

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

VERSION CORRIGÉE

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
29 mai 2008 (29.05.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2008/062136 A9

(51) Classification internationale des brevets :  
C12Q 1/68 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/052368

(22) Date de dépôt international :  
20 novembre 2007 (20.11.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
0610313 24 novembre 2006 (24.11.2006) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
UNIVERSITE DE LA MEDITERRANEE (AIX-MAR-  
SEILLE II) [FR/FR]; Les Jardins du Pharo, 58 boulevard  
Charles Livon, F-13284 Marseille cedex 07 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :  
BRETELLE, Florence [FR/FR]; 32 rue Etienne Do-  
let, F-13014 Marseille (FR). FENOLLAR, Florence  
[FR/FR]; 352 avenue du Prado, F-13008 Marseille (FR).  
HENRY-MARY, Mireille [FR/FR]; 83 chemin de la  
Grande Carraire, F-13850 Greasque (FR). MENARD,  
Jean-Pierre [FR/FR]; 14 chemin des sables, F-06160  
Juan Les Pins (FR). RAOULT, Didier [FR/FR]; 16 rue de  
Lorraine, F-13008 Marseille (FR).

(74) Mandataire : DOMANGE, Maxime; Cabinet BEAU  
DE LOMENIE, 232 Avenue du Prado, F-13295 Marseille  
Cedex 08 (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,  
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,  
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,  
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,  
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,  
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,  
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,  
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre  
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale  
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-  
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-  
ponible sur demande auprès du Bureau international

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 10 juillet 2008

(48) Date de publication de la présente version corrigée:  
16 juillet 2009

(15) Renseignements relatifs à la correction:  
voir la Notice du 16 juillet 2009

(54) Title: METHOD FOR DIAGNOSIS OF AND FOLLOWING A BACTERIAL VAGINOSIS BY MOLECULAR QUANTIFI-  
CATION

(54) Titre : METHODE DE DIAGNOSTIC ET DE SUIVI D'UNE VAGINOSE BACTERIENNE PAR QUANTIFICATION MO-  
LECULAIRE

(57) Abstract: The invention relates to a method for diagnosis of and following *in vitro* of the condition of the vaginal flora with regard to the presence of a bacterial vaginosis and where necessary following the therapeutic treatment thereof, characterised in that the presence of a bacterial vaginosis or failure of the current therapeutic treatment is determined when the concentrations of specific sequences present in a single copy of the DNA of the bacteria *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis*, in the DNA extract of the vaginal secretion of a patient are such that at least the following two conditions a) and b) are met: a) the concentration Ca of said DNA fragment from *Atopobium vaginae* is greater than or equal to 108 copies/ml and b) the concentration Cg in said DNA fragment from *Gardnerella vaginalis* is greater than or equal to 109 copies/ml.

(57) Abrégé : La présente invention concerne une méthode de diagnostic et suivi *in vitro* de l'état de la flore bactérienne vaginale au regard de la présence d'une vaginose bactérienne, et le cas échéant pour le suivi de son traitement thérapeutique, caractérisée en ce que l'on détermine la présence d'une vaginose bactérienne ou l'échec du traitement thérapeutique en cours si les concentrations des séquences spécifiques présents en une seule copie dans l'ADN des bactéries *Atopobium vaginae* et respectivement *Gardnerella vaginalis*, dans l'ADN extrait d'un échantillon de sécrétion vaginale de patiente, sont telles que l'une au moins des 2 conditions a) et b) suivantes est respectée: a) la concentration Ca en dit fragment d'ADN d'*Atopobium vaginae* est supérieure ou égale à 108 copies/ml, et b) la concentration Cg en dit fragment d'ADN de *Gardnerella vaginalis* est supérieure ou égale à 109 copies/ml.



WO 2008/062136 A9

Méthode de diagnostic et de suivi d'une vaginose bactérienne par  
quantification moléculaire

La présente invention concerne une méthode de diagnostic et de suivi *in vitro* de l'état de la flore bactérienne vaginale au regard de la présence d'une vaginose bactérienne (VB) ou de son évolution, le cas échéant pour le suivi de sa prise en charge thérapeutique.

Les techniques actuelles de diagnostic de la VB, qui est une infection fréquente avec des conséquences néfastes pour la grossesse, reposent sur des critères qui sont peu fiables. Certaines bactéries ont été décrites comme étant associées à cette maladie, sans jamais avoir bénéficiées d'une qualification et d'une quantification moléculaire fiable.

Pendant longtemps, la VB a été définie du point de vue microbiologique par une quasi-disparition de la flore vaginale normale composée principalement de lactobacilles au profit d'autres bactéries, notamment *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus* spp. et mycoplasmes génitaux [Spiegel CA, CMR 1991 ; Thorsen P, AJGO 1998]. La VB est un motif fréquent de consultation médicale, elle est notamment impliquée dans la susceptibilité aux infections sexuellement transmissibles comme le VIH, et pour les grossesses dans la prématurité et la naissance d'enfants de petits poids. Sa prévalence chez la femme, y compris durant la grossesse, se situe entre 8 et 23% [Guise JM, AJPM 2001] selon les méthodes actuelles d'investigation.

Cependant, la revue de la littérature est divergente quant à l'impact de la prise en charge thérapeutique de cette pathologie. En effet, les premières études, qui avaient mis en évidence une réduction du risque d'accouchement prématuré lors du traitement de la VB, n'ont pu être confirmées [Morales HJ, AJOG 1994 ; Hauth JC, NEJM 1995 ; Guise JM, AJPM 2001 ; McDonald H, CDSR 2005 ; Varma R, EJOGRB 2006 ; Okun N, OG, 2005 ; Leitich H, AJOG 2003 ; Guerra B, EJOGRB 2006].

L'objectif initial de la présente invention était d'évaluer l'impact de la VB pendant la grossesse ainsi que l'efficacité de la prise en charge thérapeutique de la VB pendant la grossesse. Mais, pour ce faire aucun outil diagnostique objectif n'était disponible. En effet, l'étude de la  
5 littérature révèle une grande confusion concernant la prise en charge thérapeutique de la VB liée principalement à l'absence d'outil rationnel pour le diagnostic et le suivi de cette pathologie.

Actuellement, les deux outils diagnostiques disponibles sont le score de Nugent et les critères d'Amsel. Le score de Nugent est la méthode la  
10 plus couramment rapportée dans la littérature, considérée par certains comme la technique de référence, même si elle n'est pas réalisée en routine dans les laboratoires de microbiologie clinique du fait du caractère fastidieux de sa mise en œuvre [Fredricks DN, NEJM 2005 ; Thomason JL, AJOG 1992 ; Ison CA, STD 2002 ; Nugent RP, JCM 1991]. Le score de  
15 Nugent identifie la VB grâce à une analyse morphologique semi-quantitative des bactéries après coloration de Gram. C'est donc une technique subjective dont la reproductibilité a été mise en cause [Sha BE, JCM 2005 ; Schwebke JR, OG 1996]. Les critères cliniques d'Amsel (pH vaginal supérieur à 4,5 ; leucorrhées grisâtres homogènes adhérentes; odeur  
20 azotée après adjonction de KOH à 10%; présence de clue-cells) représentent la seconde approche diagnostique [Amsel R AJM 1983]. Comme le score de Nugent, il est de détermination délicate et non utilisé en pratique clinique courante.

Une des limites les plus péjoratives de ces méthodes diagnostiques  
25 est l'absence d'identification de certains microorganismes impliqués dans la VB. D'une part, l'absence de paroi des mycoplasmes ne permet pas leurs identifications par la coloration de Gram et donc leurs cotations par le score de Nugent. D'autre part, l'apport de la biologie moléculaire a permis d'identifier de nouvelles bactéries pouvant être impliquées dans la VB mais  
30 leur mise en évidence par les 2 méthodes diagnostiques existantes est impossible. *Atopobium vaginae* est la principale nouvelle espèce bactérienne caractérisée. Sa présence a été corrélée à la VB dans quelques articles sans

toutefois qu'une appréciation quantitative fiable de sa place relative par rapport aux autres microorganismes ait été réalisée [Bradshaw CS, JID 2006, Rodriguez JM, IJSB 1999 ; Ferris MJ, BMCID 2004 ; Ferris MJ, JCM 2004 ; Verhelst R, BMCM 2004].

5 Dans l'article publié récemment par Bradshaw et col. [Bradshaw CS, JID 2006], il est notamment décrit une relation entre la détection des bactéries *A. vaginae* et *G. vaginalis* et la VB, mais ces résultats sont insuffisants pour réaliser un diagnostic de VB et/ou un suivi de l'évolution  
10 d'une VB fiables. En effet, les données présentées dans ce travail permettent le dépistage desdites bactéries et non pas leur réelle quantification. De plus, ce dépistage a montré une bonne sensibilité, *A. vaginae* et *G. vaginalis* étant détectées respectivement chez 96% et 99% des patientes atteintes de VB. Cependant, sa spécificité est mauvaise car *A. vaginae* est détectée chez 12% des patientes présentant une flore normale et  
15 *G. vaginalis* chez 60%.

Les auteurs ont alors tenté une approche dite « semi-quantitative » en classant les charges bactériennes comme faibles ou élevées par comparaison des CT (« Cycle Treshold ») médians de détection des microorganismes au sein de tous les échantillons analysés. Ainsi, les  
20 auteurs ont estimé une charge médiane de  $4 \times 10^5$  copies pour *G. vaginalis* (médiane correspondant à 21 cycles) et  $4 \times 10^6$  copies pour *A. vaginae* (médiane à 18 cycles). Les charges élevées de *G. vaginalis* ( $>4 \times 10^5$ ) et d'*A. vaginae* ( $>4 \times 10^6$ ) étaient significativement plus présentes chez les patientes présentant une VB par rapport aux patientes avec une flore normale.  
25 Cependant, ces valeurs présentaient une mauvaise sensibilité, *A. vaginae* et *G. vaginalis* étant seulement détectées respectivement chez 49% et 71% des patientes atteintes d'une VB (Table 1). De plus, 16 patientes (28%) avec une rechute de VB après traitement présentaient une concentration en *G. vaginalis* en dessous du seuil donné (Table 3). Quarante patientes (70%)  
30 avec une rechute de VB présentaient aussi une concentration en dessous du seuil en *A. vaginae*.

L'approche « semi-quantitative » des auteurs n'est donc pas applicable en tant qu'outil diagnostique et de suivi immédiat des patients. En fait, les techniques utilisées pour obtenir ces résultats étaient insuffisantes sur plusieurs points. Tout d'abord, les techniques de PCR n'étaient pas suffisamment sensibles car les cibles moléculaires amplifiaient de trop longs fragments (fragment de l'ARN 16S ribosomique de 430 paires de base pour *A. vaginae* et de 291 paires de base pour *G. vaginalis*). Il est actuellement établi qu'avec une séquence ciblée lors d'une réaction de PCR aussi longue, la sensibilité est faible. En plus, les techniques de PCR en temps réel utilisaient pour la détection et quantification un marquage en SybrGreen du produit d'amplification, méthode beaucoup moins spécifique que celles qui utilisent des sondes d'hydrolyse marquées qui nécessitent une triple spécificité (deux amorces plus la sonde, pour amplifier un fragment dont la taille n'excède pas 120 paires de bases). Les quantifications s'effectuent vraisemblablement avec un standard variable et non pas en fonction d'une gamme plasmidique stable, reproductible et comparable au cours du temps. Enfin, ils ne bénéficiaient pas d'un outil de contrôle quantitatif permettant de juger de la qualité de leurs prélèvements. En effet, il recherchait seulement la présence de  $\beta$ -globine humaine dans les échantillons sans la quantifier. Il est donc très difficile de comparer quantitativement les échantillons entre eux car la variation de la quantité des bactéries peut être liée à une variation qualitative et quantitative des sécrétions vaginales prélevées.

