culture, ont permis de classer 10 flores sur 70 comme intermédiaires (Figure 8).

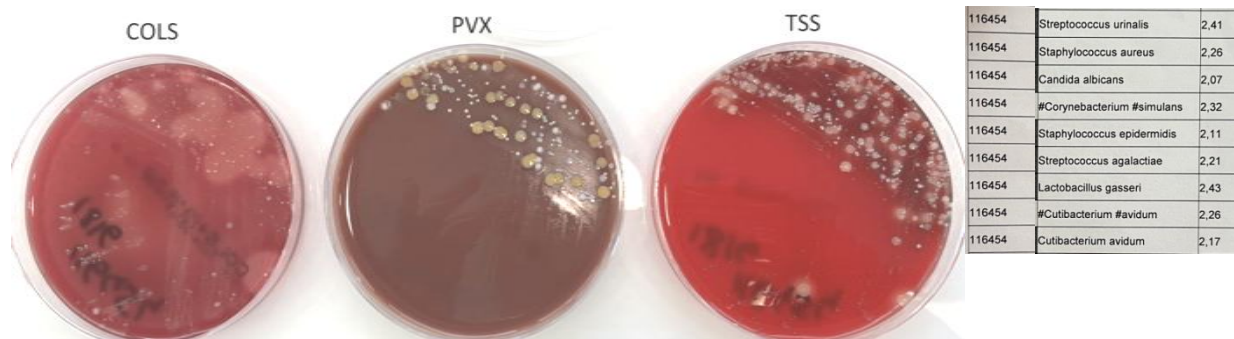


Figure 8 : Prélèvement n°169, exemple de flore intermédiaire

Parmi les 10 flores intermédiaires, 3 sont associées à du *L. gasseri* tandis qu'une seule est associée à du *L. jensenii* et une à une autre espèce de *Lactobacillus* (Figure 9). Deux flores intermédiaires sont associées à la fois à du *L. gasseri* et à d'autres espèces de *Lactobacillus*. Trois flores intermédiaires n'ont pas pu être classées car les *Lactobacillus* n'ont pas été détectés en culture. Cependant ils ont été observés sur l'examen direct donc la flore a tout de même été considérée comme intermédiaire. Aucune flore intermédiaire n'est associée à du *L. crispatus* isolément ni à du *L. iners*.

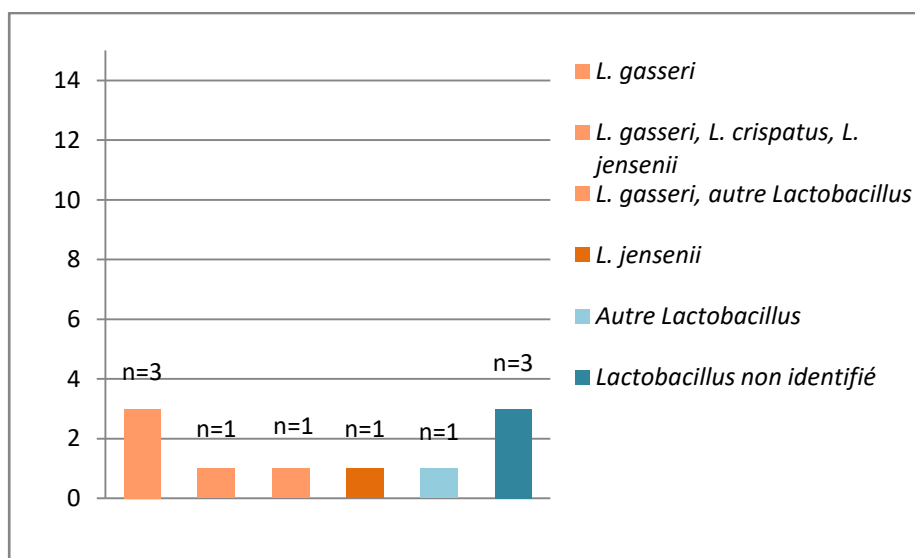


Figure 9 : Histogramme représentant la répartition des différentes espèces de *Lactobacillus* au sein des flores intermédiaires (n=10)

Ces résultats mettent en lumière une tendance à la surreprésentation de l'espèce *Lactobacillus gasseri* au sein des flores intermédiaires dans notre étude : la moitié des flores intermédiaires de cette étude sont associées à du *Lactobacillus gasseri* (5/10 ; 50%).

Parmi cette population de flores intermédiaires, l'existence d'une réaction inflammatoire locale, objectivée par la visualisation de nombreux leucocytes à l'ED, représente 2 prélèvements seulement (Figure 10). Au contraire, 5 prélèvements ne comportaient aucun leucocyte à l'ED tandis que 3 prélèvements présentaient de rares leucocytes.

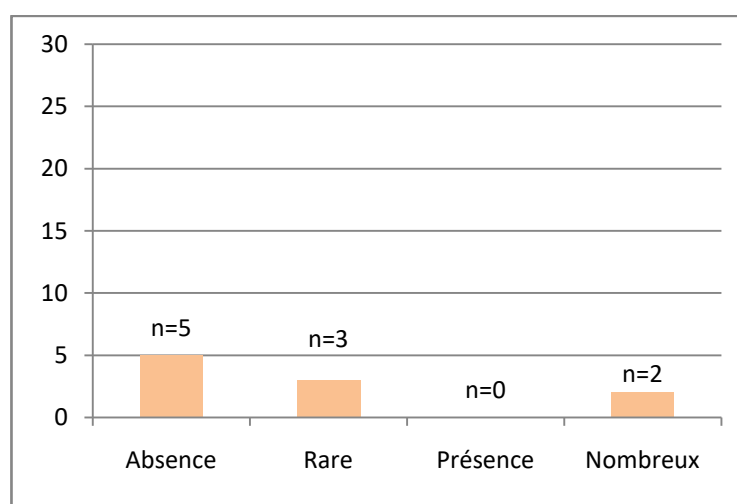


Figure 10 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores intermédiaires (n=10)

iii. Flores de vaginose

Les éléments décrits à l'examen microscopique, associés à l'observation et l'identification par spectrométrie de masse des colonies retrouvées sur les milieux de culture, ont permis de classer 9 flores sur 70 en vaginoses bactériennes (Figure 11).

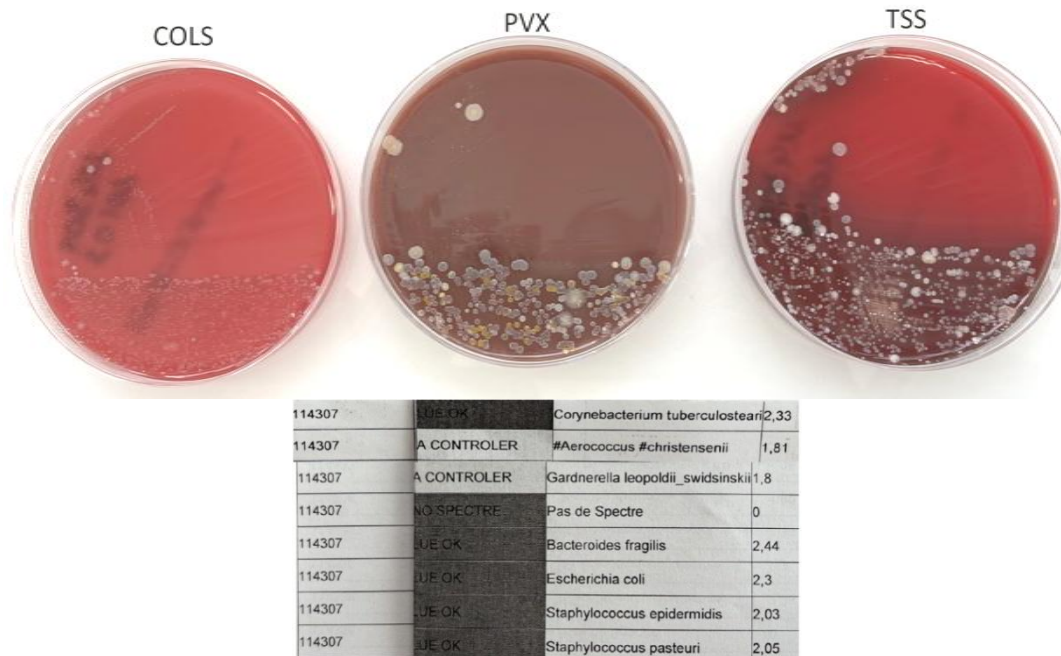


Figure 11 : Prélèvement n°112, exemple de flore de vaginose

Parmi les 9 flores de vaginose, le genre bactérien *Gardnerella* classiquement retrouvé dans la VB a été détecté sur 4 prélèvements (Figure 12). Sur 3 autres prélèvements, des bactéries anaérobies diverses ont été identifiées. Enfin, sur 2 prélèvements, aucune bactérie anaérobie n'a été objectivée, notamment en lien avec un échec d'identification par MALDI-TOF d'une colonie. Le genre bactérien *Lactobacillus* a été retrouvé dans une flore de vaginose uniquement. Il s'agissait de colonies de *L. iners* (prélèvement n°26).

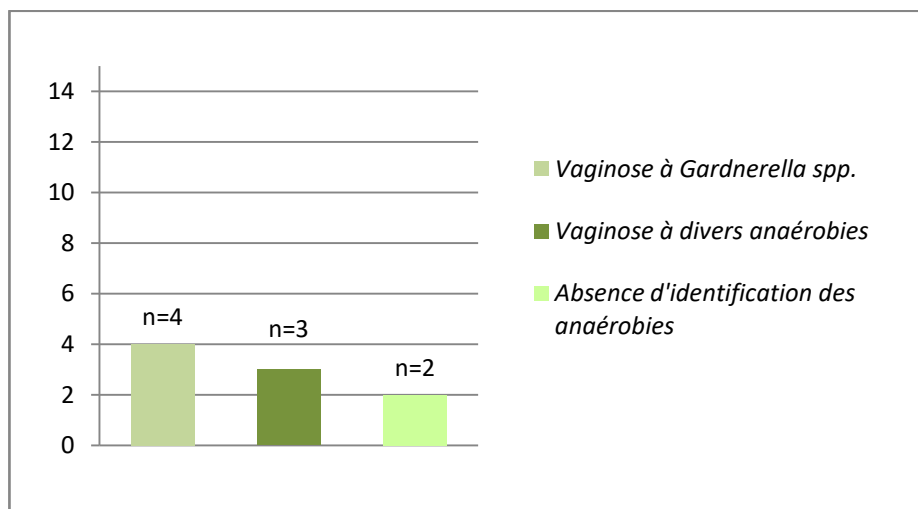


Figure 12 : Histogramme représentant la répartition de *Gardnerella* spp. au sein des flores de vaginose (n=9)

Des leucocytes ont été observés à l'ED sur 3 échantillons, en quantité variable de « présents » à « nombreux », tandis que 6 échantillons présentaient une absence totale ou de rares leucocytes (Figure 13).

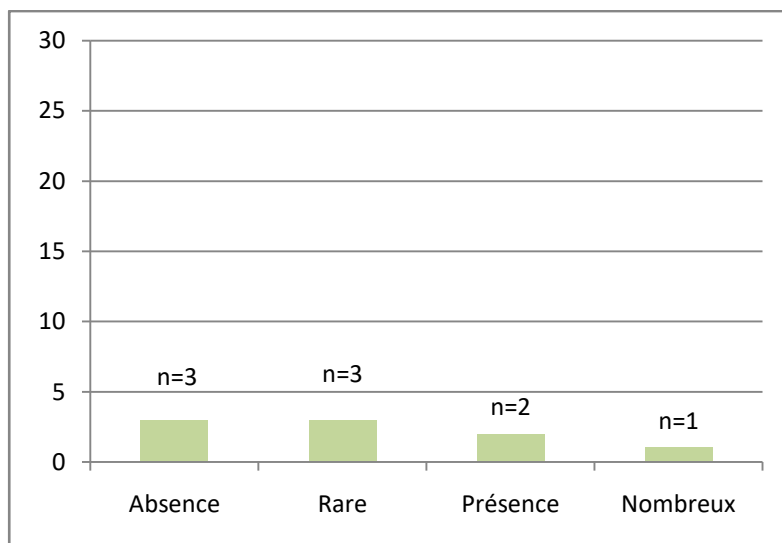


Figure 13 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores de vaginose (n=9)

iv. Flores de type IV et autres

Les éléments décrits à l'examen microscopique, associés à l'observation et l'identification par spectrométrie de masse des colonies retrouvées sur les milieux de culture, ont permis de classer 2 flores sur 70 comme flore de type IV et autre type de flore (Figure 14).