L'évaluation de la prise en charge thérapeutique des VB, ne peut donc se passer de la mise au point préalable d'un outil fiable adapté au diagnostic de la VB et au suivi qualitatif et quantitatif de la flore vaginale.

Le but de la présente invention est de fournir une méthode de diagnostic et de suivi de la VB à la fois plus fiable, plus précise et plus simple à mettre en œuvre en routine dans les laboratoires d'analyse microbiologique clinique.

Pour ce faire, les inventeurs ont étudié les prélèvements vaginaux de 204 femmes enceintes, et recherché la présence de chaque micro-organisme impliqué dans la VB, en développant une méthode de PCR en temps réel permettant la détection de l'ADN spécifique des bactéries et la  
5 détermination de la charge bactérienne au moyen d'une gamme plasmidique établie grâce à la construction d'un plasmide étalon. Ce plasmide comprend les fragments d'ADN spécifiques desdites bactéries à amplifier et à quantifier et du gène de l'albumine humaine utilisé comme contrôle de la qualité de l'échantillon d'ADN et de l'amplification moléculaire ainsi que  
10 de la richesse de l'échantillon biologique. Les microorganismes cibles étudiés (*Lactobacillus sp.*, *G. vaginalis*, *Mobilincus curtisii*, *Mobilincus mulieris*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *A. vaginae*, et *Candida albicans*) étaient ceux décrits comme pouvant être impliqués dans la VB et/ou la prématurité. Les résultats de la quantification des divers microorganismes  
15 obtenus par biologie moléculaire ont été confrontés à la classification par le score de Nugent.

Selon la présente invention il a été démontré que la présence d'*A.vaginae* à partir d'un certain seuil de concentration peut être associée à une VB de façon très spécifique et significativement et que cette détection  
20 moléculaire rend le diagnostic facile et fiable.

L'existence d'un seuil de concentration spécifique de la VB pour la bactérie *G. vaginalis* a aussi été démontrée selon la présente invention.

En outre, il a été démontré que l'association des 2 bactéries à certaines concentrations permet le diagnostic de VB avec notamment une  
25 prédictivité positive supérieure à 95% et surtout une prédictivité négative supérieure à 99%.

Par ailleurs, au cours des VB, les bactéries du genre *Lactobacillus sp.*, normalement présentes dans le vagin, présentent une concentration qui va en diminuant et il a été démontré selon la présente invention qu'en deçà  
30 d'un certain seuil de concentration la quantification de ces bactéries *Lactobacillus sp.* permet de diagnostiquer de façon fiable une VB. Enfin, il a

été démontré qu'une évolution du rapport des concentrations de *Lactobacillus sp.* vs l'addition des concentrations de *A. vaginae* et *G. vaginalis* permet d'évaluer l'évolution de la VB de façon fiable.

Plus précisément la présente invention fournit une méthode de diagnostic et suivi *in vitro* de l'état de la flore bactérienne vaginale au regard de la présence d'une vaginose bactérienne, et le cas échéant pour le suivi de son traitement thérapeutique, caractérisée en ce que

- 1/ on quantifie les concentrations de bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* en

10 • déterminant les concentrations de séquences spécifiques desdites bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* présentes en une seule copie dans l'ADN desdites bactéries *Atopobium vaginae* et respectivement *Gardnerella vaginalis*, et d'une séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules  
15 humaines, dans l'ADN extrait d'un échantillon de sécrétion vaginale de patiente, lesdites séquences spécifiques présentant une taille inférieure à 150 nucléotides,

20 • par co-amplification enzymatique de type PCR desdites séquences spécifiques contenues, d'une part, dans ledit ADN extrait de l'échantillon et, d'autre part, dans des échantillons de fragments d'ADN synthétiques comprenant chacun desdites séquences spécifiques desdites bactéries et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique de cellules humaines, lesdits échantillons servant de standards d'étalonnage de quantification de l'ADN,

25 • les détection et quantification desdits fragments amplifiés étant réalisées à l'aide de sondes marquées de séquences distinctes de celles des amorces d'amplification pour chacune desdites séquences spécifiques desdites bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique  
30 contenant des cellules humaines, et

- 2/ on détermine la présence d'une vaginose bactérienne ou l'échec du traitement thérapeutique en cours si les concentrations de fragments d'ADN des deux dites séquences spécifiques des bactéries *Atopobium vaginae* et respectivement *Gardnerella vaginalis* dans un échantillon de prélèvement de sécrétions vaginales de patiente contenant au moins  $10^4$  cellules humaines/ml, sont telles que l'une au moins des 2 conditions a) et b) suivantes est respectée :

a) la concentration Ca en dit fragment d'ADN d'*Atopobium vaginae* est supérieure ou égale à  $10^8$  copies/ml, et

b) la concentration Cg en dit fragment d'ADN de *Gardnerella vaginalis* est supérieure ou égale à  $10^9$  copies/ml.

Une concentration de bactérie *Atopobium vaginae* supérieure ou égale au seuil de  $10^8$  permet de détecter environ 90% des vaginoses. La quantification de la bactérie *Gardnerella vaginalis* vient en complément dans le cas où la concentration en *Atopobium vaginae* serait inférieure au seuil de  $10^8$  bactéries/ml, pour détecter une vaginose, car le seuil de détection de *G. vaginalis* supérieur ou égal à  $10^9$  bactéries/ml ne permettrait à lui seul de détecter qu'environ la moitié des vaginoses. C'est pourquoi, selon la présente invention, il est nécessaire de quantifier les concentrations d'ADN pour les deux bactéries.

D'autre part, on relève que le développement d'une vaginose bactérienne est confirmé si les concentrations Ca, Cg et Cl d'au moins trois fragments de séquences spécifiques présents en une seule copie dans l'ADN des bactéries *A. vaginae* (Ca), *G. vaginalis* (Cg) et respectivement *Lactobacillus sp.* (Cl) dans l'ADN extrait d'un échantillon de sécrétion vaginale de patiente sont telles que le rapport des concentrations  $Cl/(Ca+Cg)$  diminue entre les 2 échantillons prélevés successivement dans le temps à intervalle de temps suffisant, de préférence au moins 1 mois.

On entend ici par « développement d'une vaginose » une aggravation d'une vaginose déjà détectée ou, dans certains cas, un risque d'apparition

d'une vaginose, c'est-à-dire d'un déséquilibre ou une anomalie de la flore vaginale risquant de devenir pathologique.

De même, l'échec du traitement en cours en fonction des concentrations des séquences spécifiques présentes en une seule copie dans l'ADN des bactéries est confirmé si le rapport des concentrations  $Cl/(Ca+Cg)$  diminue ou n'augmente pas entre les 2 échantillons prélevés à intervalle de temps suffisant, de préférence au moins 1 mois.

Plus particulièrement, on réalise une méthode dans laquelle :

- a/ à l'étape 1/, on quantifie en outre les bactéries *Lactobacillus sp.* comprenant au moins les bactéries *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus iners*,

• en déterminant en outre la concentration d'une séquence spécifique desdites bactéries *Lactobacillus sp.*, ladite séquence spécifique des *Lactobacillus sp.* étant présente en une seule copie dans l'ADN desdites bactéries *Lactobacillus sp.*, et de taille inférieure à 150 nucléotides,

• par co-amplification enzymatique de type PCR additionnelle de ladite séquence spécifique des bactéries *Lactobacillus sp.* contenue, d'une part, dans ledit ADN extrait de l'échantillon et, d'autre part, dans un échantillon de fragments d'ADN synthétique comprenant, en outre, ladite séquence spécifique desdites bactérie *Lactobacillus sp.*, ledit fragment d'ADN synthétique comprenant ladite séquence spécifique desdites bactéries *Lactobacillus sp.* servant de standard d'étalonnage de quantification,

• les détection et quantification desdits fragments amplifiés étant réalisées à l'aide de sondes marquées de séquences distinctes de celles des amorces d'amplification pour chacune desdites séquences spécifiques desdites bactéries *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp.* et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, et

- b/ à l'étape 2/, on détermine une vaginose bactérienne si, en outre, la concentration Cl en fragment d'ADN spécifique de dites bactéries *Lactobacillus sp.*, est inférieure ou égale à  $10^8$  copies/ml, de préférence inférieure ou égale à  $10^7$  copies/ml.

5 Selon la présente invention, la concentration en bactéries du genre *Lactobacillus sp.* n'est pas suffisante pour conclure à la présence d'une vaginose bactérienne, mais vient en complément ou confirmation dans le cas où les conditions de concentrations en *A. vaginae* et *G. vaginalis* sont réunies.

10 De préférence, on détermine une vaginose bactérienne si lesdites concentrations sont telles que les 3 conditions suivantes sont respectées :

a- concentration Ca en dit fragment d'ADN de séquence spécifique d'*Atopobium vaginae* supérieure ou égale à  $10^8$  copies/ml,

15 b- concentration Cg en en dit fragment d'ADN de séquence spécifique de *Gardnerella vaginalis* supérieure ou égale à  $10^9$  copies/ml, et

c- concentration Cl en dit fragment d'ADN de séquence spécifique de *Lactobacillus sp.* inférieure ou égale à  $10^7$  copies/ml.

20 Avantageusement, lesdites concentrations Ca, Cg ou Cl sont déterminées par amplification enzymatique de type PCR en temps réel et quantification de l'ADN desdits fragments d'ADN de séquences spécifiques des bactéries respectivement *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* et le cas échéant *Lactobacillus sp.*, ainsi que, de préférence, d'un fragment d'ADN humain présent dans tout prélèvement biologique humain contenant des cellules.

25 De préférence, lesdites séquences spécifiques respectivement desdites bactéries *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, et le cas échéant *Lactobacillus sp.* présentent une taille de 70 à 150 nucléotides de préférence de 90 à 120 nucléotides.

De préférence encore, on réalise des réactions d'amplification et quantification par PCR en Temps Réel, en mettant en œuvre des sondes d'hydrolyse spécifiques respectivement de chacune desdites séquences spécifiques de dites bactéries et séquence spécifique d'un gène humain  
5 présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, dans l'échantillon à tester.

La technique de PCR en temps réel, consiste en une PCR classique en utilisant des amorces de séquence directe et inverse, et comprend une détection du produit amplifié basée sur la mesure d'émission de  
10 fluorescence proportionnelle à la quantité de gènes amplifiés avec une sonde dite « d'hydrolyse ». Pour cela, ladite sonde est marquée par un émetteur de fluorescence ou fluorophore en 5' et un agent bloquant l'émission de fluorescence en 3'. Cet agent bloquant absorbe la fluorescence émise lorsque le fluorophore et l'agent bloquant sont proches.  
15 Lorsque le fluorophore et l'agent bloquant sont séparés, l'émission de fluorescence n'est plus absorbée par l'agent bloquant. Lors de son passage, la Taq polymérase entraîne une hydrolyse de la sonde et donc une libération des nucléotides et du fluorophore en solution. L'émission de fluorescence sera donc proportionnelle au nombre d'amplifiat. Le principe  
20 de la PCR en temps réel repose sur la capacité de la Taq polymérase pendant l'étape d'élongation d'hydrolyser une sonde hybridée sur l'ADN à copier, cette hydrolyse permettant l'émission de fluorescence, laquelle permet une quantification. Au cours de la même réaction, on peut quantifier deux cibles différentes, en introduisant dans le mélange  
25 réactionnel deux amorces et une sonde dirigées contre une première cible, et deux autres amorces et sonde dirigées contre l'autre cible. Les deux sondes étant marquées avec des fluorophores différents.

De préférence encore, on met en œuvre un grand fragment synthétique d'ADN servant de standard d'étalonnage de quantification de  
30 l'ADN, ledit grand fragment d'ADN synthétique regroupant desdites séquences spécifiques respectivement de chacune desdites bactéries dont les concentrations sont quantifiées, et ladite séquence d'ADN humain

spécifique de cellules humaines. La présence de plusieurs cibles moléculaires sur un même fragment nucléique permet de quantifier des cibles différentes dans un même échantillon et de les coquantifier de façon homogène, la quantification en utilisant la même gamme d'étalonnage de plusieurs espèces moléculaires, permettant la comparaison de l'efficacité des différentes réactions de PCR entre elles et d'une détermination à l'autre au cours du temps et évite les biais liés au témoin positif.

On entend par "séquence spécifique de ladite bactérie", une séquence du génome de ladite bactérie qu'on ne retrouve dans aucun autre génome d'organisme vivant.

On entend par "fragment d'ADN", un fragment d'ADN ou oligonucléotide dont les séquences sont écrites ci-après dans le sens 5'→3'.

Plus particulièrement, lesdites séquences spécifiques desdites bactéries comprennent :

- pour la bactérie *Atopobium vaginae*: le fragment des positions 248 à 334 du gène ARN 16S ribosomal de référence Genebank AY 738658.1,

- pour la bactérie *Gardnerella vaginalis*, le fragment des positions 981 à 1072 du gène *Cpn 60* de la protéine chaperonne de 60kDa de référence Genebank AF 240579.3, et

- pour la bactérie *Lactobacillus sp.*, une séquence commune aux bactéries *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jenseneii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus ineri* et *Lactobacillus acidophilus* au sein du gène *tuf* codant pour le facteur d'élongation aux positions 253 à 343 du gène de référence Genebank AY 562191.1.

Plus particulièrement encore, lesdites séquences spécifiques desdites bactéries sont les séquences suivantes incluant des séquences sondes (soulignées) encadrées par des séquences amorces (en gras) ou leurs séquences reverses et complémentaires pour les amorces anti-sens:

- pour *Atopobium vaginae*:

Seq. n°2 = 5'-**CCCTATCCGCTCCTGATACCGGCAGGCTTGAGT  
CTGGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGTGTGAAATGCGCAGATATT  
TGG-3'**

5 - pour *Gardnerella vaginalis*:

Seq. n°3 = 5'-**CGCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGTTTAA  
GGCTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGAAAAG  
ATTGCTG-3'**

- pour *Lactobacillus sp.*

10 Seq. n°4 = 5'-**TACATCCCAACTCCAGAACGTGATACTGACAAGC  
CATTCTTAATGCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTTCGTGGTA  
CTGTTGCTT-3'**

Avantageusement, on réalise en outre la quantification des cellules  
humaines présentes dans ledit échantillon, notamment dans l'ADN obtenu  
15 à partir de prélèvement vaginal à tester, à titre de contrôle de la richesse du  
prélèvement, de la qualité de l'extraction de l'ADN, et de la présence  
potentielle d'inhibiteurs de la réaction de PCR. Pour ce faire, on quantifie  
le nombre de copies d'un gène humain présent dans tout prélèvement  
biologique humain contenant des cellules, notamment le nombre de copies  
20 du gène d'albumine humaine. La quantification du gène de l'albumine  
humaine sert ainsi de contrôle interne pour attester de la qualité et de la  
richesse de l'échantillon. De plus, au cours du suivi des patientes, cette  
quantification est un moyen de normalisation entre deux échantillons  
prélevés à des temps différents. En effet, le calcul du nombre de  
25 microorganismes par millions de cellules humaines autorise une  
comparaison inter-échantillon rigoureuse. Le gène de l'albumine est  
présent uniquement en 2 copies dans les cellules humaines et la mesure du  
signal de cette séquence permet donc la quantification du nombre de  
cellules humaines initiales dans le prélèvement. Une quantité de cellules

inférieure ou égale à 50 pour 5 µl d'échantillon ( $10^4$  cellules/ml), soit une quantité d'ADN d'albumine inférieure ou égale à  $10^2/5$  µl, amène à rejeter le prélèvement du fait d'une quantité insuffisante.

5 Du fait de la variabilité de qualité du prélèvement, du transport et de la conservation, la présente invention contient ainsi un témoin moléculaire de qualité permettant une systématisation du diagnostic avec une quantification fiable.

10 La quantification des cellules permet également de détecter l'absence des limiteurs de la réaction de PCR. En effet, lorsque l'échantillon est testé par PCR à différentes dilutions, la quantité d'albumine détectée augmente quand on augmente les dilutions en présence des limiteurs, alors qu'elle diminue quand on augmente les dilutions en l'absence des limiteurs de réaction PCR.

15 Plus particulièrement, on réalise en outre la quantification de l'ADN humain contenu dans ledit échantillon, et ledit grand fragment d'ADN comprend en outre une séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester telle qu'une séquence spécifique de l'albumine.

20 Plus particulièrement encore, ladite séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester comprend le fragment des positions 16283-16423 de l'exon 12 du gène de l'albumine humaine de référence Genebank M12523.1 de séquence du listage de séquence suivante ou la séquence complémentaire:

Seq. n°1 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTTTA**  
AGAGTAATATTGCAAACCTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGG  
25 **CATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGAACCAGCAGCTCCC**  
**ATGAGTTT**-3', de préférence une séquence Seq. n°1 modifiée par insertion d'un site de clivage, notamment le site XhoI (séquence rayée entre parenthèses) en dehors des séquences correspondant aux amorces (séquences en gras) et séquence sonde (séquence soulignée) comme la  
30 séquence Seq. n°17.

Avantageusement encore, on réalise des réactions d'amplification et de quantification en mettant en œuvre des jeux d'amorces et des sondes d'hydrolyse spécifiques de chacune des différentes bactéries dites séquences spécifiques de chacune desdites bactéries à tester, et le cas 5 échéant d'une séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester, telle que une séquence spécifique de l'albumine humaine, et ladite séquence spécifique comprend une séquence sonde encadrée par des séquences aptes à servir comme amorce dans une réaction d'amplification du type PCR desdites séquences spécifiques.

10 On entend ici par "sonde", un oligonucléotide, de préférence encore de 20 à 30 nucléotides, s'hybridant spécifiquement avec ladite séquence spécifique et donc permettant de la détecter et de la quantifier de façon spécifique grâce à la mesure de l'accroissement de la fluorescence liée de la réaction de PCR.

15 La sonde permet de détecter l'ADN spécifique amplifié et de le quantifier par comparaison de l'intensité du signal avec celui du standard de quantification.

On entend ici par "amorce", un oligonucléotide de préférence de 15 à 25 nucléotides qui s'hybride de façon spécifique avec une des 2 20 extrémités de la séquence que l'ADN polymérase amplifiera dans la réaction de PCR.

Plus particulièrement, on met en œuvre les jeux d'amorces et de sondes choisis le cas échéant parmi les séquences suivantes du listage de séquence annexé à la présente description, ou respectivement leurs 25 séquences complémentaires :

- pour *Atopobium vaginae*:

Amorce 5' : Seq. n°5 = 5'-CCCTATCCGCTCCTGATACC-3'

Amorce 3' : Seq. n°6 = 5'-CCAAATATCTGCGCATTTCA-3'

Sonde : Seq. n°7 = 5'-GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGGGA-3'

- pour *Gardnerella vaginalis*:

Amorce 5' : Seq. n°8 = 5'-CGCATCTGCTAAGGATGTTG-3'

Amorce 3' : Seq. n°9 = 5'-CAGCAATCTTTTCGCCAACT-3'

5 Sonde : Seq. n°10 = 5'-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-3'

- pour *Lactobacillus sp.*:

Amorce 5' :Seq. n°11 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACG-3'

Amorce 3' : Seq. n°12 = 5'-AAGCAACAGTACCCACGACCA-3'

Sonde : Seq. n°13 = 5'-TGACAAGCCATTCTTAATGCA-3',

10 - pour l'albumine humaine :

Amorce 5' : Seq. n°14 = 5'-GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT-3'

Amorce 3' : Seq. n°15 = 3'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'

Sonde :Seq. n°16 = 5'-CCTGTCATGCCCACACAAATCTCTCC-3'

15 De préférence, ledit grand fragment d'ADN synthétique constitutif de l'ADN de l'échantillon standard d'étalonnage de la quantification est inséré dans un plasmide.

20 Dans ces méthodes de quantification d'ADN, il est important de savoir si une réaction positive n'est pas due à une contamination par le plasmide recombinant utilisé comme standard de quantification ou comme témoin positif. Pour résoudre ce problème, un site de coupure par un enzyme de restriction est avantageusement introduit dans au moins une des cibles moléculaires synthétiques. Ce site étant absent sur la séquence naturelle. Donc, par coupure enzymatique et analyse du fragment amplifié  
25 sur gel d'agarose, ou en utilisant une sonde de PCR en temps réel qui

reconnait spécifiquement le site de restriction, on peut ainsi détecter la présence éventuelle du plasmide contaminant.

Ainsi, on peut mettre en oeuvre plus particulièrement, les étapes suivantes dans lesquelles :

5           1- on réalise une réaction d'amplification enzymatique de type PCR de l'ADN d'au moins une dite séquence spécifique d'au moins un desdits agents, dans l'ADN extrait desdits échantillons à tester et dans l'ADN de l'échantillon standard d'étalonnage, à l'aide d'au moins un jeu d'amorces apte à amplifier à la fois au moins ladite séquence spécifique authentique et  
10           ladite séquence spécifique modifiée,

2- on vérifie si les amplifiats éventuels de l'ADN extrait desdits échantillons à tester, comprennent une dite séquence spécifique, et

3- on détecte les faux positifs éventuels provenant de contaminations éventuelles desdits échantillons à tester par de l'ADN  
15           provenant de l'échantillon de standard d'étalonnage, par l'une au moins des étapes suivantes :

- 3a- on réalise une digestion enzymatique du produit de PCR obtenu avec une enzyme correspondant au site de clivage et analyse sur gel d'agarose du produit de digestion en comparaison avec le produit de PCR  
20           non digéré par l'enzyme de restriction.