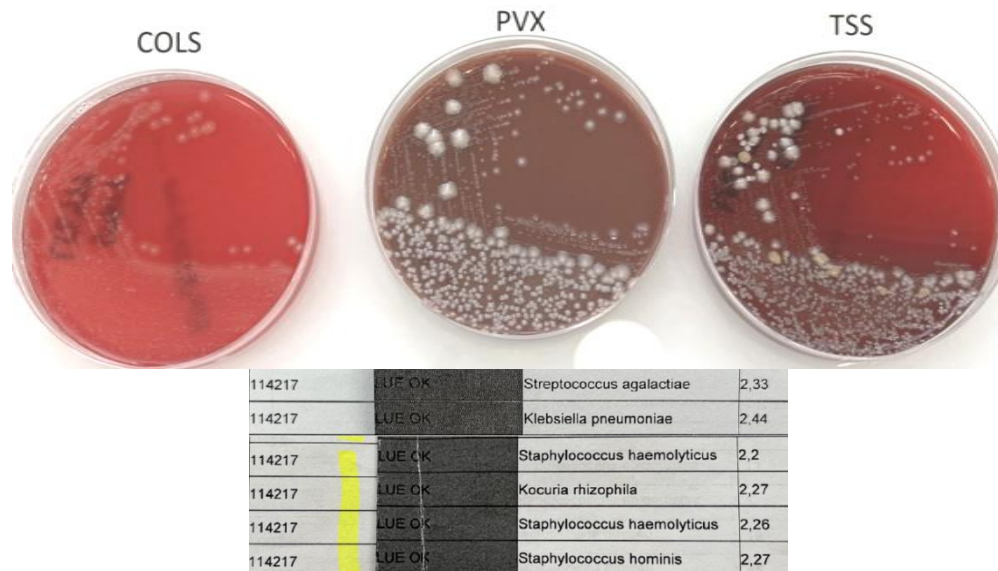


Figure 14 : Prélèvement n°104, exemple d'une flore de type IV

Une seule flore vaginale a été classée comme appartenant au type IV, composée de cocci à Gram positifs, tandis qu'une flore n'appartenant à aucune catégorie de flore vaginale connue, a été classée en autre type de flore. Elle comportait principalement des bactéries appartenant à la flore digestive (telles que des entérobactéries), des bactéries appartenant à la flore cutanée (telles que des staphylocoques), et d'autres bactéries variées. Dans cette population, l'ED a révélé une absence de leucocytes pour les 2 prélèvements (Figure 15).

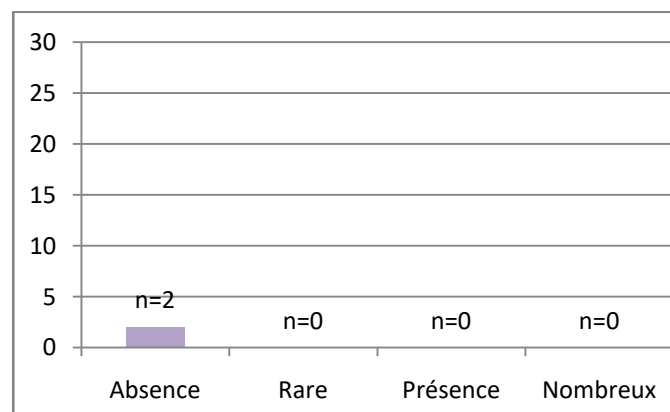


Figure 15 : Histogramme représentant la visualisation de leucocytes à l'examen direct au sein des flores de type IV et autres (n=2)

b. Description des bactéries associées aux flores annexes

Parmi les échantillons inclus dans l'étude, il existe une forte représentation des bactéries appartenant à la flore cutanée, et leur répartition peut se faire en 3 catégories. La catégorie dénommée « présence de bactéries de la flore cutanée » comprend les écouvillons pour lesquels au moins deux bactéries commensales de la flore cutanée ont été identifiées dont au moins l'une d'entre elles a été trouvée en abondance forte ou relative. La catégorie « rares bactéries de la flore cutanée » regroupe les prélèvements vaginaux pour lesquels au moins deux bactéries cutanées ont été identifiées en faible abondance. Enfin, la catégorie « absence de bactérie de la flore cutanée » est constituée des prélèvements ne présentant aucune bactérie évoquant une flore cutanée ou une seule en faible abondance.

La plupart des prélèvements, soit 34 sur un total de 70, ne présentent aucune bactérie cutanée commensale (Figure 16). Au contraire, 15 prélèvements comportent des bactéries de la flore cutanée en quantité notable et 14 en comportent en faible quantité. Au final, le taux global de présence de bactéries appartenant à la flore cutanée dans les prélèvements vaginaux est de 41% (29/70 ; 41%).

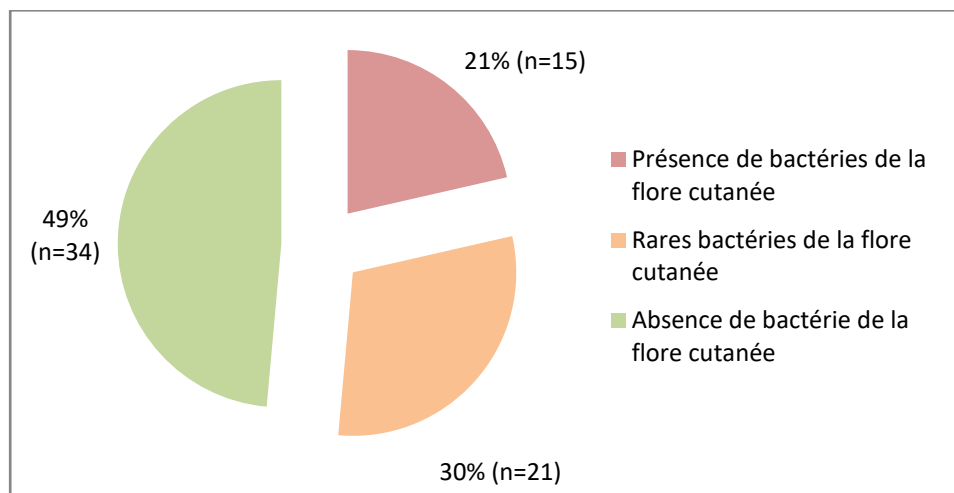


Figure 16 : Représentation de la répartition des bactéries de la flore cutanée dans les prélèvements vaginaux (n=70)

Parmi les bactéries de la flore cutanée identifiées, les plus fréquentes sont des staphylocoques à coagulase négative, dans 40 prélèvements (40/70 ; 57%). Des *Corynebacterium* spp. ont également été identifiées dans 23 prélèvements (23/70 ; 33%).

Certaines bactéries appartenant à la flore digestive ont également été identifiées. Une large prévalence d'*Enterococcus faecalis* a été mise en évidence, dans 47% (33/70) des prélèvements inclus, ainsi que des entérobactéries retrouvées dans 15 prélèvements (15/70 ; 21%). Parmi ces 15 prélèvements, 17 entérobactéries ont été identifiées, réparties en 5 espèces, l'espèce majoritaire étant *Escherichia coli* identifiée à 11 reprises.

c. Description des bactéries anaérobies cultivables et de la diversité bactérienne

Le portage vaginal de bactéries anaérobies est défini dans ce travail par la présence d'au moins 2 espèces anaérobies cultivables quantifiées en abondance forte ou relative, et a été attribué à 14 prélèvements. Plus de la moitié des flores présentant une prolifération d'anaérobies est associée à une absence de *Lactobacillus* spp. (Figure 17). A l'inverse, aucune prolifération de bactéries anaérobies n'a été mise en évidence en culture dans des flores vaginales dominées par *L. crispatus*.

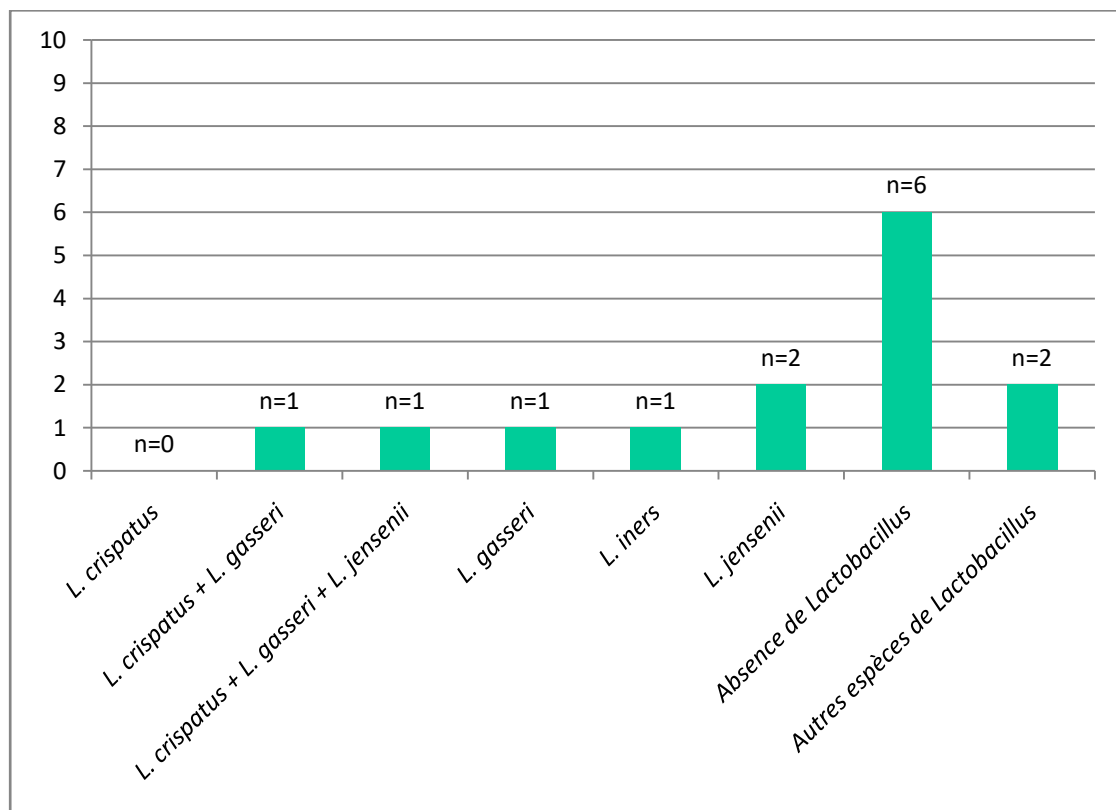


Figure 17 : Histogramme représentant le nombre de prélèvements vaginaux présentant une prolifération de bactéries anaérobies en culture, en fonction des espèces de *Lactobacillus* prédominantes dans la flore (n=14)

4. Analyse du microbiote associé au portage de *Streptococcus agalactiae*

a. Association entre le portage de *S. agalactiae* et le type de flore

La proportion de femmes colonisées à *S. agalactiae* est représentée en fonction de chaque catégorie de flore vaginale dans la Figure 18. Cette colonisation est plus importante parmi les flores normales assimilées au CST II. La proportion de femmes porteuses de *S. agalactiae* semble plus élevée dans les flores vaginales associées au *Lactobacillus gasseri* que dans les flores associées à d'autres espèces de *Lactobacillus*.