Si le fragment digéré provient de l'amplification de la cible moléculaire insérée dans le plasmide témoin, il contient le site de restriction, et il sera d'une taille inférieure au fragment non digéré.

- 3b- on réalise une réaction de type PCR en temps réel avec des  
25           amorces directes et inverses de l'une des cibles moléculaires, et une sonde spécifique de ladite séquence exogène contenant le site de restriction.

Seul un fragment provenant du plasmide témoin et contenant la séquence exogène pourra être amplifié.

Plus particulièrement, on met en œuvre une dite séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester qui comprend le fragment des positions 16283-16423 de l'exon 12 du gène de l'albumine humaine de référence Genebank M12523.1 modifiée par insertion d'un site de clivage, notamment le site XhoI, en dehors des séquences correspondant aux amorces (séquences en gras) et séquence sonde (séquence soulignée) de séquence du listage de séquence suivante :

Seq. n°17 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGT**(CTCGAG)TTAAGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATC  
10 TCTCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA**ACCA**  
**GCAGCTCCCATGAGTTT**-3', comprenant le site XhoI (entre parenthèses) en dehors des séquences correspondant aux amorces (séquences en gras) et séquence sonde (séquence soulignée).

Avantageusement encore, on met en œuvre une pluralité de réactions d'amplifications enzymatiques PCR simultanées ou non de chacune des dites séquences spécifiques des dites bactéries avec le même grand fragment d'ADN synthétique étalon, à l'aide d'une pluralité de différents jeux d'amorces spécifiques de chacune des différentes dites séquences spécifiques de chacune des dites bactéries, les séquences des différentes amorces ne se croisant pas entre les différentes dites bactéries et les dites amorces pouvant être mises en œuvre dans une réaction d'amplification enzymatique réalisée selon le même protocole et, notamment, à la même température d'hybridation.

On connaît différentes méthodes pour construire un grand fragment d'ADN chimère combinant plusieurs fragments, notamment d'origine diverses, notamment la méthode décrite dans FR 2 882 063 dans laquelle on prépare un grand premier fragment d'ADN synthétique double brin de séquence déterminée comprenant un enchaînement dans un ordre déterminé d'une pluralité de n deuxièmes petits fragments d'ADN synthétiques contigus, consistant essentiellement dans la dimérisation

d'une pluralité de n oligonucléotides par amplification enzymatique à l'aide d'une enzyme polymérase thermorésistante comprenant :

- 5           - une première étape de réaction d'amplification d'acides nucléiques de type PCR en présence d'une dite enzyme polymérase, d'une série de n oligonucléotides de séquences déterminées, sans amorces exogènes, comprenant une série de cycles dans des conditions de températures permettant l'hybridation desdits oligonucléotides, suivie d'une élongation du complexe obtenu, destinée à mettre bout à bout dans un ordre déterminé lesdits oligonucléotides, les séquences desdits oligonucléotides  
10           correspondant successivement et alternativement aux séquences sens et anti-sens des différents dits deuxièmes fragments synthétiques, et chaque dit oligonucléotide contenant dans ses régions 5' et 3' des séquences complémentaires de celles des oligonucléotides suivant et précédent, le cas échéant, et
- 15           - une deuxième étape d'amplification à l'aide d'amorces spécifiques des extrémités 5' et 3' du dit brin directe dudit grand premier fragment synthétique à préparer, permettant de produire des copies identiques dudit grand premier fragment.

20           Cette technique est donc basée sur l'utilisation et la maîtrise d'un artefact de la PCR, qui consiste en l'hybridation des amorces entre elles (dimérisation des amorces). Ce phénomène est observé dans le cas où les conditions de PCR, notamment de température, sont mal adaptées, et que les amorces contiennent des séquences partiellement complémentaires.

25           La technique de construction consiste donc, à partir des séquences cibles, à choisir les séquences des oligonucléotides, avec une alternance d'oligonucléotides de séquences directes («sens») ou inverses (encore dénommées « reverses » ou «anti-sens»). Afin de rendre possible la mise bout à bout de ces oligonucléotides, on prend soin d'introduire en 3' de la séquence d'un oligonucléotide une séquence nucléotidique complémentaire  
30           des premiers nucléotides de l'oligonucléotide suivant. Ces oligonucléotides seront hybridés par leur parties complémentaires, et grâce à l'activité

polymérisique, par exemple de la Taq polymérase, une synthèse de 5' en 3' se réalise afin d'obtenir des fragments doubles brins. Le fragment final (assemblé) est synthétisé par PCR en utilisant un couple d'amorces directe et inverse correspondant aux séquences des extrémités du premier grand  
5 fragment d'ADN synthétique bicaténaire désiré.

Comme mentionné précédemment, avantageusement, lesdits grands fragments d'ADN synthétiques, sont avantageusement insérés dans un plasmide.

Cette technique de construction générique d'un fragment  
10 nucléotidique synthétique permet la mise en contiguïté de plusieurs cibles moléculaires d'intérêt. Il s'agit d'une méthode simple à mettre en œuvre, rapide et fiable, et ne nécessitant pas un équipement lourd et coûteux.

La présente invention a également pour objet une trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic et suivi  
15 d'une vaginose selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend :

- des échantillons d'ADN standard d'étalonnage à une concentration connue comprenant desdites séquences spécifiques de chacun desdites bactéries tels que définis ci-dessus, et de préférence une dite séquence spécifique de l'ADN humain telle que définie ci-dessus, et de préférence  
20 encore un dit grand fragment d'ADN synthétique regroupant desdites séquences spécifiques de chacun desdites bactéries tels que définis ci-dessus, et de préférence une dite séquence spécifique de l'ADN humain telle que définie ci-dessus, ainsi que

- desdits jeux d'amorces spécifiques desdits fragments d'ADN  
25 synthétiques modifiés spécifiques desdites bactéries et de préférence encore, desdites sondes tels que définis ci-dessus, et

- des réactifs de mise en œuvre d'une réaction d'amplification d'ADN de type PCR.

D'autres caractéristiques de la présente invention apparaîtront à la lumière de la description détaillée qui va suivre de différents exemples de réalisation en référence au listage de séquence et aux figures 1 à 4, dans lesquelles :

- 5           - la figure 1A représente l'analyse des charges microbiennes de 20 vaginoses bactériennes définies par le score de Nugent quantifiées par PCR en temps réel selon la présente invention.
- la figure 1B représente l'analyse des charges microbiennes de 167 flores normales définies par le score de Nugent quantifiées par PCR en  
10 temps réel selon la présente invention.
- la figure 2 représente l'analyse des charges microbiennes de 44 flores intermédiaires identifiées par le score de Nugent quantifiées par PCR en temps réel selon la présente invention.
- la figure 3 montre 25 vaginoses bactériennes identifiées sur des  
15 critères moléculaires et quantifiées selon la présente invention à partir du groupe des 44 flores intermédiaires définies par le score de Nugent.- la figure 4 présente 19 flores normales identifiées sur des critères moléculaires et quantifiées selon la présente invention après application des critères moléculaires de la vaginose bactérienne au groupe des 44 flores  
20 intermédiaires identifiées par le score de Nugent.

## I. PATIENTES, MATERIELS ET METHODES

### I.1 Réalisation et transport des prélèvements vaginaux

Les femmes enceintes, suivies pour leur grossesse, ont été recrutées à l'hôpital de La Conception à Marseille. Un consentement éclairé est la  
25 condition nécessaire à l'inclusion. Les prélèvements ont été réalisés au niveau du cul de sac vaginal postérieur sous spéculum stérile non lubrifié et sans antiseptique. Quatre prélèvements sont réalisés pour chaque femme : deux prélèvements par écouvillon coton sur tube sec (Copan innovation®, Brescia, Italie) et deux prélèvements par cytobrosse

(Scrinet® 5,5 mm, laboratoire C.C.D. international, Paris, France) Un écouvillon coton standard est utilisé pour l'état frais et la culture bactérienne. Un second est placé dans un milieu de transport spécifique (R1 Urée-Arginine LYO 2, BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) pour la  
5 recherche des Mycoplasmes génitaux (*M. hominis* et *M. urealyticum*). Une cytobrosse est utilisée pour l'étalement sur lame et coloration de Gram. Une seconde pour l'extraction de l'ADN aux fins de quantification par amplification moléculaire est transportée dans 500 µl de milieu de transport MEM (Minimum Essential Medium, Invitrogen Life  
10 Technologies, Carlsbad, CA, USA). Elle est congelée à -80°C dès son arrivée au laboratoire jusqu'à son utilisation.

## I.2 Analyse bactériologique

### I.2.1 Etat frais

La recherche de *Trichomonas vaginalis* est réalisée par un examen à  
15 l'état frais entre lame et lamelle au microscope optique (objectif 10X).

### I.2 Score de Nugent :

#### I.2.2.1 La coloration de Gram :

Après étalement du prélèvement sur lame de verre et séchage la coloration de Gram comprend: une coloration au cristal violet oxalate (1  
20 minute), une coloration au liquide de Lugol (1 minute), une décoloration à alcool/acétone et coloration au safranine en solution (BioMérieux). Chaque étape est suivie d'un lavage à l'eau. La coloration de Gram permet d'établir le score de Nugent selon une évaluation semi-quantitative de 3 morphotypes bactériens (Tableau 1). En fonction du score trois flores  
25 vaginales sont identifiées : une flore normale (FN) pour un score de 0 à 3, une flore intermédiaire (FI) pour un score de 4 à 6 et une VB pour un score supérieur à 7.

#### I.2.2.2 Culture

Les prélèvements vaginaux sont ensemencés sur 3 milieux de culture : la gélose Columbia ANC plus 5% de sang de mouton (BioMérieux), la gélose Chocolat Poly Vitex PVX (BioMérieux), la gélose CHOC VCAT (BioMérieux) incubés à 37°C pendant 48 heures. Pour la  
5 recherche des Mycoplasmes, les prélèvements sont ensemencés sur kit spécifique (Urée-Arginine LYO 2, BioMérieux) puis incubés à 37°C puis inoculés sur milieux de culture anaérobie (BioMérieux) durant 48 heures.

### I.3. Détection et quantification par PCR en temps réel :

#### I.3.1 Extraction de l'ADN

10 L'extraction de l'ADN utilise le kit « QIAmp®DNA Mini Kit » (Qiagen®, Courtaboeuf, France). Le protocole est modifié de la façon suivante : incubation pendant 12 heures à 56°C de 200 µl d'échantillon pour 200 µl de tampon de lyse et 20 µl de protéinase K. Le lysat est traité  
15 selon les recommandations du fabricant. L'ADN est élué dans 100 µl de tampon d'éluion puis stocké à - 20°C.

#### I.3.2 Mise au point des PCR en temps réel

##### I.3.2.1 Choix des cibles moléculaires

L'analyse des données de la littérature, et des séquences déposées dans le site « GenBank »  
20 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) permet de prendre connaissance des séquences disponibles pour chacun des microorganismes cibles. La spécificité des amorces, des sondes et des fragments des séquences cibles de chacun des microorganismes choisis sont testées pour leur spécificité sur le site Internet NBCI  
25 (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Les inventeurs ont sélectionné des cibles sur tous les agents potentiels de vaginose, y compris des agents au rôle incertain. D'une façon surprenante, la cible la plus significative *Atopobium vaginae* n'était pas considérée comme un agent essentiel.

Les cibles retenues sont localisées sur la séquence du gène codant pour la protéine chaperonne de 60 KDa (*Cpn60*) pour *G. vaginalis* et *M. curtisii*, sur celle de l'ARN 16S pour *M. mulieris* et *A. vaginae*, le gène *fts Y* pour *M. hominis*, sur celle de l'uréase pour *U. urealyticum*, le gène de la  
5 topoisomérase III pour *C. albicans*. Pour la cible de *Lactobacillus sp.*, une séquence commune au: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* et *Lactobacillus acidophilus* est choisie, elle est située sur le gène codant pour le facteur d'élongation *tu (tuf)*. Une séquence située dans l'exon 12 du gène de l'albumine humaine est choisie  
10 afin d'attester de la présence et de la quantité d'ADN dans l'échantillon testé.

#### I.3.2.2 Choix des sondes et amorces

Pour chaque microorganisme étudié (*Lactobacillus sp.*, *G. vaginalis*, *M. curtisii*, *M. mulieris*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *A. vaginae*, *C. albicans*) et  
15 l'albumine humaine une sonde, un couple amorce sens et anti-sens sont choisis sur les séquences cibles précédemment définies en utilisant le programme Primer 3® ([http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3\\_code.html](http://frodo.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html)). Les amorces et sondes sont décrites dans l'annexe 1 ci- après  
Chaque amorce et sonde sont analysées sur le site Internet NCB I  
20 (<http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) pour s'assurer de leur spécificité *in silico* (Annexe 1).

Afin de réaliser des PCR en temps réels en double reconnaissance (PCR duplex) des couples de reconnaissance de microorganismes sont arbitrairement choisis : une des sondes étant marquée FAM et l'autre étant  
25 marquée VIC. Quatre couples de PCR sont ainsi définis.

- *Lactobacillus sp.* (FAM) et *G. vaginalis* (VIC)
- *M. curtisii* (FAM) et *M. mulieris* (VIC)
- *U. urealyticum* (VIC) et albumine humaine (FAM)

- *A. vaginae* (VIC) et *C. albicans* (FAM)
- *Mycoplasma hominis* (FAM) sera quantifié seul.

Les amorces sont synthétisées par Eurogentec® (Seraing, Belgique), et les sondes par Applied Biosystems (Warrington, Cheshire, UK).

#### 5 I.3.2.3 Test de spécificité vis à vis des différentes souches testées

Afin de tester la spécificité des amorces et des sondes, l'ADN extrait de souches bactériennes de référence (*L. acidophilus* CIP 104464, *A. vaginae* CIP 106431, *G. vaginalis* CIP 103660, *M. curtisii* subsp. *holmesii* ATCC 35242, *M. mulieris* ATCC 35239, *C. albicans* UMIP 1180.79, *U. urealyticum* CIP 103755 et *M. hominis* CIP 103715) est utilisé à trois dilutions (1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup>, 1/1000<sup>e</sup>) pour la mise au point des PCR en temps réel (détermination des quantités relatives d'amorces et de sondes, des spécificités, des réactivités croisées). Chaque souche est testée avec les amorces et la sonde spécifique mais aussi avec les sondes et amorces des 7 autres microorganismes et celles de l'albumine humaine.

#### 15 I.3.2.4 Mise au point des PCR duplex

On a mesuré les valeurs de CT (« cycle threshold »). Il s'agit du point d'intersection entre la ligne de base de la réaction et la courbe logarithmique de représentation de l'amplification. Cette valeur de CT correspond au nombre de cycle d'amplification nécessaire pour que l'amplification commence. Elle est en relation avec la concentration du produit nucléique à quantifier, à savoir que plus le CT est bas plus la concentration est élevée.

Les quantités d'amorces et de sondes nécessaires pour l'obtention d'une amplification optimale en simple et en double fluorescence sont définies en testant les réactions d'amplification sur un mélange d'ADN bactérien des 8 souches de référence en équimolarité, ainsi qu'avec les souches pures, pour une concentration finale au 1/10<sup>e</sup> dans les deux cas.

Les conditions expérimentales retenues sont celles pour lesquelles les valeurs de CT sont identiques à celles obtenues en simple fluorescence.

#### I.3.2.5 Test de spécificité vis à vis de 40 souches non testées :

Les échantillons d'ADN génomique provenant de 40 souches  
5 bactériennes différentes (Annexe) autres que les 8 souches bactériennes de  
référence sont testés en dilution au 1/10<sup>e</sup>. L'ensemble de ces tests est  
effectué en prenant soin d'introduire lors de chaque réaction  
d'amplification des témoins négatifs ne contenant aucun ADN ou des  
10 témoins positifs (mélange de l'ADN des 8 souches de référence). La  
spécificité est testée avec les quatre couples de PCR en temps réel ainsi que  
*Mycoplasma hominis*.

#### I.4. Construction du plasmide

On a mis en œuvre la méthode de préparation décrite dans FR  
2 882 063.

#### 15 I.4.1 Séquence du fragment hybride de quantification :

La séquence nucléotidique du fragment hybride de quantification est  
obtenue en alignant les séquences cibles des PCR en temps réel pour les 8  
micro-organismes ainsi que celles de l'albumine humaine. Nous obtenons  
un fragment hybride de 931 paires de bases décrit à l'Annexe 2 ci- après.

#### 20 I.4.2 Séquences des oligonucléotides de construction du fragment hybride de quantification :

La séquence du fragment nucléotidique hybride est divisée en 6  
fragments d'oligonucléotides consécutifs décrits à l'Annexe 3. Afin  
d'assurer la mise en continuité des oligonucléotides adjacents, 10  
25 nucléotides complémentaires de l'extrémité 3' sur l'oligonucléotide d'amont  
sont ajoutés à l'extrémité 5' de l'oligonucléotide d'aval. Les tailles des 6  
séquences oligonucléotidiques s'échelonnent de 155 à 172 nucléotides. Les  
oligonucléotides consécutifs sont alternativement en séquence directe et

reverse. Ainsi, les oligonucléotides 1, 3 et 5 sont utilisés sous forme de séquence directe, alors que les oligonucléotides 2, 4 et 6 sont utilisés en séquence reverse. Des amorces dites de construction (sens et antisens) dont les séquences correspondent à celles des 20 nucléotides en 5' et 3' du fragment hybride de quantification vont être synthétisées. Les oligonucléotides et les amorces sont synthétisés par Eurogentec®.

#### I.4.3 Construction du fragment hybride :

Le fragment nucléotidique double brin est construit par réaction d'amplification grâce à la complémentarité des extrémités de deux oligonucléotides adjacents. Deux PCR successives sont nécessaires.

##### I.4.3.1 Première PCR :

Elle permet l'hybridation des oligonucléotides par leurs extrémités et une élongation partielle quand elle est compatible avec l'activité de la Taq polymérase. Les 6 oligonucléotides sont introduits en équimolarité (0,2 mMol), avec du tampon de polymérase 1 X MgCl<sub>2</sub> (1,5 mMol), les dNTP (0,2 mMol), 0,2 µl de Taq Roche (Roche®) à 5 UI/µl, dans un volume réactionnel de 50 µl. Le programme d'amplification est : 95°C 2min, suivi de 40 cycles comportant 94°C 30 sec (dénaturation), 37°C 1 min (hybridation), 72°C 1 min 30 sec (élongation).

##### I.4.3.2 Deuxième PCR :

Elle permet d'obtenir un fragment de PCR contenant bout à bout les motifs oligonucléotides attendus (Annexe 4). Un µl de produit d'amplification de la première PCR est ajouté au mélange réactionnel suivant : tampon de polymérase Hotstar (Qiagen®) 1 X MgCl<sub>2</sub> (1,5 mMol), les dNTP (0,2 mMol), 0,2 µl de Hotstar (Qiagen®) à 5 UI/µl, 0,2 mMol des amorces de construction sens et anti-sens. Le programme de PCR est : 95°C 15 min, suivi de 95°C 30s, 58°C 45s, 72°C 2min 40 cycles, 72°C 5min. Le fragment de PCR obtenu est analysé sur gel BET Agarose à 1,5% dans du tampon TBE 0,5X. Si la taille du fragment est conforme à la taille

attendue, il est purifié en utilisant le kit QIAquick® PCR Purification Kit 250 PCR Qiakit (Qiagen®).

#### I.4.3.3 Clonage de l'insert

Deux  $\mu\text{l}$  du fragment précédemment obtenu sont introduits dans un  
5 mélange réactionnel de ligation contenant 5 $\mu\text{l}$  de tampon de ligase, 1 $\mu\text{l}$  de  
ligase et 1 $\mu\text{l}$  de plasmide PGEM (kit pGEM®-T Easy Vector System 2  
Promega®, Madison, Wisconsin, USA) linéarisé et déphosphorylé. Le  
volume final est de 10 $\mu\text{l}$ . Le produit de ligation est incubé à 15°C pendant  
une nuit. Sept  $\mu\text{l}$  du produit de ligation sont mélangés à 50  $\mu\text{l}$  de cellules  
10 compétentes (*Escherichia coli* JM 109) maintenues pendant 20 minutes dans  
la glace puis incubées pendant 1 minute à 42°C. Après ajout de 950  $\mu\text{l}$  de  
LB broth (USB®, Cleveland, Ohio, USA), et incubation pendant 1h30 à  
37°C, 500 et 250  $\mu\text{l}$  de ce milieu de culture sont étalés sur 2 boîtes de Pétri  
contenant du LB agar (USB®) avec 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  d'Ampicilline. Les boîtes  
15 sont incubées pendant une nuit à 37°C. Les colonies recombinantes sont  
déposées à la fois dans 50 $\mu\text{l}$  d'eau distillée stérile et sur une boîte de LB  
agar Ampicilline.

Les colonies d'*E. coli* recombinantes sont prélevées pour être  
analysées par PCR : 5  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne dans l'eau distillée, le  
20 couple d'amorces M13 (10 pm/ $\mu\text{l}$ ) et le milieu réactionnel de PCR  
précédemment décrit. Le programme de PCR est identique à celui utilisé  
pour la deuxième étape de la construction. Les produits de PCR obtenus  
sont analysés sur gel d'Agarose à 1,5% dans du tampon TBE 0,5 X. Les  
fragments de la taille attendue sont purifiés en utilisant le kit Qiaquick®  
25 PCR Purification Kit 250 Qiakit (Qiagen®). Ils sont ensuite séquencés en  
utilisant le Big Dye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied  
Biosystems®, Warrington, UK), 3,2 pmol/ $\mu\text{l}$  d'amorces M13 sens et  
antisens chromatographiées sur le séquenceur ABI PRISM 3100 (Applied  
Biosystems®). La séquence obtenue est comparée à la séquence du  
30 fragment attendu en utilisant les programmes auto assembler et Sequence  
Navigator (Applied Biosystems®). Un des clones recombinants, conforme à

la séquence attendue, va être produit en grande quantité dans 100 ml de LB BROTH Ampicilline et purifié selon le protocole High Speed Plasmid Midi Kit (Qiagen®). Le plasmide purifié est ensuite stocké à -20°C. La souche recombinante sélectionnée est congelée à -80°C.