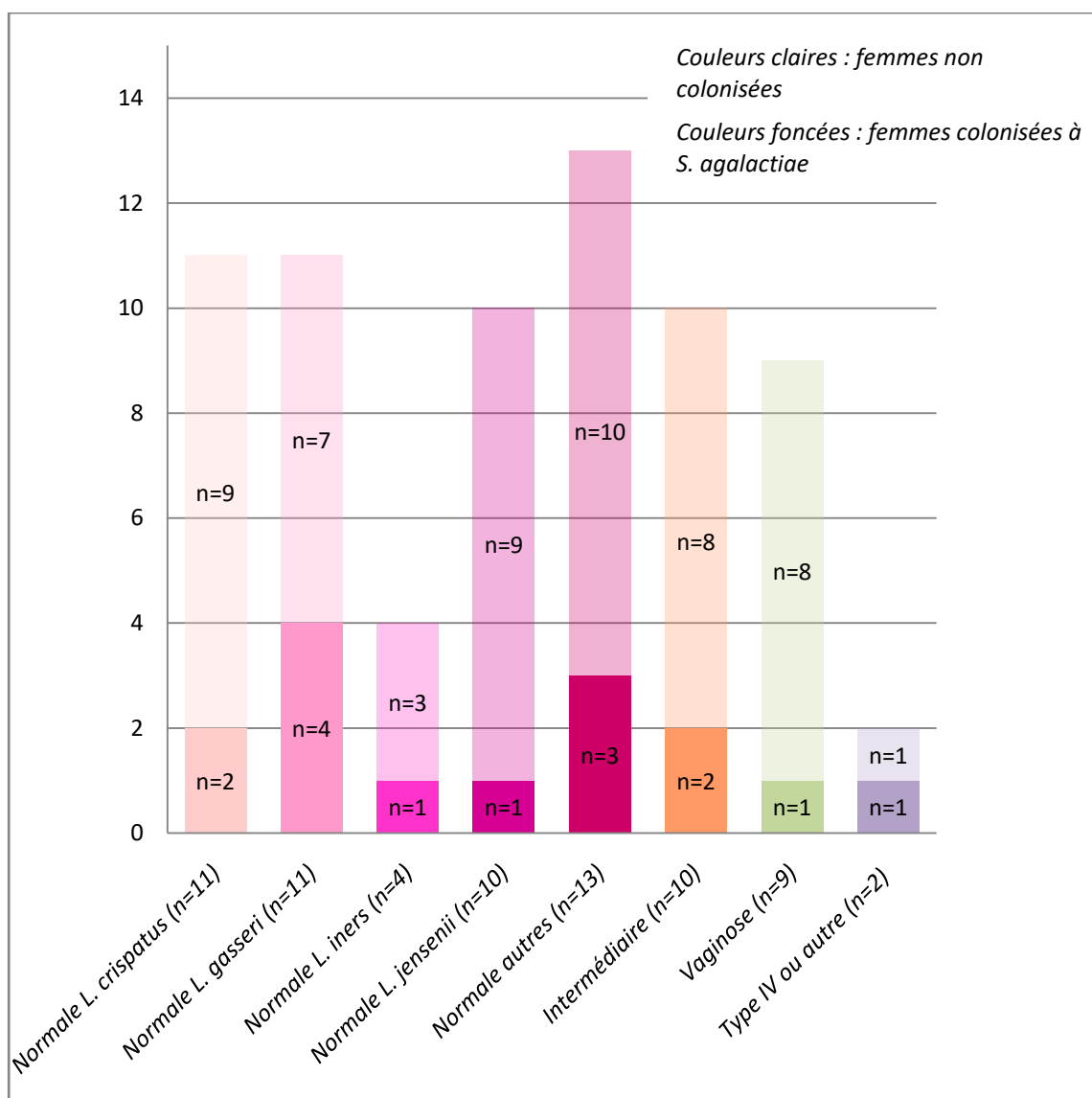


Figure 18 : Histogramme représentant la répartition des prélèvements vaginaux au sein de chaque type de flore, chez les populations de femmes porteuses et non porteuses de *S. agalactiae* (n=70)

Les flores présentant une seule espèce de *Lactobacillus* sont deux fois plus nombreuses que les flores présentant au minimum deux espèces différentes de *Lactobacillus* (Figure 19). Il n'existe aucune différence entre les femmes porteuses de *S. agalactiae* et les femmes non porteuses concernant le nombre d'espèces de *Lactobacillus* présents dans la flore vaginale.

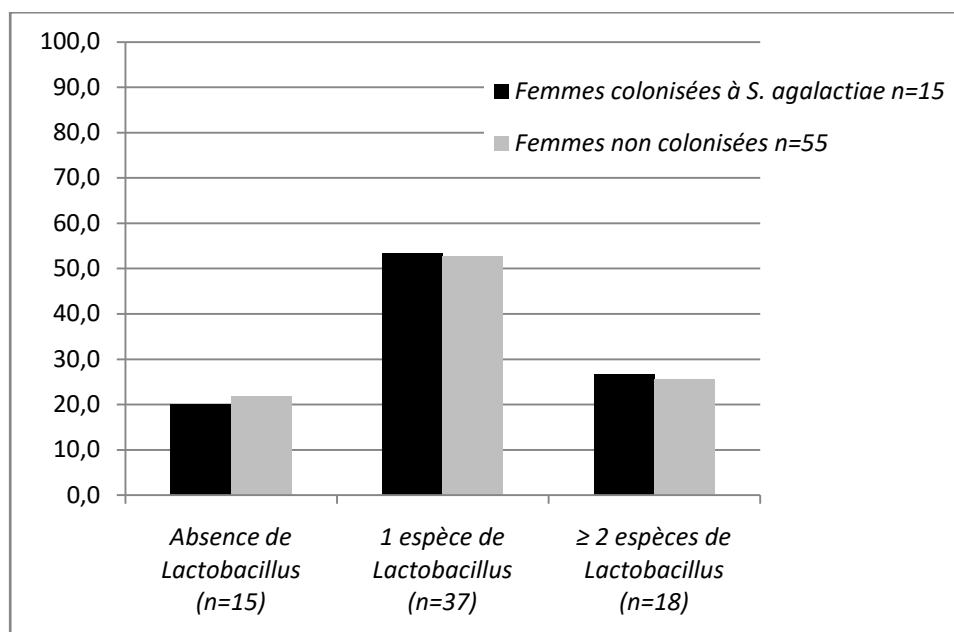


Figure 19 : Histogramme représentant le pourcentage de portage simple ou multiple de *Lactobacillus* spp. au sein des populations de femmes porteuses et non porteuses de *S. agalactiae* (n=70)

b. Association entre le portage de *S. agalactiae* et la présence de leucocytes à l'examen direct

Sur les 20 échantillons possédant des leucocytes à l'examen microscopique, semi-quantifiés comme « présents » ou « nombreux », 6 appartiennent à des femmes colonisées à *S. agalactiae* et 14 à des femmes non colonisées. Ces deux types de population ont des effectifs respectifs de 15 et 55 patientes. Dans chaque population, le rapport du nombre d'échantillons présentant des leucocytes à l'ED sur l'effectif total respectif a été calculé. Ce rapport vaut 0,40 dans la population des femmes porteuses de *S. agalactiae* contre 0,25 dans la population de femmes non porteuses. Au risque α de 5 %, la présence de leucocytes à l'examen direct ne diffère pas significativement entre les deux populations étudiées.

c. Association entre le portage de *S. agalactiae* et la présence de bactéries anaérobies en culture

Parmi les 14 prélèvements présentant une prolifération de bactéries anaérobies cultivables, seulement 2 appartiennent à la population de femmes colonisées à *S. agalactiae*. Dans cette population de femmes porteuses de *S. agalactiae*, 2 flores sur 15 au total présentent une prolifération d'anaérobies tandis que dans la population des femmes non porteuses de *S. agalactiae*, 12 flores sur 55 possèdent des anaérobies en culture. Les ratios reflétant la prolifération de bactéries anaérobies cultivables dans ces deux populations sont respectivement de 0,13 et 0,22. Au risque α de 5 %, la prolifération de bactéries anaérobies cultivables ne diffère pas significativement entre les deux populations étudiées.

5. Comparaison des résultats de la culture à ceux obtenus en NGS

Vingt-sept prélèvements inclus dans cette étude ont été analysés en NGS en parallèle de la culture bactérienne. Parmi ces 27 prélèvements, 5 présentaient un dépistage positif à *S. agalactiae*. Deux d'entre eux (n°158 et n°182) se sont révélés positifs à *S. agalactiae* à la fois en culture et en NGS, en faible abondance. Dans 2 autres prélèvements (n°157 et n°169), *S. agalactiae* a été retrouvé en culture mais pas en NGS. Enfin, dans un seul prélèvement positif au dépistage (n°180), ni la culture, ni le NGS n'ont permis de détecter *S. agalactiae*. Parmi ces 27 échantillons, tous ceux dont le dépistage de *S. agalactiae* a été rendu négatif en routine se sont effectivement révélés négatifs en culture et en NGS pour *S. agalactiae*.

Concernant la diversité bactérienne observée, hormis pour l'échantillon n°181, la métagénomique ciblée et la culture ont détecté certaines espèces bactériennes différentes, ce qui en fait des techniques complémentaires (Figure 20). Le séquençage a identifié plus d'espèces différentes que la culture à partir du même prélèvement à 9 reprises (9/27). À l'inverse, la culture a révélé plus d'espèces différentes à 14 reprises (14/27). Dans 4 cas (4/27), les deux méthodes ont permis d'identifier le même nombre d'espèces différentes au sein du prélèvement.

L'analyse conjointe des 27 échantillons en séquençage haut débit et en culture a permis d'identifier des espèces identiques de *Lactobacillus* pour 9 d'entre eux. Au contraire, 8 échantillons présentaient des différences sur les espèces de *Lactobacillus* identifiées : pour 4 échantillons, l'analyse NGS a permis de détecter des *Lactobacillus* tandis que la culture n'a mis en évidence aucun *Lactobacillus* ; et pour 4 autres échantillons, des espèces différentes de *Lactobacillus* ont été détectées. Dix prélèvements se sont révélés partiellement concordants, avec systématiquement moins d'espèces de *Lactobacillus* différentes identifiées en culture qu'en NGS. La classification des types de flores vaginales qui découle de ces résultats est proche avec les 2 techniques d'analyse. Parmi les 27 prélèvements, 22 ne présentent aucune différence de classification de la flore entre l'analyse par séquençage haut débit et l'analyse par culture bactérienne. Dans le prélèvement n°168, la culture a trouvé en quantités équivalentes *L. crispatus* et *L. jensenii* tandis que le séquençage ciblé a montré une proportion relative de *L. crispatus* de 93%. Dans les échantillons n°156, n°167, n°178 et n°183, *L. crispatus* n'a pas été identifié en

culture alors que le séquençage l'a mis en évidence avec des proportions relatives également supérieures à 90%. Enfin, pour 5 prélèvements, la classification de la flore vaginale est différente entre les techniques comparées. En effet, les prélèvements n°158, n°163 et n°164 ont été classés en flores de vaginose en culture alors que le NGS a identifié un CST III sans anaérobies. De même, les prélèvements n°146 et n°169 ont été classés en flores intermédiaires en culture et le NGS n'a permis l'identification que de *Lactobacillus* spp.

La comparaison des résultats provenant des deux méthodes d'analyse est complexe, particulièrement pour les bactéries anaérobies. Quinze échantillons ne présentaient aucune bactérie anaérobie en culture ni en NGS. Dans un échantillon pouvant être considéré comme concordant entre les deux techniques d'analyse, les mêmes espèces de bactéries anaérobies ont été détectées en culture et en NGS (n°143). Néanmoins, l'analyse par séquençage a permis d'identifier de nombreuses espèces anaérobies supplémentaires par rapport à la culture. Onze échantillons présentent des différences notables. En effet, des anaérobies ont été identifiés seulement en culture dans 5 échantillons et à l'inverse, l'ont été seulement en NGS dans un seul prélèvement. Enfin, des espèces différentes d'anaérobies ont été détectées en parallèle par les deux techniques d'analyse dans 5 échantillons.