#### 5 I.4.3.4 Obtention de la gamme plasmidique

Sa concentration est déterminée par la mesure de la densité optique à 260 nm. Soit par exemple : 0,38 pour la solution initiale. 1 unité DO correspond à 50µl/ml :  $0,38 \times 50 = 19 \mu\text{g/ml} = 19 \cdot 10^{-6} \text{ g/ml}$  de plasmide dans la solution initiale. La taille du plasmide = taille du pGEM®-T Easy + taille du fragment = 3015 + 931 = 4334 pb, soit 8668 bases. La masse molaire d'un nucléotide est de 330 Da (g/mol). La masse molaire du plasmide sera de  $8668 \times 330 = 2,860 \cdot 10^6 \text{ g/mol}$ . La concentration du plasmide sera en mol/ml, soit  $19 \cdot 10^{-6} / 2,860 \cdot 10^6 = 6,64 \cdot 10^{-12} \text{ mol/ml}$ . Multiplié par le nombre d'Avogadro, on obtient le nombre de copies de plasmide pour 1 ml de solution, soit :  $6,64 \cdot 10^{-12} \times 6,023 \cdot 10^{23} = 40 \cdot 10^{11}$  copies/ml soit  $2 \cdot 10^{10}$  copies/5µl. Une première dilution de la solution plasmidique initiale au 1/2500<sup>e</sup> permet d'ajuster la concentration au premier palier de la gamme plasmidique, soit le point  $10^7$  copies/5µl de solution plasmidique. Une cascade de dilution par pas de 10 permet de créer les paliers successifs de la gamme (de  $10^7$  copies à 1 copie pour 5µl de solution).

### I.5. Analyse des échantillons

#### I.5.1 PCR quantitative en temps réel

On réalise les réactions de quantification par PCR en temps réel sur les extraits d'ADN des prélèvements vaginaux. Au sein de chaque plaque de réaction, est introduit: 4 contrôles négatifs (NTC), la gamme plasmidique d'étalonnage (de  $10^7$  à 1 copie par puits), 24 échantillons à tester, purs et dilués au 1/10<sup>e</sup> et au 1/100<sup>e</sup> pour rechercher des inhibiteurs. Les contrôles négatifs ainsi que les points de la gamme plasmique sont testés en double. Pour l'amplification et la quantification des 8 micro-organismes ainsi que

de l'albumine humaine, on réalise 4 plaques de PCR en double fluorescence et une en simple fluorescence. Pour la préparation du mélange réactionnel, on utilise le kit « Quantitect Probe PCR Kit » (Qiagen®) contenant le mélange réactionnel 2X associant le tampon de la Taq polymérase et la Taq polymérase (Hotstar), les dNTP et dUTP. A ce milieu réactionnel, on ajoute les amorces sens et anti-sens et les sondes nécessaires à la réalisation de la PCR en simple ou en double fluorescence selon les conditions expérimentales rapportées décrites à l'Annexe 6, les prises d'essai des échantillons dilués ou non et des points de gamme plasmidique sont de 5 µl et 0,25 µl d'UDG (Uracil DNA glycosylase à 100 Unités, Sigma-Aldrich, Lyon, France) est ajouté pour un volume réactionnel final de 25 µl. Les réactions de PCR sont réalisées sur l'appareil Stratagene® MX 3000P (La Jolla, California). Le programme d'amplification est le suivant: 2 minutes à 50°C, 15 minutes à 95°C, suivi de 45 cycles de PCR comportant la dénaturation à 95°C durant 30 secondes puis la phase d'hybridation et d'élongation à 60°C durant 1 minute.

#### I.5.2 Calcul de la charge bactérienne

Pour chaque prélèvement vaginal et pour chaque microorganisme, afin d'assurer la comparabilité des échantillons, la charge bactérienne est définie de la façon suivante. La quantification en nombre de copies d'ADN de chaque micro-organisme pour 5 µl d'extrait d'ADN est rapportée en nombre de bactéries pour 1 ml d'échantillon initial. Il faut tenir compte du volume d'élution de l'ADN (100 µl), du volume du milieu de transport par échantillon initial (200 µl) et du fait que le gène quantifié est un gène unique. La valeur obtenue pour chaque microorganisme en nombre de copies pour 5 µl d'extrait d'ADN est multipliée par  $10^2$  pour obtenir une concentration en nombre de bactéries par ml d'échantillon, puisque l'on a réalisé un volume d'élution de 100 µl d'ADN extrait à partir de 200 µl d'échantillon.

#### I.5.3 Analyse statistique

L'analyse statistique des données de la quantification bactérienne par PCR en temps réel est réalisée en utilisant le test de Wilcoxon et le test de Mann-Whitney pour un le degré de signification  $p < 0,05$ . Pour l'analyse statistique, toutes les valeurs de quantification sont prise en compte y  
5 compris celles au dessous du seuil de positivité. Pour les valeurs de quantification égale à zéro, la concentration la plus faible de l'ensemble des échantillons analysés leurs est attribuée. Le test statistique de Wilcoxon est appliqué pour décrire la répartition de chaque microorganisme au sein de chaque groupe de flore. Le test de Mann-Whitney est appliqué pour la  
10 comparaison de la quantification de chacun des 8 microorganismes dans le groupe des VB et des FN. Afin de rechercher des critères moléculaires de la VB, chaque seuil de quantification bactérienne (de  $10^3$ /ml à  $10^9$ /ml) est étudié d'après la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et négative calculées selon l'identification par le seuil des FN et des VB  
15 préalablement définies par le score de Nugent. Les seuils de quantification, pris isolément ou de façon combinée, ayant la meilleure sensibilité et spécificité sont retenus comme critères moléculaires d'identification de la VB.

## II. RESULTATS

### 20 II.1. Description de la population

De juin 2005 à avril 2006, 204 femmes enceintes âgées de 18 à 49 ans (moyenne d'âge de  $28,9 \pm 6,2$  ans) sont incluses. L'origine ethnique est l'Afrique du Nord (43%), l'Europe (42%), l'Afrique du Sud (14%) et d'autres origines (1%). Chaque femme bénéficie d'un prélèvement vaginal.  
25 Soixante-douze pour cent des prélèvements sont réalisés au troisième trimestre contre 20% au second et 8% au premier trimestre de grossesse. Vingt-une femmes bénéficient d'un suivi bactériologie comportant 2 à 4 prélèvements. Un total de 231 prélèvements a ainsi été analysé.

### II.2. Résultats bactériologiques

#### 30 II.2.1 Coloration de Gram et établissement du score de Nugent

A partir des 231 prélèvements vaginaux provenant de 204 femmes, le score de Nugent permet d'identifier : 167 FN, 44 FI et 20 VB. La fréquence des anomalies de la flore vaginale en tenant compte du premier prélèvement vaginal pour chacune des 204 femmes est de 71% pour la FN  
5 (145 cas), 19% pour la FI (39 cas) et 10% pour la VB (20 cas). La moitié des femmes présentant une VB sont symptomatiques. Le symptôme le plus fréquemment observé est l'abondance des pertes vaginales.

### II.2.2 Culture et état frais

La culture permet d'isoler *G. vaginalis*, *C. albicans*, *M. hominis*, *U.*  
10 *urealyticum* ainsi que *Streptococcus agalatae* (Tableau 1). Aucun des prélèvements vaginaux examinés ne présente de *T. vaginalis* à l'examen direct.

### II.3. Résultats de biologie moléculaire

#### II.3.1 Mise au point de la PCR en temps réel

15 Lors de la mise au point des PCR en simple et en double fluorescence, on ne réalise aucune réaction croisée, aucune compétition. On obtient des résultats similaires en valeur de CT en simple et double fluorescence en utilisant les souches bactériennes pures et la gamme plasmidique.

20 Les quantités optimales d'amorces et de sondes nécessaires pour l'obtention d'une amplification optimale sont présentées en annexe 5.

#### II.3.2 Evaluation de la technique de quantification par biologie moléculaire

25 La quantification bactérienne pour chaque échantillon est assurée par la gamme de dilution plasmidique. Pour chaque réaction d'amplification, les 8 points de la gamme plasmidique, de  $10^7$  copies à 1 copie pour 5 $\mu$ l, sont testés. Le point de gamme  $10^7$  copies est identifié de façon précoce pour un CT autour de 17. Pour le point de gamme, 1 copie la détection est

plus tardive avec un CT à 37. Pour l'ensemble des points de la gamme, la réaction d'amplification est linéaire. La représentation graphique donne une droite dont la pente varie de -3,2 à -3,5. Cette linéarité est confirmée en testant les souches pures diluées au 1/10<sup>e</sup>, 1/100<sup>e</sup> et 1/1000<sup>e</sup>. Un seuil de positivité est défini au dessus de 10 copies (soit 10<sup>3</sup> bactéries/ml), quel que soit le type de microorganisme considéré (Tableau 2). En effet, de façon statistique, l'amplification du point « 1 copie » est assurée dans 75% alors qu'il est de 100% pour le point « 10 copies ». Au sein de chaque plaque d'amplification, chaque échantillon est testé en solution non diluée, diluée au dixième et au centième. De façon reproductible, la détection du produit d'amplification suit le pas de dilution, puisqu'une dilution au dixième correspond à une majoration de 3 CT. On considère uniquement la solution pure pour le calcul de la charge bactérienne. Pour chaque échantillon, nous testons l'albumine humaine par PCR en temps réel. Les résultats obtenus sont homogènes pour l'ensemble des 231 échantillons. Les valeurs de CT se distribuent entre 19 et 22 (soit 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> copies d'ADN de l'albumine par 5 µl d'ADN extrait). Aucun échantillon n'a été exclu de l'analyse.

### II.3.3 Analyse des données

#### II.3.3.1 Description moléculaire des vaginoses bactériennes

Les concentrations médianes d'*A. vaginae* et de *G. vaginalis* sont respectivement de 1,1.10<sup>9</sup>/ml et 1,2.10<sup>9</sup>/ml et n'ont pas de différence statistique significative par le test de Wilcoxon ( $p=0,3755$ ). Ces 2 bactéries ont des concentrations élevées (Figures 1A et 3) par rapport aux autres microorganismes dont les concentrations médianes sont statistiquement plus basses ( $p=0,0001$ ).