Concernant la prévalence des *Prevotella*, elle serait généralement sous-estimée en culture par rapport au séquençage haut débit (1). Les résultats du travail présenté ici, révèlent qu'en culture, seul le prélèvement n°31 a permis d'identifier la présence de *Prevotella corporis*, parmi les 70 prélèvements inclus. En revanche, l'analyse NGS n'a pas permis d'identifier de *Prevotella* parmi les 27 prélèvements analysés.

Enfin, la culture a mis en évidence plusieurs espèces de *Staphylococcus* et de *Corynebacterium* dans 22 prélèvements, en faible abondance, tandis que le séquençage haut débit n'a détecté qu'un *S. epidermidis* dans un seul prélèvement.

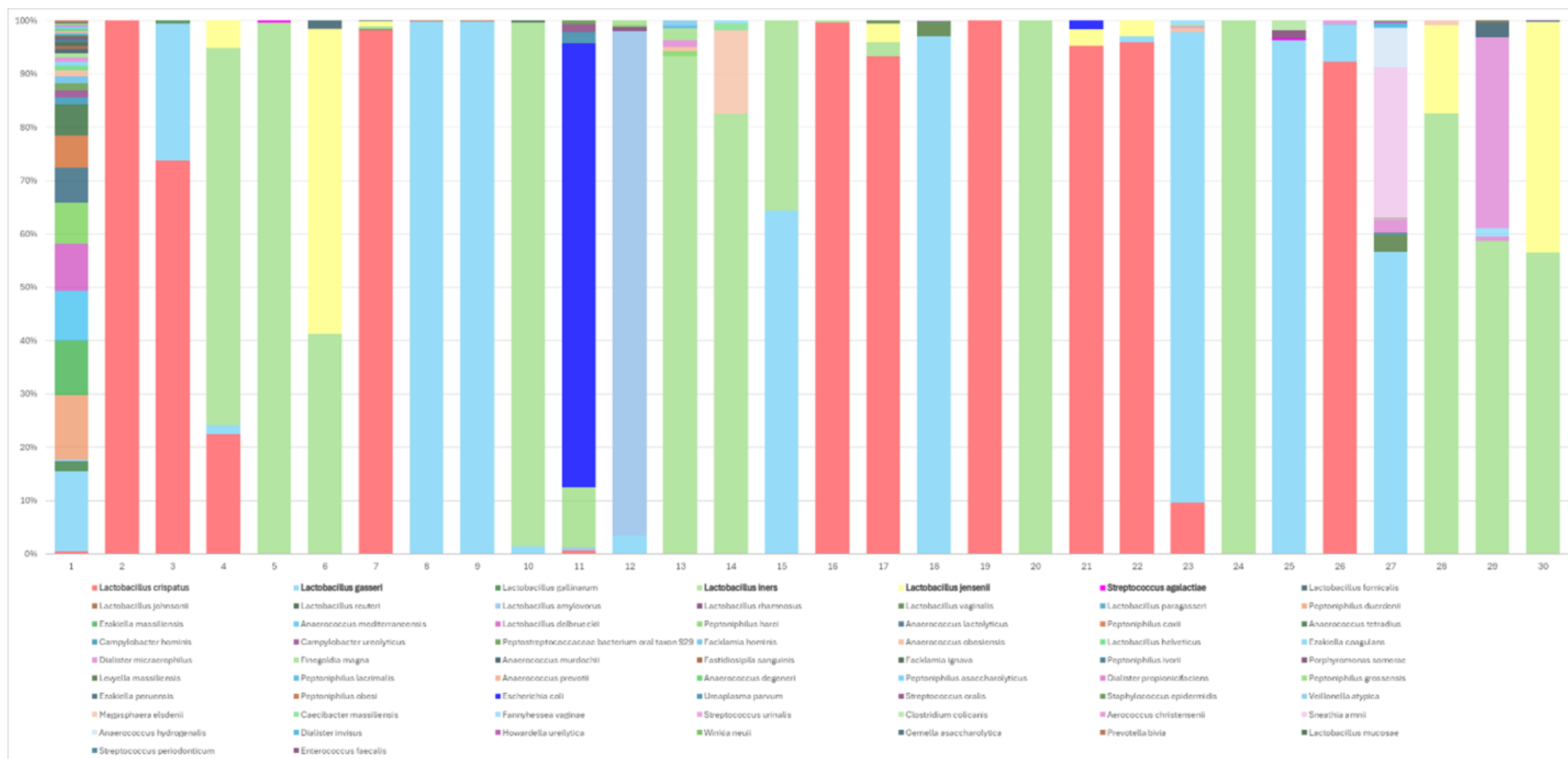


Figure 20 : Histogramme représentant la proportion relative des espèces bactériennes identifiées en NGS

Partie D : Discussion

Ce travail avait pour objectif de décrire de manière exhaustive la composition du microbiote vaginal en bactéries cultivables, dans le cadre du dépistage systématique de la colonisation à *S. agalactiae*. Parmi les 70 femmes enceintes prélevées, 67 espèces bactériennes dont 9 espèces différentes de *Lactobacillus* ont été identifiées. Par ailleurs, 2 espèces fongiques ont aussi pu être détectées. L'analyse de ces flores a permis de mettre en évidence un taux de 70% de flores normales présentant une répartition équilibrée des différentes espèces de *Lactobacillus* parmi ceux qui prédominent classiquement au sein des CST décrits dans la littérature (1). Également, 14% de flores intermédiaires ont pu être identifiées, au sein desquelles *Lactobacillus gasseri* est l'espèce la plus fréquemment retrouvée.

Cette étude présente quelques limites. En effet, les données qui en résultent sont descriptives et ne permettent pas de mettre en évidence d'association significative ni de lien de causalité. Ce manque de significativité est notamment lié au faible effectif de femmes incluses. De plus, cette étude est unicentrique et a été réalisée sur une population de femmes ayant bénéficié d'un suivi médical au cours de leur grossesse, ce qui introduit un biais de sélection. Également, l'échantillonnage ne tient pas compte des facteurs épidémiologiques tels que l'origine ethnique ou l'âge dont l'impact sur la composition du microbiote vaginal a été démontré à plusieurs reprises (1,12). Un biais de méthode peut également être évoqué concernant le matériel utilisé. En effet, le spectromètre de masse possède une banque de données de spectres de référence pour identifier le genre et l'espèce bactérienne. Les bactéries inconnues à ce jour ne possèdent aucun spectre de référence et ne sont donc pas répertoriées dans la base de données du spectromètre de masse rendant leur identification impossible par cette méthode. L'utilisation d'une technique complémentaire, tel que le séquençage du génome bactérien, par technique 16S ou par WGS (*Whole genome sequencing*) doit être envisagé dans cette situation. De même, certaines bactéries peu communes possèdent peu de spectres de référence, rendant leur identification incertaine en spectrométrie de masse.

Malgré ce biais technique, parmi les 293 colonies identifiées au spectromètre de masse au cours de l'étude, une seule a demeuré infructueuse. Il s'agissait de petites colonies sur gélose Columbia dans un prélèvement dont la flore était qualifiée de vaginose à l'ED. Cet échec d'identification peut s'expliquer en partie par la petite taille des colonies et leur difficulté à cultiver, probablement en lien avec l'atmosphère anaérobie nécessaire à leur développement. La prévalence importante de bactéries anaérobies dans la flore vaginale complique la réalisation d'une description exhaustive de ce microbiote par culture. En effet, au sein d'une flore anaérobie, les bactéries sont souvent nombreuses, difficilement cultivables pour certaines et forment des petites colonies, de morphotype proche, qui peuvent s'avérer difficiles à différencier. Les bactéries présentes en faible quantité dans la FV forment peu de colonies en culture et peuvent être masquées par d'autres colonies bactériennes plus imposantes ou simplement en plus grande quantité. De plus, le microbiote vaginal peut comporter d'autres bactéries difficilement ou non cultivables telles que les *Mycoplasma* spp. ou les *Ureaplasma* spp. qui ne peuvent donc pas

être identifiées par méthode culturale conventionnelle. En vue de compenser partiellement le déficit de la méthode conventionnelle vis-à-vis des bactéries difficilement cultivables, en particulier des bactéries à croissance lente, les incubations ont été prolongées pendant 5 jours par rapport aux pratiques de routine qui se limitent à maximum 48 heures. Cela n'a pourtant pas permis d'identifier de bactéries supplémentaires. En effet, l'incubation prolongée a rendu la lecture complexe, en modifiant l'aspect des colonies déjà présentes à 24 ou 48 heures d'incubation, mais aussi en induisant un envahissement des géloses par ces bactéries, les rendant difficilement interprétables. La prise en charge des 70 prélèvements vaginaux par culture sur trois milieux gélosés, suivie de l'identification de chaque morphotype par spectrométrie de masse a exigé une organisation méticuleuse pour assurer le bon déroulement de l'étude. Les principales contraintes de l'analyse culturale étaient les délais d'incubation et le rythme d'observation des géloses à respecter (à 24 h, 48 h et 5 jours) ; mais également le grand nombre de géloses à manipuler, majoré par les isolements de certaines colonies sur des géloses supplémentaires. Enfin, la contrainte majeure était le temps nécessaire à l'ensemencement, l'observation des cultures et l'étape d'identification. La culture bactérienne demande donc une organisation rigoureuse et nécessite de nombreuses manipulations, ce qui implique un temps technique conséquent. Les difficultés rencontrées avec la culture bactérienne sur un microbiote polymicrobien complexe justifient l'intérêt d'une technique de séquençage haut débit, plus rapide et moins exigeante du point de vue organisationnel, avec une gestion plus pratique des prélèvements.

Par ailleurs, la méthode conventionnelle par culture non sélective a révélé la présence de bactéries appartenant aux flores de proximité, notamment à la flore cutanée dans 41% des prélèvements. Plusieurs hypothèses sont envisageables pour expliquer la présence de ces espèces en culture. Tout d'abord, une contamination de l'écouvillon vaginal par la flore cutanée de la patiente au moment du prélèvement pourrait être en cause. Elle survient généralement en début ou en fin de prélèvement, par contact avec la peau au niveau vulvaire par exemple. Une hypothèse alternative pour expliquer la présence de bactéries appartenant à la flore cutanée en culture est celle d'une contamination exogène provenant de la manipulation des écouvillons au laboratoire. Enfin, ces bactéries peuvent être réellement issues de la cavité vaginale, et refléter une colonisation par des bactéries non associées à la flore vaginale typique. Selon la même réflexion, la présence de bactéries commensales digestive, également considérées comme appartenant à la flore de proximité, pourrait être issue d'une contamination par contact avec la zone périnéale lors du prélèvement. La culture des prélèvements vaginaux a permis d'identifier des entérobactéries (15/70 ; 21,4%), à une échelle moindre qu'*Enterococcus faecalis* (33/70 ; 47,1%), mais qui peuvent entraîner des difficultés d'interprétation des cultures à partir des prélèvements vaginaux. En effet, il est compliqué de différencier une contamination par la flore de proximité d'une réelle colonisation vaginale. Or, une colonisation vaginale par des entérobactéries, en particulier chez la femme enceinte peut entraîner des complications infectieuses pour la mère et l'enfant. Dans ce contexte, les entérobactéries sont considérées comme des bactéries à haut risque infectieux (BHRI). Il est donc important de réussir à les mettre en évidence et de les prendre en compte lors de l'interprétation des cultures par le biologiste.

De la même manière, *S. agalactiae*, qui est une bactérie pouvant être associée à une flore vaginale normale, devient une BHRI dans un contexte de grossesse. La possibilité d'utiliser une antibioprophylaxie *per-partum* pour prévenir une IMF, confère une importance majeure à la mise en évidence de *S. agalactiae* à partir d'un prélèvement vaginal maternel en fin de grossesse. Les cultures sélective et non sélective présentent des avantages distincts et un intérêt variable selon le type de prélèvement et l'objectif de cette culture. Au total, parmi les 14 dépistages de *S. agalactiae* rendus positifs en routine, seuls 2 prélèvements (n°7 et n°180) n'ont pas permis de retrouver de colonie de *S. agalactiae*. En réalité, le réensemencement de l'écouvillon dans le cadre de la culture sur milieux non sélectifs était réalisé après validation du résultat de dépistage, soit entre 24 et 48 heures après le prélèvement. Malgré la conservation de l'écouvillon au réfrigérateur, il est envisageable que l'épuisement préalable de l'écouvillon sur la gélose sélective ait pu impacter négativement cette nouvelle mise en culture, ou alors que certaines souches de *S. agalactiae* aient été altérées, rendant leur culture difficile. Également, la grande majorité du liquide de transport a été aliquotée pour être conservée en vue de réaliser des analyses complémentaires (NGS), et a donc été retirée du tube dès l'arrivée du prélèvement au laboratoire, ce qui pourrait diminuer la qualité de conservation du prélèvement. De plus, le dépistage de routine est réalisé sur une gélose au sang additionnée d'antibiotiques ainsi que sur un milieu chromogène sélectif. Le contact de l'écouvillon primaire avec une petite quantité d'antibiotiques pourrait être un élément limitant supplémentaire. À l'inverse, parmi les 56 échantillons dont le dépistage de *S. agalactiae* sur milieux sélectifs a été rendu négatif, une colonie de *S. agalactiae* a été identifiée à partir de la culture sur milieux non sélectifs (n°1). La culture non sélective utilise 3 géloses incubées sous 3 atmosphères différentes, contre 1 gélose *biplate* pour la culture sélective, offrant alors une plus grande surface de contact de l'écouvillon avec les géloses et permettant la réalisation d'un meilleur isolement en quadrant, améliorant ainsi les chances de cultiver la bactérie d'intérêt. Le principal avantage des milieux sélectifs réside dans leur utilisation sur des prélèvements polymicrobiens, potentiellement riches en diverses bactéries facilement cultivables, qui pourraient masquer la bactérie d'intérêt sur géloses au sang classiques. Néanmoins, cela démontre bien que la méthode utilisée pour dépister le portage de *S. agalactiae* au laboratoire n'a pas une sensibilité de 100%. Des études sont menées pour évaluer des méthodes de dépistage alternatives, comme par exemple la LAMP (*Loop mediated isothermal amplification*) qui se révèle efficace en particulier lorsqu'un résultat rapide est nécessaire, et présente des bons paramètres de sensibilité et de spécificité (47) ; ou encore la PCR rapide GeneXpert® qui présente de bons paramètres de sensibilité et de spécificité, améliorés par l'enrichissement du prélèvement en bouillon (48). Or, ces méthodes sont coûteuses et ne permettent pas d'étudier la sensibilité de *S. agalactiae* aux antibiotiques lors de dépistages positifs, dont l'intérêt est majeur chez les femmes allergiques aux bêta-lactamines.

Les techniques de biologie moléculaire sont de plus en plus utilisées en routine et remplacent parfois les méthodes culturales conventionnelles. L'étude comparative de l'analyse culturale et du séquençage NGS à partir des prélèvements vaginaux a montré quelques différences, en particulier concernant les bactéries appartenant à la flore cutanée, comme les *Staphylococcus* spp, ou encore les *Corynebacterium* spp. La culture a révélé la présence de ces bactéries dans 41% des prélèvements, tandis que l'analyse de ces mêmes prélèvements par séquençage haut débit ne les a pas mises en évidence. Ces résultats doivent être nuancés car certaines bactéries appartenant à la flore cutanée, notamment les *Staphylococcus* spp et les *Corynebacterium* spp., cultivent facilement sur milieux non sélectifs et forment des grandes colonies bien visibles. Elles sont alors facilement repérables, même lorsqu'elles sont présentes en faible quantité. Or, il est tout à fait possible que les bactéries présentes en faible abondance dans les prélèvements soient masquées lors de l'étape de PCR, amplifiant préférentiellement les espèces particulièrement prédominantes. L'analyse des échantillons par séquençage haut débit 16S s'est montrée moins performante que la culture sur milieux gélosés non sélectifs pour mettre en évidence *S. agalactiae* à partir des prélèvements vaginaux. Parmi les 5 dépistages positifs en routine testés parallèlement en culture classique et en NGS (n°157, n°158, n°169, n°180 et n°182), seulement 2 se sont révélés positifs en NGS (n°158 et n°182) contre le double en culture (n°157, n°158, n°169 et n°182). Cette différence est probablement liée à la faible quantité de *S. agalactiae* dans les prélèvements initiaux. Outre les performances médiocres de l'analyse NGS ciblée pour détecter la présence de *S. agalactiae* dans un prélèvement vaginal, le séquençage de l'ADN 16S ribosomal par technologie Nanopore® présente également un manque de sensibilité important pour l'amplification et l'identification des *Bifidobacteriaceae*. Or, cette famille comprend les *Bifidobacterium* spp. pouvant appartenir à la flore vaginale normale mais également *Gardnerella vaginalis*, dont la prolifération est l'un des marqueurs de vaginose bactérienne (Figure 21).

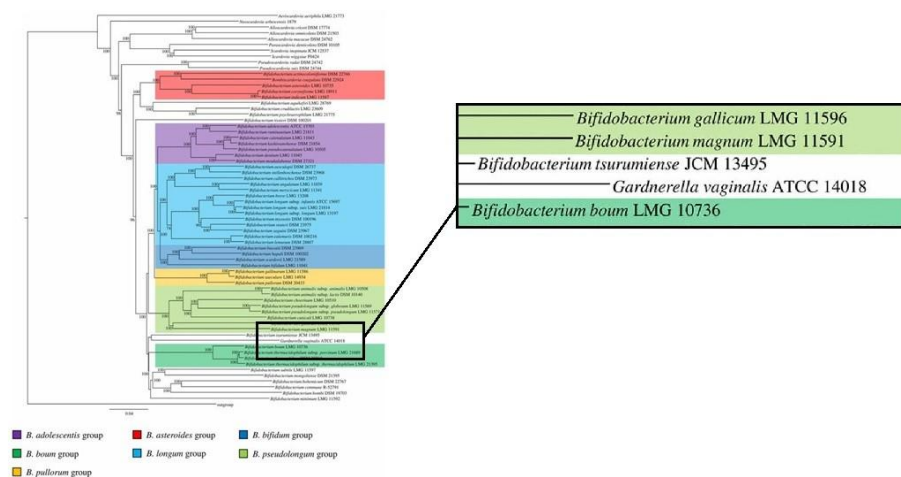


Figure 21 : Représentation de la famille des *Bifidobacteriaceae* sous forme d'arbre phylogénique
- D'après Lugli *et al.* 2017 (48)

A ce jour, l'analyse des prélèvements vaginaux n'est pas réalisée en routine par les nouvelles techniques de séquençage. Elles permettent une classification précise des différents types de flore en fonction des espèces prédominantes mais ne sont pas adaptées à la pratique quotidienne (1,11). Certaines flores vaginales ne présentent pas de corrélation avec les principaux microbiomes décrits, en particulier chez la femme ménopausée ou la femme en *post-partum* dont la flore vaginale est pauvre en *Lactobacillus* et recolonisée par une flore de proximité. De même, les flores normales largement dominées par des espèces de *Lactobacillus* inhabituelles comme *L. rhamnosus* ou encore *L. fermentum* n'entrent dans aucune catégorie. Le diagnostic d'affections vaginales en routine est basé sur la réalisation d'un examen direct microscopique associé à une culture bactérienne non sélective. L'ED est l'examen de référence pour diagnostiquer une vaginose bactérienne, tandis que la culture est utile pour identifier un ou des pathogène(s) spécifique(s). De plus, une relecture et une correction de l'examen direct est parfois nécessaire suite aux résultats de la culture bactérienne. L'observation d'un prélèvement à l'examen direct après coloration de Gram est une technique rapide mais son interprétation demeure opérateur-dépendant. Malgré une multiplicité de scores et classifications visant à catégoriser la flore vaginale à partir de l'examen direct des sécrétions, la coloration de Gram demeure un outil imparfait. Chaque score utilise des critères valables dans la majorité des cas, mais certaines flores restent inclassables. Tous les scores existants prennent en considération un petit nombre de critères et sont donc réducteurs. Ils cherchent à sectoriser les différentes flores par souci de simplicité mais ne reflètent pas la grande diversité des flores vaginales. Dans ce contexte, des panels de PCR multiplex ont été développés en vue d'une utilisation en routine, pour s'affranchir des difficultés liées à la culture, mais également afin de rendre un résultat rapide, et favoriser une approche syndromique. Plusieurs pathogènes bactériens et parasitaires sont détectables et quantifiables simultanément, qu'ils soient cultivables ou non. Les PCR multiplex disponibles autorisent cependant moins de nuances que la culture bactérienne dans la description globale du microbiote, et sont plutôt basées sur la détection de pathogènes précis. Certains centres hospitaliers utilisent ces kits multiplex en routine pour le diagnostic d'affections vaginales, notamment de vaginoses bactériennes (49).

Historiquement, la définition de la VB est basée sur une forte desquamation, associée à une disparition totale de *Lactobacillus*, la présence de nombreuses bactéries du genre *Gardnerella*, et l'absence de leucocytes (8). Néanmoins, elle s'avère plus subtile que sa définition originelle. Par exemple, le genre *Gardnerella* n'a pas été détecté en culture dans 5 prélèvements parmi les 9 flores de vaginose. Cette dysbiose se définirait donc plutôt comme une prolifération de bactéries anaérobies variées. L'absence de leucocyte est également un paramètre inconstant dans la VB. En effet, 3 prélèvements qualifiés de vaginoses possédaient des leucocytes à l'ED. Or, certaines bactéries composant la flore de vaginose ont la capacité de dégrader la couche de mucine protectrice de l'épithélium vaginal, qui est alors exposé à l'environnement extérieur (Figure 22), associé à l'activité cytolytique bactérienne. Cela explique qu'il y ait une inflammation locale et un recrutement de leucocytes qui sont alors visualisables dans les sécrétions vaginales.

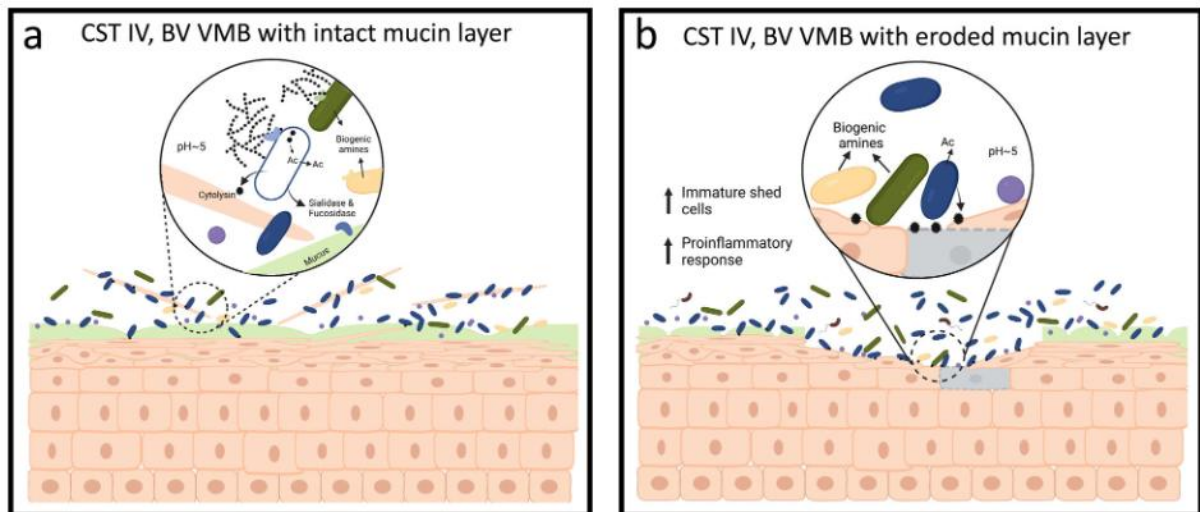


Figure 22 : Représentation des différents mécanismes de développement de vaginoses bactériennes - D'après France *et al.* 2022 (11)

Un autre paramètre aujourd'hui connu pour être inconstant dans la VB est l'absence complète de *Lactobacillus* spp. Dans notre travail, une flore de vaginose possédait du *L. iners* (n°26), connu pour être l'espèce de *Lactobacillus* la moins protectrice (14). D'autres espèces peuvent être retrouvées dans les vaginoses, notamment des *Lactobacillus* non strictement humains. Dans cette étude, 12 patientes, soit 17% possédaient une ou plusieurs espèces inhabituelles de *Lactobacillus* et 3 d'entre elles ne présentaient aucune espèce de *Lactobacillus* strictement humaines associée. Certaines espèces de *Lactobacillus* inhabituelles proviennent de produits laitiers et/ou de probiotiques. Les effets d'une consommation de ces produits sur la composition de la flore vaginale ne sont pas totalement élucidés et ne semblent pas apporter de bénéfice particulier pour maintenir une flore protectrice. Or, il apparait clairement que *L. crispatus* reste l'espèce avec les meilleures capacités de protection contre la colonisation par des bactéries diverses pouvant déstabiliser la flore vaginale. La diversité génétique des différents clones de *L. crispatus* au sein d'une population donnée est un élément permettant la compréhension de sa capacité à maintenir une faible diversité bactérienne globale (Figure 23).