#### II.3.3.2 Comparaison moléculaire des vaginoses bactériennes et des flores normales

La concentration médiane de *Lactobacillus sp.* est significativement plus basse ( $p<0,0001$ ) pour les VB (concentration médiane de 3.10<sup>3</sup>/ml)

que pour les FN (concentration médiane de  $5,7 \cdot 10^7$ /ml). A l'opposé, les concentrations médianes d'*A. vaginae*, *G. vaginalis*, *M. curtisii* et *M. hominis* sont significativement plus élevées ( $p \leq 0,0037$ ) pour les VB (concentration médiane respectivement de  $1,1 \cdot 10^9$  /ml;  $1,2 \cdot 10^9$  /ml;  $5 \cdot 10^3$  /ml et  $5,5 \cdot 10^2$  /ml) que pour les FN. Pour les concentrations médianes d'*U. urealyticum* et *C. albicans* , il n'existe pas de différence statistique significative parmi les VB et les FN. Enfin, *M. mulieris* n'est identifié (seuil de positivité  $\geq 10^3$ /ml) dans aucune des VB ni aucune des FN.

#### 10 II.3.3.3 Définition des critères moléculaires de la vaginose bactérienne

L'analyse par seuil de la quantification pour *A. vaginae* et *G. vaginalis* pris isolément présente les meilleurs critères de sensibilité, spécificité, valeurs prédictives positive et négative pour l'identification moléculaire des VB et des FN définies par le score de Nugent (Tableau 4). L'association d'une quantification d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml et/ou d'une quantification de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml a une sensibilité de 95%, une spécificité de 99%, une valeur prédictive positive (VPP) de 95% et une valeur prédictive négative (VPN) de 99%.

#### II.3.3.4 Caractérisation moléculaire des flores intermédiaires

20 L'application aux FI du score de Nugent (Figure 2) des critères moléculaires d'identification de la VB précédemment définis par une quantification d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml et/ou d'une quantification de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml, permet de caractériser 25 flores (57%) présentant un profil de VB (Figure 3) et 19 flores (43%) présentant un profil de FN (Figure 4).

#### 25 II.3.3.5 Suivi bactériologique

Huit femmes présentant une VB ou une FI par le score de Nugent ont bénéficié d'un suivi (Tableau 7). La quantification moléculaire permet la mise en évidence de la récurrence de la VB non identifiée par le score de

Nugent pour le sujet 1. Elle permet de confirmer la disparition de la VB pour les sujets 7 et 8. Elle caractérise comme VB les FI du score de Nugent persistantes à plus d'un mois d'intervalle pour les sujets 2 et 5. Enfin, elle confirme le caractère normal du suivi de la flore vaginale du sujet 3.

### 5 III DISCUSSION

La répartition des flores vaginales en FN (71%), VB (10%) et FI (19%) selon le score de Nugent est conforme à celles rapportées dans la littérature en France [Goffinet F, EJOGR 2003], en Europe [Guise JM, AMJPM 2001] et aux Etats-Unis [Delaney ML, OG 2001]. L'originalité de  
10 la présente invention est d'avoir établi un outil rationnel d'identification de la flore vaginale en associant la technique de détection spécifique par PCR en temps réel et la quantification relative par un plasmide d'étalonnage.

Le résultat le plus surprenant concerne *A. vaginae*. Cette bactérie a été identifiée pour la première fois en 1999 par amplification et séquençage  
15 de l'ARN 16S à partir d'un prélèvement vaginal de sujet sain [Rodriguez JM, IJSB 1999]. En 2003, *A. vaginae* a été isolée par culture dans un prélèvement d'abcès tubo-ovarien, laissant supposer un rôle pathogène de la bactérie [Geissdorfer W, JCM 2003]. En 2004, une approche d'amplification de l'ARN 16S r couplée à des techniques de clonage a  
20 permis la mise en évidence de la bactérie dans des prélèvements obtenus en per opératoire chez des patientes présentant une salpingite [Hebb JK, JID 2004]. Selon la présente invention, cette bactérie est d'identification fréquente dans 19 des 20 VB (95%) et 115 des 167 FN (69%). Le critère le plus discriminant pour le diagnostic des VB et des FN est une  
25 concentration d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml avec une sensibilité de 90% (18 cas sur 20 VB) et une spécificité de 99% (1 cas sur 167 FN).

Depuis 2004, 4 études basées sur diverses techniques moléculaires ont mis en évidence une possible association entre *A. vaginae* et la VB mais aucune ne prenait en compte de critères de quantification rigoureux. Tout  
30 d'abord, une approche par PCR ciblant l'ARN 16S r suivi d'une migration sur gel a permis de mettre en évidence *A. vaginae* parmi seulement 12 VB

sur 20 (60%) et 2 FN sur 24 (8,3%) [Ferris MJ, BMCID 2004]. Par PCR ciblant spécifiquement le gène de l'ARN 16S r d'*A. vaginae*, l'ADN de la bactérie a été retrouvée parmi 7 VB sur 9 (77,8%) et 22 FN sur 112 (19,6%) [Verhelst R, BMCM 2004]. En appliquant la même technique, l'ADN d'*A. vaginae* a été mis en évidence parmi 19 VB sur 22 (86,4%) et 59 FN sur 403 (14,7%) [Verhelst R, BMCM 2005]. Enfin par des techniques d'amplification, clonage et séquençage, l'ADN d'*A. vaginae* a été observé chez 26 VB sur 27 (96%) et 9 FN sur 46 (19,5%) [Fredricks DN, NEJM 2005]. Aucun de ces travaux n'a quantifié l'ADN d'*A. vaginae*, ce qui est essentiel dans les vaginoses bactériennes où la concentration des bactéries est un élément important du diagnostic.

*A. vaginae* fait défaut dans le score de Nugent malgré sa place capitale dans les anomalies de la flore vaginale. Son identification par des critères morphologiques est peu adaptée. Sa morphologie variable sous forme d'un petit coccobacille (0.6-0.9  $\mu\text{m}$ ) à Gram positif parfois regroupé par pair ou en courte chaîne lui assure un camouflage au contact d'autres bactéries, le rendant ainsi indétectable [Verhelst R, BMCM 2004]. Sa ressemblance aux *Lactobacillus sp.* et aux streptocoques est donc source d'erreur d'identification [Rodriguez JM, IJSB 1999].

La description d'une association entre *A. vaginae* et *G. vaginalis* dans la VB est récente, peu documentée et de portée diagnostique limitée en l'absence de quantification. Cette association est de 87,8% (8 sur 9 VB) [Verhelst R, BMCM 2004] et de 90% (20 sur 22 VB) [Zariffard MR, FEMS 2002] par PCR spécifique ciblant le gène de l'ARN 16S r d'*A. vaginae* et *G. vaginalis*. Une publication récente fait état de la présence d'*A. vaginae* dans les vaginoses bactériennes par une méthode semi-quantitative [Bradshaw CS, JID 2006].

Selon la présente invention, cette association d'*A. vaginae* et *G. vaginalis* est de 90% (18 sur 20 VB) mais la prise en compte de la quantification d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /mL et/ou de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /mL avec une sensibilité de 95% (19 sur 20 VB) présente les meilleurs critères de

spécificité (99%), de VPP (95%) et de VPN (99%) jamais obtenu pour l'identification de la VB. En conséquence, on utilise une concentration d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /mL et/ou une concentration de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /mL pour le diagnostic moléculaire de la VB.

5 Les résultats selon la présente invention suggèrent que la quantification de *G. vaginalis* est moins discriminante que celle d'*A. vaginae*. Pour les *Lactobacillus sp.*, leur diminution dans la VB objectivée par le score de Nugent est confirmée par ces résultats. En effet, si on considère une concentration de *Lactobacillus sp.* inférieure ou égale à  $10^7$ /ml, la sensibilité  
10 pour diagnostiquer une VB est de 100% et la spécificité de 44%. D'autre part, si nous considérons une concentration de *Lactobacillus sp.* supérieure ou égale à  $10^8$ /ml, nous observons une spécificité de 100% pour mettre en évidence une flore vaginale normale.

15 Pour les *Mobiluncus spp.*, malgré la place qui leur est accordée par le score de Nugent, aucune PCR n'est positive pour *M. mulieris*. Seule *M. curtisii* est associée à la VB. Cependant, son utilisation comme possible critère diagnostique moléculaire reste mineure.

Les mycoplasmes génitaux ne sont pas pris en compte par le score de Nugent. Ils restent identifiables par culture ou biologie moléculaire.  
20 L'étude par culture de 445 VB et 2729 FN, identifiait *M. hominis* comme significativement associé à la VB avec une prévalence de 29% (129 VB) et *U. urealyticum* comme non associé à la VB malgré une prévalence de 56% (253 VB) [Thorsen P, AJOG 1998]. Une étude sur 203 VB et 203 FN ciblant *M. hominis* par PCR en temps réel, suggérait une implication de *M.*  
25 *hominis* dans la VB [Zariffard MR, FEMS 2002]. Cependant, une étude identique sur un effectif plus restreint (5 VB et 16 FN) ne mettait pas en évidence ce lien [Sha BE, JCM 2005]. Selon la présente invention, seul *M. hominis* est corrélé à la VB mais cette corrélation est insuffisante pour proposer ce microorganisme comme critère diagnostique de la VB.

30 Les résultats selon la présente invention ne mettent pas en évidence de lien entre la VB et *C. albicans* comme le montre les données de la

littérature [Thorsen P, AJOG 1998]. Ceci est intéressant car si le portage génital à *Candida albicans* ne majore pas le risque de prématurité [Cotch MF, AJOG 1998], une étude récente [Kiss H, BMJ 2004] a montré une réduction du taux de prématurité par le traitement du portage génital à *C. albicans*.

5 L'originalité de la présente invention est de pouvoir proposer pour la première fois un outil diagnostique de la VB basé sur la quantification d'*A. vaginae* et *G. vaginalis*. Les critères retenus actuellement associent une concentration d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /mL et/ou une concentration de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /mL. Ce test diagnostique a une sensibilité de 95% une spécificité de  
10 99%, une VPP de 95% et une VPN de 99%. Plusieurs méthodes de lecture des résultats de PCR, notamment celles par calcul de ratio et de produits de concentrations bactériennes, ont été testées pour permettre d'identifier la méthode la plus pertinente-

L'une des applications la plus troublante de l'outil de biologie  
15 moléculaire selon la présente invention est celle réalisée sur la FI du score de Nugent. Nous savons que la FI, uniquement identifiée par le score de Nugent, constitue une fraction non négligeable (8% à 22%) de la totalité des flores identifiées par ce dernier [Guerra B, EJOGRB 2006 ; Goffinet F, EJOGRB 2003 ; Delaney ML, OG 2001 ; Libman MD, DMID 2006 ;  
20 Larsson PG, STI 2004] et qu'elle est associée à de nombreuses incertitudes. En effet, son interprétation est sujet à caution car nous ne savons pas à quelle réalité microbiologique cette flore intermédiaire correspond. Certains la considèrent comme une flore de transition entre FN et VB [Ison CA, STI 2002 ; Guerra B, EJOGRB 2006 ; Goffinet F, EJOGRB  
25 2003 ; Ugwumadu A, Lancet 2003 ; Carey JC, NEJM 2000]. D'autres la considèrent comme un groupe hétérogène regroupant des FN et des VB [Ison CA, STI 2002 ; Libman MD, DMID 2006 ; Larsson PG, STI 2004]. Des tentatives de caractérisation de la FI en FN ou VB sont rapportées dans la littérature. Par l'application des critères d'Amsel à 13 FI, 12 FI  
30 sont reclassées en FN et 1 en VB [Ison CA, STI 2002]. Par la coloration de Kopeloff pour l'établissement du score de Nugent, 69 des 232 FI (30%) sont reclassés en FN ou VB [Libman MD, DMID 2006]. Dans cette

coloration, la fuchsine remplace la safranine de la coloration de Gram pour permettre une meilleure identification des bactéries à Gram négatif. Enfin, la standardisation des critères du score de Nugent en fonction de la surface du champ optique de l'appareil microscopique utilisé, a permis de reclasser  
5 458 des 1176 FI (39%) en FN ou VB [Larsson PG, STI 2004].