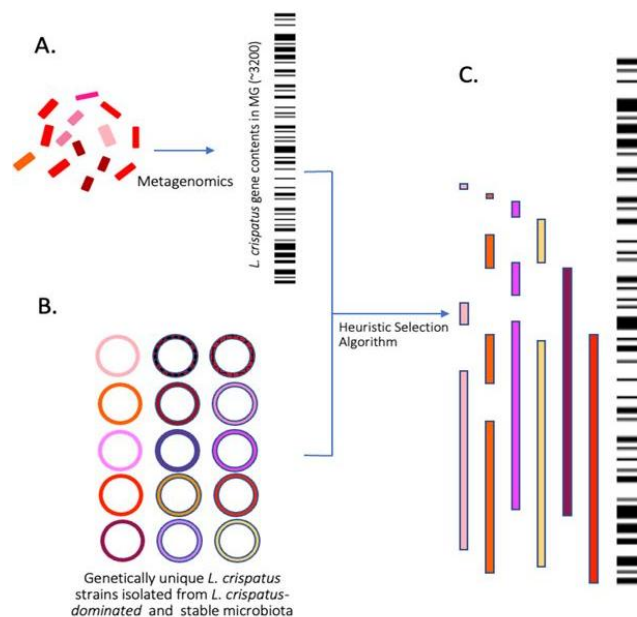


Figure 23 : Diversité génétique de *Lactobacillus crispatus* - D'après Ravel 2024

Par ailleurs, le traitement actuel de la vaginose bactérienne est basé sur l'utilisation d'antibiotiques, principalement le métronidazole ou la clindamycine, permettant une résolution à court terme de l'épisode. Néanmoins, 50 à 80% des femmes récidivent dans les 6 à 12 mois qui suivent, en partie à cause de l'incapacité des *Lactobacillus* protecteurs à recoloniser la cavité vaginale (50). Les femmes possédant *L. iners* dans leur flore se recolonisent fréquemment avec cette espèce, moins protectrice, qu'avec les autres espèces de *Lactobacillus* en post-traitement (51). Un essai randomisé croate sur 544 femmes a démontré une efficacité des probiotiques oraux pour restituer un microbiote vaginal riche en *Lactobacillus* chez les femmes atteintes de VB (52). Le groupe de femmes ayant bénéficié de probiotiques contenant notamment *L. rhamnosus*, a présenté un taux de restitution du microbiote à six semaines de 61,5% contre 26,9% dans le groupe placebo. Cependant, aucune étude ne compare l'administration de ces probiotiques au traitement antibiotique classique (50). Des données israéliennes récentes suggèrent qu'une transplantation de microbiote vaginal à partir de sécrétions vaginales de donneuses saines serait une solution plus intéressante pour lutter contre les récidives de VB (53). La transplantation introduit tout un microbiome, contrairement aux probiotiques qui introduisent un nombre réduit d'espèces bactériennes. Cela permet une réorientation de la flore et un rééquilibrage du microbiote mais avant d'envisager la transplantation de microbiote vaginal en clinique, des données supplémentaires sont nécessaires. Enfin, des produits bio-thérapeutiques vivants (PBV) sont actuellement en cours de développement, notamment à travers l'essai clinique VIBRANT. Ce concept est fondé sur la meilleure probabilité de recolonisation à long terme d'un traitement multisouches au sein d'une population de femmes hétérogène (Figure 24).

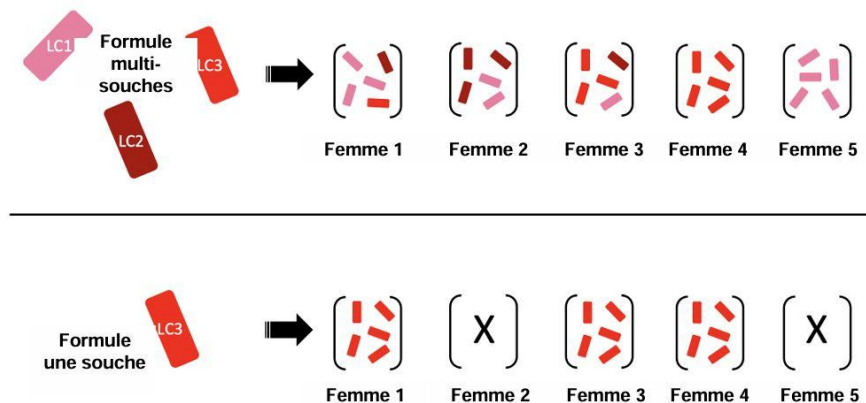


Figure 24 : Réponses des différentes hôtes en fonction de la formule des PBV - D'après Ravel 2024

Une étude américaine sur 228 femmes atteintes de vaginose s'est intéressée à l'effet de l'administration d'une association de plusieurs souches de *Lactobacillus crispatus* pendant 11 semaines par voie vaginale, après un traitement antibiotique (54,55). Il s'avère qu'à 12 semaines, l'incidence des récives est de 30% dans le groupe test contre 45% dans le groupe placebo. A 24 semaines, des souches de *L. crispatus* introduites ont été détectées chez 48% des femmes du groupe test contre seulement 2% dans le groupe placebo. L'administration par voie vaginale après traitement antibiotique, d'une association de plusieurs souches de *L. crispatus*, est donc efficace pour diminuer les récives de vaginose, du fait de la capacité de cette espèce à maintenir un environnement stable.

L'évaluation de l'efficacité de ces nouvelles thérapeutiques nécessite l'emploi de techniques précises avec un suivi longitudinal, l'idéal étant la métagénomique *shotgun*. Cette approche non ciblée a l'avantage de détecter les agents bactériens, mais aussi parasitaires tels que *Trichomonas vaginalis*, et fongiques tels que *Candida* spp. Les levures, peuvent être responsables de mycoses vaginales et leur mise en évidence de levures est un outil d'aide au diagnostic, en particulier par la visualisation de pseudo-filaments à l'examen direct, toujours à confronter aux données cliniques pour poser un diagnostic. De plus, le séquençage non ciblé conserve les proportions réelles des micro-organismes présents dans l'échantillon et permet de mieux identifier des bactéries en faibles quantités que le séquençage ciblé. La métagénomique *shotgun* offre également la possibilité de réaliser des analyses du transcriptome, *via* un séquençage des ARN, utile pour comparer une situation pathologique à une situation de référence en mettant en évidence l'activation des différentes voies de signalisation.

Pour conclure, la culture bactérienne prolongée sur milieux non sélectifs a bien permis de décrire la diversité du microbiote vaginal en espèces bactériennes, avec une bonne exhaustivité. En revanche, aucun lien n'a été montré entre l'appartenance à ces communautés bactériennes et la colonisation à *S. agalactiae*. L'étude réalisée n'a mis en évidence aucun facteur particulier associé à la colonisation à *S. agalactiae*. L'analyse complémentaire par métagénomique 16S réalisée sur une sous-partie des échantillons ne s'est pas révélée plus exhaustive que la culture, mais complémentaire, permettant la détection d'espèces différentes. La culture associée au séquençage 16S a donc permis une description précise de la composition des différentes communautés bactériennes chez la femme enceinte.

Bibliographie

1. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;DOI:10.1073/pnas.1002611107.
2. Moyes RB, Reynolds J, Breakwell DP. Differential Staining of Bacteria: Gram Stain. *Curr Protoc Microbiol*. 2009;DOI:10.1002/9780471729259.mca03cs15.
3. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KCS, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*. 1983;DOI:10.1016/0002-9343(83)91112-9.
4. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol*. 1983;DOI:0095-1137/83/070170-08\$02.00/0.
5. SFM - Société française de microbiologie. REMIC Référentiel en microbiologie médicale. 7^e éd. 2022.
6. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol*. 1991;DOI:0095-1137/91/020297-05\$02.00/0.
7. Ison C, Hay P. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2002;DOI:10.1136/sti.78.6.413.
8. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1955;DOI:10.1016/0002-9378(55)90095-8.
9. La Scola B. Nouvelle technique d'étude du microbiote : la culturomique. *Rev Francoph Lab*. 2015;DOI:10.1016/S1773-035X(15)72825-X.
10. Lagier JC, Raoult D. Culturomics : une méthode d'étude du microbiote humain. *Med Sci Paris*. 2016;DOI :10.1051/medsci/20163211004.
11. France MT, Ma B, Gajer P, Brown S, Humphrys MS, Holm JB, et al. VALENCIA: a nearest centroid classification method for vaginal microbial communities based on composition. *Microbiome*. 2020;DOI:10.1186/s40168-020-00934-6.
12. France M, Alizadeh M, Brown S, Ma B, Ravel J. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. *Nat Microbiol*. 2022;DOI:10.1038/s41564-022-01083-2.
13. Baud A, Hillion KH, Plainvert C, Tessier V, Tazi A, Mandelbrot L, et al. Microbial diversity in the vaginal microbiota and its link to pregnancy outcomes. *Sci Rep*. 2023;DOI:10.1038/s41598-023-36126-z.
14. Novak J, Ravel J, Ma B, Ferreira CST, Tristão A da R, Silva MG, et al. Characteristics associated with *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota. *Sex Transm Infect*. 2022;DOI:10.1136/sextrans-2020-054824.
15. Zana J. Bacterial vaginosis: what risks for the mother and child? *Rev Fr Gynecol Obstet*. 1993;

16. Serrano MG, Parikh HI, Brooks JP, Edwards DJ, Arodz TJ, Edupuganti L, et al. Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nat Med*. 2019;DOI:10.1038/s41591-019-0465-8.
17. Rasmussen MA, Thorsen J, Dominguez-Bello MG, Blaser MJ, Mortensen MS, Brejnrod AD, et al. Ecological succession in the vaginal microbiota during pregnancy and birth. *ISME J*. 2020;DOI:10.1038/s41396-020-0686-3.
18. Euro-Peristat. European perinatal health report from 2015 to 2019.
19. Vogel JP, Chawanpaiboon S, Moller AB, Watananirun K, Bonet M, Lumbiganon P. The global epidemiology of preterm birth. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;DOI:10.1016/j.bpobgyn.2018.04.003.
20. Mohanty T, Doka PP, Khuroo SR. Effect of bacterial vaginosis on preterm birth: a meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*. 2023;DOI:10.1007/s00404-022-06817-5.
21. Menard JP, Bretelle F. Vaginose bactérienne et accouchement prématuré. *Gynécologie Obstétrique Fertil*. 2012;DOI:10.1016/j.gyobfe.2011.11.004.
22. Brabant G. Vaginose bactérienne et prématurité spontanée. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2016;DOI:10.1016/j.jgyn.2016.09.014.
23. Collège National des Gynécologues et Obstétriciens Français. *J Gynécologie Obstétrique Biol Reprod*. 2005;DOI:10.1016/S0368-2315(05)82867-4.
24. Allen SR : Epidemiology of premature rupture of the fetal membranes. *Clin Obstet Gynecol*. 1991.
25. Currie S. Recommandations de l’OMS sur les interventions visant à améliorer l’issue des naissances prématurées. 2015
26. Yasmina A, Barakat A. Rupture prématurée des membranes à terme: facteurs pronostiques et conséquences néonatales. *Pan Afr Med J*. 2017;DOI:10.11604/pamj.2017.26.68.11568.
27. Agence Nationale d’Accréditation et d’Évaluation en Santé (ANAES). Diagnostic et traitement curatif de l’infection bactérienne précoce du nouveau-né. *Arch Pédiatrie*. 2003;DOI:10.1016/S0929-693X(03)00163-5.
28. Collège national des gynécologues et obstétriciens français. La menace d’accouchement prématuré (MAP) à membranes intactes. 2002.
29. HAS. Prévention antenatale du risque infectieux bactérien. 2001.
30. Quentin R, Musser JM, Mellouet M, Sizaret PY, Selander RK, Goudeau A. Typing of urogenital, maternal, and neonatal isolates of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae* in correlation with clinical source of isolation and evidence for a genital specificity of *H. influenzae* biotype IV. *J Clin Microbiol*. 1989;DOI:0095-1137/89/102286-09\$02.00/0.
31. Cazanave C, De Barbeyrac B. Les infections génitales hautes : diagnostic microbiologique. *Gynécologie Obstétrique Fertil Sénologie*. 2019;DOI:10.1016/j.gofs.2019.03.007.

32. Six A, Joubrel C, Tazi A, Poyart C. Maternal and perinatal infections to *Streptococcus agalactiae*. Presse Medicale Paris Fr 1983. 2014;DOI:10.1016/j.lpm.2014.04.008.
33. Vornhagen J, Adams Waldorf KM, Rajagopal L. Perinatal group B streptococcal infections : virulence factors, immunity and prevention strategies. Trends Microbiol. 2017;DOI:10.1016/j.tim.2017.05.013.
34. Raabe VN, Shane AL. Group B *Streptococcus (Streptococcus agalactiae)*. Microbiol Spectr. 2019;DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0007-2018.
35. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in european countries. Acta Obstet Gynecol Scand. 2008;DOI:10.1080/00016340801908759.
36. Tazi A, Morand PC, Réglier-Poupet H, Dmytruk N, Billoët A, Antona D, et al. Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007–2010). Clin Microbiol Infect. 2011;DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03628.x.
37. Tazi A, Disson O, Bellais S, Bouaboud A, Dmytruk N, Dramsi S, et al. The surface protein HvgA mediates group B *Streptococcus* hypervirulence and meningeal tropism in neonates. J Exp Med. 2010;DOI:10.1084/jem.20092594.
38. Six A, Bellais S, Bouaboud A, Fouet A, Gabriel C, Tazi A, et al. Srr2, a multifaceted adhesin expressed by ST-17 hypervirulent group B *Streptococcus* involved in binding to both fibrinogen and plasminogen. Mol Microbiol. 2015;DOI:10.1111/mmi.13097.
39. Lartigue MF. *Streptococcus agalactiae*. Société française de microbiologie 2019.
40. Epibac : surveillance des infections invasives bactériennes. Bulletin. Édition nationale. Février 2024. Saint-Maurice : Santé publique France, 12 p. Directrice de publication : Caroline Semaille.
41. Madrid L, Seale AC, Kohli-Lynch M, Edmond KM, Lawn JE, Heath PT, et al. Infant group B streptococcal disease incidence and serotypes worldwide: systematic review and meta-analyses. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2017;DOI:10.1093/cid/cix656.
42. Tazi A, Joubrel C, Six A, Dmytruk N, Touak G, Poyart C. Infections néonatales à *Streptococcus agalactiae* : épidémiologie, physiopathologie et diagnostic biologique. Feuille Biol. 2015;
43. Boyer KM, Gadzala CA, Kelly PD, Burd LI, Gotoff SP. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. J Infect Dis. 1983;DOI:10.1093/infdis/148.5.802.
44. Rapport annuel d'activité 2023 Centre national de référence streptocoques. Santé Publique France.
45. Rosen GH, Randis TM, Desai PV, Sapra KJ, Ma B, Gajer P, et al. Group B *Streptococcus* and the vaginal microbiota. J Infect Dis. 2017;DOI:10.1093/infdis/jix395.
46. Shabayek S, Abdellah AM, Salah M, Ramadan M, Fahmy N. Alterations of the vaginal microbiome in healthy pregnant women positive for group B *Streptococcus* colonization during the third trimester. BMC Microbiol. 2022;DOI:10.1186/s12866-022-02730-8.

47. Lemaire C, Cheminet M, Duployez C, Artus M, Ballaa Y, Devos L, et al. A LAMP-based assay for the molecular detection of group B *Streptococcus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2023;DOI:10.1007/s10096-023-04656-z.
48. Buchan BW, Faron ML, Fuller D, Davis TE, Mayne D, Ledebor NA. Multicenter clinical evaluation of the Xpert GBS LB assay for detection of group B *Streptococcus* in prenatal screening specimens. J Clin Microbiol. 2015;DOI:10.1128/JCM.02598-14.
49. Rumyantseva T, Shipitsyna E, Guschin A, Unemo M. Evaluation and subsequent optimizations of the quantitative AmpliSens Florocenosis/Bacterial vaginosis-FRT multiplex real-time PCR assay for diagnosis of bacterial vaginosis. APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand. 2016;DOI:10.1111/apm.12608.
50. Abbe C, Mitchell CM. Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention. Front Reprod Health. 2023;DOI:10.3389/frph.2023.1100029.
51. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. PLOS One. 2010;DOI:10.1371/journal.pone.0010197.
52. Vujic G, Knez AJ, Stefanovic VD, Vrbancovic VK. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2013;DOI:10.1016/j.ejogrb.2012.12.031.
53. Lev-Sagie A, Goldman-Wohl D, Cohen Y, Dori-Bachash M, Leshem A, Mor U, et al. Vaginal microbiome transplantation in women with intractable bacterial vaginosis. Nat Med. 2019;DOI:10.1038/s41591-019-0600-6.
54. Cohen CR, Wierzbicki MR, French AL, Morris S, Newmann S, Reno H, et al. Randomized trial of Lactin-V to prevent recurrence of bacterial vaginosis. N Engl J Med. 2020;DOI:10.1056/NEJMoa1915254.
55. Armstrong E, Hemmerling A, Miller S, Huibner S, Kulikova M, Crawford E, et al. Vaginal *Lactobacillus crispatus* persistence following application of a live biotherapeutic product: colonization phenotypes and genital immune impact. Microbiome. 2024;DOI:10.1186/s40168-024-01828-7.

Annexes

Tableau V : Tableau des résultats

N = Nombreux / P = Présence / R = Rare / A = Absence

N°	Résultats dépistage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
1	-	N	R	P	N	Intermédiaire	/	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Finegoldia magna</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Micrococcus luteus</i> <i>Corynebacterium freneyi</i>	Normale CST II
2	-	N	A	A	N	Normale	Rares diplocoques Gram +	<i>Actinomyces neuii</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	/	Normal CST indéterminé
7	+	N	A	A	N	Normale	Présence diplocoques Gram + Rares Cocci Gram +	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Micrococcus luteus</i>	/	Normale CST I
11	-	N	A	A	A	Vaginose	Présence petits bacilles Gram variable Rares cocci Gram	<i>Gardnerella vaginalis</i> <i>Fannyhessea vaginalis</i>	/	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Vaginose CST IV
12	-	N	P	A	N	Normale	Petits bacilles Gram -	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	/	Normale CST V
14	-	R	A	R	P	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus condimenti</i>	Normale CST II
15	-	P	R	A	P	Intermédiaire	Petits bacilles Gram variable	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Corynebacterium</i>	/	Intermédiaire
16	-	R	N	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus iners</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	/	/	Normale CST indéterminé
17	+	P	N	A	P	Intermédiaire	Nombreux diplo	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Alloscandavia omnicolens</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	/	Intermédiaire
18	-	P	A	A	R	/	Présence chainettes Gram +	/	<i>Peptoniphilus spp.</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i>	Intermédiaire
26	-	N	R	A	A	Vaginose	Rares diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus iners</i> <i>Finegoldia magna</i> <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Corynebacterium acrimucosum</i>	/	Vaginose CST IV
27	-	P	R	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	/	/	Normale CST I

N = Nombreux / P = Présence / R = Rare / A = Absence

N°	Résultats dépistage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
28	+	P	N	A	N	Normale		<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus condimentii</i>	Normale CST indéterminé
29	-	N	P	A	R	Vaginose	Rares diplocoques Gram + Nombreux bacilles Gram +/-	/	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	/	Vaginose CST IV
30	-	N	P	A	P	Normale	/	<i>Lactobacillus iners</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Fediococcus acidilactici</i>	/	Normale CST indéterminé
31	-	N	A	R	N	Normale	Rares diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Prevotella corporis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale CST II
32	-	P	A	A	A	Vaginose	Petits bacilles Gram - Rares cocci Gram +	<i>Streptococcus anginosus</i> <i>Actinomyces turicensis</i>	<i>Escherichia coli</i>	/	Vaginose CST IV
33	-	N	R	A	P	Intermédiaire	Présence <i>Elfidobacterium</i> Rares cocci Gram + Présence bacilles Gram -	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Finagoldia magna</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	Intermédiaire
35	-	N	A	A	R	Intermédiaire	Présence diplocoques Gram + Présence bacilles Gram +	/	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i>	/	Intermédiaire
64	+	N	P	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i>	Normale CST indéterminé
65	-	N	A	A	R	Vaginose	Nombreuses GVA Rares diplocoques Gram +	Echec d'identification	/	<i>Corynebacterium coyleae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Vaginose CST IV
66	-	N	A	A	P	Normale	Bacilles Gram + fins Petits coco-bacilles gram +/-	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Veillonella parvula</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale CST V

N = Nombreux / P = Présence / R = Rare / A = Absence

N°	Résultats dépistage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
67	-	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Escherichia coli</i>	Normale CST V
68	-	N	N	A	N	Normale	Rares <i>Bifidobacterium</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i>	/	<i>Staphylococcus hominis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale CST V
103	-	N	R	A	P	Normale	Quelques diplocoques Gram + Quelques petits bacilles Gram -	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Gardnerella leopoldi</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	Normale CST V
104	+	N	A	A	A	/	Présence diplocoques Gram +	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Kocuria rhizophila</i>	/	Type IV CST IV
105	-	P	N	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium aurimucosum</i> <i>Streptococcus anginosus</i>	/	Normale CST V
106	-	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Candida albicans</i>	/	Normale CST III
107	-	N	A	Filaments et levures : rares	P	Normale	Rares cocci Gram +	<i>Lactobacillus iners</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale CST III
108	-	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	Normale CST I
109	+	P	A	A	P	Normale	Présence de chainettes Gram +	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Escherichia coli</i>	Normale CST V
110	-	N	P	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	/	Normale CST I
111	-	N	P	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i>	Normale CST I
112	-	P	R	A	R	Vaginose	Présence petits bacilles Gram +/- Présence <i>Mobiluncus</i>	<i>Gardnerella spp.</i> <i>Aerococcus christensenii</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Corynebacterium tuberculoostearicum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus pasteurii</i>	Vaginose CST IV

N°	Résultats dépistage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
113	+	N	R	A	P	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Moraxella osloensis</i>	<i>Candida albicans</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Normale CST II
114	-	N	R	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>	/	/	Normale Absence de classification en
115	-	P	A	A	P	Normale	Présence de petites chainettes Gram +	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	/	Normale CST II
116	-	P	P	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Candida glabrata</i>	/	Normale CST I
117	-	N	N	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	Normale CST I
118	-	N	A	A	P	Normale	Présence diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus paracasei</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale Absence de classification en CST
119	+	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i> <i>Kocuria rhizophila</i>	Normale CST I
120	-	P	N	A	N	Normale	Quelques diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus crispatus</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	Normale CST I
142	+	N	N	R	N	Normale	Présence diplocoques	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Corynebacterium</i> <i>tuberculoostearicum</i>	Normal CST indéterminé
143	-	R	A	R	P	Intermédiaire	Présence diplocoques Gram + Présence bacilles Gram +	/	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Corynebacterium coyleae</i> <i>Corynebacterium</i> <i>aurimucosum</i> <i>Corynebacterium riegliei</i>	<i>Anaerococcus mundochii</i> <i>Corynebacterium</i> <i>amycolatum</i> <i>Dialister microaerophilus</i> <i>Campylobacter ureolyticus</i>	Intermédiaire
144	-	N	N	A	N	Normale	Rare cocci Gram +	<i>Alloscardovia omnicolens</i> <i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Campylobacter ureolyticus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Normale CST indéterminé

N°	Résultats dépiſtage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
145	-	N	A	A	N	Normale	Petits bacilles Gram -	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>	/	<i>Gardnerella leopoldii</i> <i>Dialister microaerophilus</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i>	Normale CST indéterminé
146	-	P	A	A	N	Intermédiaire	Rare diplocoques Gram + Présence petits bacilles Gram -	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Finexgoldia magna</i> <i>Mobiluncus spp.</i> <i>Peptoniphilus spp.</i>	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Corynebacterium amycolatum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Cutibacterium avidum</i> <i>Corynebacterium aurimucosum</i>	Intermédiaire
156	-	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus</i>	/	Normale CST V
157	+	P	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium coyleae</i> <i>Staphylococcus simulans</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Morganella morganii</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Normale CST II
158	+	P	N	Filaments : rares	A	Vaginose	Présence petits bacilles Gram +/- Nombreux bacilles Gram + Rares chainettes Gram +	<i>Gardnerella spp.</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Candida albicans</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>Staphylococcus simulans</i> <i>Clostridium perfringens</i>	Vaginose CST IV
159	-	N	R	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Finexgoldia magna</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus hominis</i> <i>Escherichia coli</i>	Normale CST V
160	-	P	A	A	P	Normale	Rares diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cutibacterium avidum</i> <i>Staphylococcus</i>	/	Normale CST II

N°	Résultats dépiage & <i>agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
161	-	N	A	A	A	/	Rares diplocoques Gram + Rares cocci Gram	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	Autre CST IV
162	-	N	R	A	N	Normale	Rares cocci Gram + Petits bacilles	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactobacillus amylovorus</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	/	Normale Absence de classification en
163	-	N	P	A	P	Intermédiaire	/	<i>Finagoldia magna</i> <i>Alloscardovia omnicolens</i> <i>Actinomyces neuii</i> <i>Corynebacterium</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i> <i>Streptococcus</i>	/	Vaginose CST IV
164	-	N	R	A	R	Vaginose	/	<i>Gardnerella vaginalis</i>	/	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Vaginose CST IV
165	-	N	A	A	P	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	/	Normale CST II
167	-	P	R	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i>	/	<i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus condimentii</i>	Normale CST II
168	-	P	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i> <i>Lactobacillus jensenii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	/	Normale CST indéterminé
169	+	N	A	A	P	Intermédiaire	/	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Streptococcus urinalis</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Candida albicans</i> <i>Cutibacterium avidum</i>	/	Intermédiaire
170	-	P	R	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus crispatus</i>	/	<i>Staphylococcus hominis</i>	Normale CST I
171	-	P	A	A	P	Normale	Présence bacilles Gram - Rares diplocoques	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus crispatus</i>	/	/	Normale CST I
178	-	P	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus jensenii</i> <i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Normale CST indéterminé
179	-	N	N	A	P	Intermédiaire	Présence petits bacilles Gram +/-	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Aerococcus urinae</i>	<i>Elifidobacterium breve</i> <i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i>	Intermédiaire

N°	Résultats dépistage <i>S. agalactiae</i>	Résultats examen direct						Résultats culture			Type de flore en culture
		Cellules épithéliales	Leucocytes	Levures	Flore de Döderlein	Type de flore	Autres	Microorganisme(s) majoritaire(s)	Microorganisme(s) d'abondance relative	Microorganisme(s) rare(s)	
180	+	N	P	A	A	/	Nombreux bacilles Gram - fins Rares bacilles Gram +	<i>Lactobacillus iners</i>	/	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Corynebacterium</i> <i>tuscaniense</i>	Normale CST III
181	-	P	A	R	R	Normale	Présence bacilles Gram -	<i>Lactobacillus iners</i> <i>Candida albicans</i>	/	/	Normale CST III
182	+	N	A	A	P	Normale	Rares diplocoques Gram +	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i>	/	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>haemolyticus</i>	Normale CST II
183	-	N	A	A	N	Normale	/	<i>Lactobacillus gasseri</i> <i>Actinomyces neuii</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Corynebacterium</i> <i>tuberculoosteum</i> <i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	/	Normale CST II
184	-	N	R	A	P	Intermédiaire	Petits bacilles Gram - Rares	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	/	<i>Staphylococcus</i> <i>epidermidis</i> <i>Corynebacterium</i>	Intermédiaire
185	-	N	A	A	A	/	Bacilles Gram +/- Présence bacilles Gram +	<i>Lactobacillus jensenii</i>	/	<i>Corynebacterium</i> <i>amycolatum</i> <i>Staphylococcus hominis</i>	Normale CST V

Tableau VI : Tableau des espèces identifiées

Genre	Espèce	Nombre d'identifications dans la population étudiée
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus gasseri</i>	20
	<i>Lactobacillus jensenii</i>	18
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	16
	<i>Lactobacillus iners</i>	7
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	5
	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	3
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2
	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1
<i>Elifidobacterium</i>	<i>Elifidobacterium breve</i>	2
<i>Gardnerella</i>	<i>Gardnerella</i> spp.	2
	<i>Gardnerella vaginalis</i>	3
	<i>Gardnerella leopoldii</i>	2
<i>Enterococcus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	33
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	12
	<i>Streptococcus anginosus</i>	2
	<i>Streptococcus mitis/oralis</i>	1
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1
	<i>Streptococcus urinalis</i>	1
Enterobactéries	<i>Escherichia coli</i>	11
	<i>Proteus mirabilis</i>	2
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
	<i>Morganella morganii</i>	1

Genre	Espèce	Nombre d'identifications dans la population étudiée
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19
	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	12
	<i>Staphylococcus hominis</i>	11
	<i>Staphylococcus condimentii</i>	3
	<i>Staphylococcus aureus</i>	2
	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2
	<i>Staphylococcus simulans</i>	2
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1
	<i>Staphylococcus cohnii</i>	1
<i>Corynebacterium</i>	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	13
	<i>Corynebacterium aurimucosum</i>	6
	<i>Corynebacterium coyleae</i>	3
	<i>Corynebacterium tuberculoastericum</i>	3
	<i>Corynebacterium freneyi</i>	2
	<i>Corynebacterium niegelii</i>	2
	<i>Corynebacterium phoceense</i>	1
	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	1
	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1
	<i>Corynebacterium avidum</i>	1
	<i>Corynebacterium tuscaniense</i>	1
<i>Candida</i>	<i>Candida albicans</i>	9
	<i>Candida glabrata</i>	1

Genre	Espèce	Nombre d'identifications dans la population étudiée
Autres	<i>Finnegoldia magna</i>	7
	<i>Alloscardovia omnicolens</i>	4
	<i>Actinomyces neuii</i>	3
	<i>Aerococcus urinae</i>	3
	<i>Cutibacterium avidum</i>	3
	<i>Campylobacter ureolyticus</i>	2
	<i>Dialister microaerophilus</i>	2
	<i>Kocuria rhizophila</i>	2
	<i>Micrococcus luteus</i>	2
	<i>Peptoniphilus</i> spp.	2
	<i>Actinomyces turicensis</i>	1
	<i>Aerococcus christensenii</i>	1
	<i>Anaerococcus hydrogenalis</i>	1
	<i>Anaerococcus murchii</i>	1
	<i>Bacteroides fragilis</i>	1
	<i>Clostridium perfringens</i>	1
	<i>Cutibacterium</i> spp.	1
	<i>Fannyhessea vaginae</i>	1
	<i>Mabicluncus</i> spp.	1
	<i>Moraxella osloensis</i>	1
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	1
	<i>Peptoniphilus lacrimalis</i>	1
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	1
	<i>Frevotella corporis</i>	1
	<i>Veillonella parvula</i>	1

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Carla LEROY

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature:



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N°Étudiant : 21604482

N° Thèse : 68

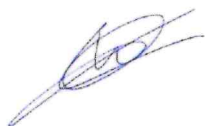
Nom et Prénom : Carla Leroy

Sujet : Étude du microbiote vaginal cultivable dans le cadre du dépistage systématique du portage de *Streptococcus agalactiae* chez la femme enceinte

Tours, le : 25/09/2024

Le(s) Directeur(s) de Thèse:
Nom(s) et signature(s)

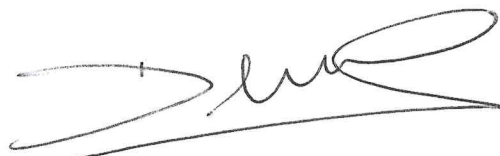
Dr. Brice LE GALLOU



Vu et Transmis:
Le Doyen

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant : LEROY Carla	N° 68
TITRE DE LA THÈSE Étude du microbiote vaginal cultivable dans le cadre du dépistage systématique du portage de <i>Streptococcus agalactiae</i> chez la femme enceinte	
RÉSUMÉ DE LA THÈSE L'exploration du microbiote vaginal par séquençage haut débit a permis à ce jour de caractériser cinq principales communautés bactériennes (CST). Une analyse conjointe par méthode conventionnelle associée au séquençage haut débit n'a jamais été réalisée et pourrait offrir une description plus exhaustive et rigoureuse, permettant de mieux caractériser le microbiote vaginal. De plus, aucune relation entre ces CST et le portage de bactéries responsables d'infections materno-fœtales telles que <i>Streptococcus agalactiae</i>, n'a pu être mise en évidence, et nécessite d'être explorée. L'objectif principal de ce travail était d'effectuer une description exhaustive du microbiote vaginal cultivable dans le cadre du dépistage systématique de <i>S. agalactiae</i> réalisé en fin de grossesse. En parallèle, une analyse par un séquençage haut débit ciblé sur l'ADNr 16S a été réalisée afin d'optimiser la description. Soixante-dix flores vaginales, dont quinze associées à un portage de <i>S. agalactiae</i>, ont été décrites par culture bactérienne prolongée jusqu'à 5 jours sur milieux non sélectifs, entre mars et juillet 2024. L'identification des bactéries cultivables a été réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Une sous-partie comprenant vingt-sept échantillons a également été analysée par métagénomique ciblée (technologie Nanopore®). Les deux méthodes comparées se sont révélées concordantes et complémentaires. Soixante-sept espèces bactériennes dont 9 espèces de <i>Lactobacillus</i> ont été identifiées à partir de 293 colonies différenciées. La colonisation vaginale par <i>S. agalactiae</i> ne semblait pas être associée à un CST en particulier, ni à une importante diversité bactérienne. Cependant, la description des différents microbiotes vaginaux a permis de confirmer <i>Lactobacillus crispatus</i> comme un facteur protecteur contre une prolifération bactérienne, notamment les anaérobies. Au contraire, <i>Lactobacillus gasseri</i> semblait être surreprésenté au sein des flores intermédiaires.	
MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY	
<u>JURY</u> PRÉSIDENT : Professeur Philippe LANOTTE – PU-PH, Faculté de pharmacie et CHRU de Tours MEMBRES : Professeur Franck PERROTIN - PU-PH, Faculté de médecine et CHRU de Tours Docteur Adeline PASTUSZKA – PH, CHRU de Tours <u>Docteur Brice LE GALLOU</u> – AHU, Faculté de médecine et CHRU de Tours	
DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : UFR Pharmacie (Tours), le vendredi 11 octobre 2024	