L'application aux FI des critères moléculaires selon la présente invention associant à la VB une concentration d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml et/ou d'une concentration de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml permettent d'envisager une caractérisation rationnelle de cette FI. Ainsi, 24 FI (57%) présentent un  
10 profil similaire à celui des VB. Les dix-neuf autres FI (43%) présentent un profil similaire à celui des FN. Ces résultats laissent donc suggérer d'une part le caractère hétérogène des FI et d'autre part un défaut de sensibilité du score de Nugent pour diagnostiquer plus de la moitié des VB. Ces données confirment donc les limites du score de Nugent.

L'étiologie de la VB reste encore bien mystérieuse mais on dispose pour la première fois d'un outil de quantification objectif permettant une approche diagnostique rationnelle de la VB. Le caractère singulier de la présente invention est d'avoir montré à la fois la position capitale d'*A. vaginae* dans la VB mais aussi son utilisation par quantification comme  
20 critère diagnostique principal de la VB. On comprend d'autant mieux le problème thérapeutique soulevé par le caractère relativement résistant d'*A. vaginae* au métronidazole pouvant expliquer en partie la fréquence des récurrences après traitement [ANAES 2001 ; Ferris MJ , BMC ID 2004 ; Secor AM, CNP 1997 ; Geissdorfer W, JCM 2003 ; De Backer E, BMC ID 2006].  
25 Les critères moléculaires retenus pour le diagnostic de la VB associent une concentration d'*A. vaginae*  $\geq 10^8$ /ml et/ou d'une concentration de *G. vaginalis*  $\geq 10^9$ /ml. Cet outil moléculaire permet le diagnostic de la VB et la caractérisation en VB d'une fraction de la FI. Nous pouvons aussi envisager notre outil moléculaire comme une méthode diagnostique de la  
30 VB et de suivi pour l'évaluation la prise en charge thérapeutique de la VB durant la grossesse.

**Annexe 1.** Cible moléculaire et séquence nucléotidique du couple d'amorces et de la sonde pour chaque microorganisme étudié.

Dans le tableau ci-dessous, les séquences des « amorces sens » et « sondes » sont écrites dans le sens 5'->3', et les séquences des « amorces anti-sens » sont écrites dans le sens 5'->3' complémentaire inversé

Micro-organismes	Cibles	Séquences nucléotidiques
<i>M. curtisii</i>	<i>Cpn 60</i>	Amorce sens : TGGAAAAGGTGGGTCAAGAG Amorce anti-sens : AAACGCATACCTTCGGTGAC Sonde : FAM- GGCGTCATCACCGTGAAGAA-TAMRA
<i>M. mulieris</i>	ARN 16 S ribosomal	Amorce sens : ATGGATATGCGTGTGGATGG Amorce anti-sens : CCAGGCATGTAAGCCCAAAC Sonde : VIC- TTTTGGGTGGGGGCGCTA-TAMRA
<i>G. vaginalis</i>	<i>Cpn 60</i>	Amorce sens : CGCATCTGCTAAGGATGTTG Amorce anti-sens : CAGCAATCTTTTCGCCAACT Sonde : VIC- TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-TAMRA
<i>Lactobacillus sp.</i>	<i>Tuf</i>	Amorce sens : TACATCCCAACTCCAGAACG Amorce anti-sens : AAGCAACAGTACCACGACCA Sonde : FAM- TGACAAGCCATTCTTAATGCCA-TAMRA
<i>U. urealyticum</i>	Uréase	Amorce sens : ACTGGTGACCGTCCTATCCA Amorce anti-sens : CCTGATGGAATATCGAAACGA Sonde : VIC- TGAAAAGGAAACGAAGACAAAGA-TAMRA

<i>M. hominis</i>	<i>fts Y</i>	Amorces sens : ATTGATTGCTGCAGGTGATACA Amorces anti-sens : GGTGTTACAATATCAGCCCCAAC Sonde : FAM- AGAGCAGCGGCAGTTGAA-TAMRA
<i>A. vaginae</i>	ARN 16S ribosomal	Amorces sens : CCCTATCCGCTCCTGATACC Amorces anti-sens : CCAAATATCTGCGCATTTC Sonde : VIC- GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGTAGGGGA- TAMRA
<i>C. albicans</i>	Topoisomérase 3	Amorces sens : CAACGCCAACGAAGACAAG Amorces anti-sens : CCAGCTTTGTTTGCATCAAC Sonde : FAM- AAAGCCGATGGTAGTAGAAAAGTGC- TAMRA
Albumine humaine	Exon 12	Amorces sens : GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT Amorces anti-sens : AAATCATGGGAGCTGCTGGTTC Sonde : FAM- CCTGTCATGCCACACAAAATCTCTCC-TAMRA

**Annexe 2.** Séquence théorique globale de l'insert de 939 paires de bases.

Séquences en gras = Séquences des amorces sens et anti-sens

Séquences en souligné = Séquences des sondes spécifiques

5 Séquences en noir = Séquences intercalentes

Séquences entre parenthèses= Séquences du site de restriction XhoI

Seq.n°18=5'GCCAT**TGGAAAAGGTGGGTCAAGAG**GGCGTCATCA  
CCGTGGAAGAACATCGTCTCGAGTTAAGGAGCCTCGAAGTCACCGA  
**AGGTATGCGTTTCATTATGGATATGCGTGTGGATGGATTA**(CTCGA  
10 **G)CTGCCTGTTTTGGGTGGGGGCGCTATCGGGGTTTGGGCTTACAT**  
**GCCTGGCCCTCGCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGT**(CTCGAG)  
**TTAAGGCTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGA**  
**AAAGATTGCTGAATACATCCCAACTCCAGAACGTGATACT**GACAAG  
CCATTCTTAATGCCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTCGTGG  
15 **TACTGTTGCTTCTATACTGGTGACCGTCCTATCCAAGTTGGATCAC**  
**ATCGT**(CTCGAG)**TTAAGAACAATAGTGCATTAGTATTCTTTGATGA**  
AAAAGGAAACGAAGACAAAGAACGTAAAGTTGCTTATGGACG**TCG**  
**TTTCGATATTCCATCAGGTAATTGATTGCTGCAGGTGATACATTTA**A  
GAGCAGCGGCAGTTGAACAATTCATCGT(CTCGAG)**TTAAGGAGTTG**  
20 **GGGCTGATATTGTAACACCAAACCCCTATCCGCTCCTGATACCGGC**  
AGGCTTGAGTCTGGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGT(CTCGAG)G  
**TGAAATGCGCAGATATTTGGAAGCCAACGCCAACGAAGACAAGGCA**  
**CTTCAA**AAAGCCGATGGTAGTAGAAAACTGCGACATCGT(CTCGAG)  
**TTAAGTTGGTTGATGCAAACAAGCTGGTAGTTGCTGTCATCTCTT**  
25 **GTGGGCTGT**AATCATCGT(CTCGAG)**TTAAGAGTAATATTGCAAAAC**  
CTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGA  
TGTCAGTGAAAGAGA**ACCAGCAGCTCCCATGAGTTTGG**-3'

**Annexe 3.** Séquences des 6 oligonucléotides et des amorces de construction de l'insert.

- Oligonucléotide 1 sens, 178 nucléotides: séquences de *M. curtisii* et *M. mulieris*

5           Seq. n°19=5'GCCATGGAAAAGGTGGGTCAAGAGGGCGTCATC  
ACCGTGGGAAGAACATCGTCTCGAGTTAAGGAGCCTCGAAGTCACCG  
AAGGTATGCGTTTCATTATGGATATGCGTGTGGATGGATTACTCGA  
GCTGCCTGTTTTGGGTGGGGGCGCTATCGGGGTTTGGGCTTACAT  
GCCTGGCC3'

10           - Oligonucléotide 2 anti-sens, 183 nucléotides: *G. vaginalis* et *Lactobacillus sp.*

Seq. n°20=5'CGACCAGTGATAGTAAATACGTCTTCAACTGGCAT  
TAAGAATGGCTTGTCAGTATCACGTTCTGGAGTTGGGATGTATTCA  
GCAATCTTTTCGCCAACTTCAGGATCTGCTGCAGAAATAGTTGCAGT  
15 AGCCTTAACTCGAGACGATGTTTCAACATCCTTAGCAGATGCGAGG  
GCCAGGCAT3'

- Oligonucléotide 3 sens, 145 nucléotides: *U. urealyticum*

Seq. n°21=5'TCACTGGTCGTGGTACTGTTGCTTCTATACTGGTG  
ACCGTCCTATCCAAGTTGGATCACATCGTCTCGAGTTAAGAACAAAT  
20 AGTGCATTAGTATTCTTTGATGAAAAAGGAAACGAAGACAAAGAAC  
GTAAAGTTGCTTATGGA3'

- Oligonucléotide 4 anti-sens, 188 nucléotides: *M. hominis*

Seq. n°22=5'CTTGGAATTCCATCTTCCCCTACCAGACTCAAGCC  
TGCCGGTATCAGGAGCGGATAGGGGTTTGGTGTTACAATATCAGCC  
25 CCAACTCCTTAACTCGAGACGATGAATTGTTCAACTGCCGCTGCTCT  
AAATGTATCACCTGCAGCAATCAATTACCTGATGGAATATCGAAACG  
ACGTCCATAAGCA3'

- Oligonucléotide 5 sens, 152 nucléotides: *A. vaginae* et *C. albicans*

Seq. n°23=5'GAATTCCAAGTCTCGAGGTGAAATGCGCAGATAT  
TTGGAAGCCAACGCCAACGAAGACAAGGCACTTCAAAAAGCCGATG  
GTAGTAGAAAAGTGCACATCGTCTCGAGTTAAGTTGGTTGATGCA  
AACAAAGCTGGTAGTTGCTGTCAT3'

- 5 - Oligonucléotide 6 anti-sens, 147 nucléotides: albumine humaine

Seq. n°24=5'CCAAACTCATGGGAGCTGCTGGTTCTCTTTCCTG  
ACATCTGCAAAGACAACAATGCCAGGGAGAGATTTGTGTGGGCATG  
ACAGGTTTTGCAATATTACTCTTAACTCGAGACGATGATTACAGCCC  
ACAAGAGATGACAGCAA3'

- 10 - Amorces de construction pour le plasmide recombinant avec le  
fragment de 939 paires de bases

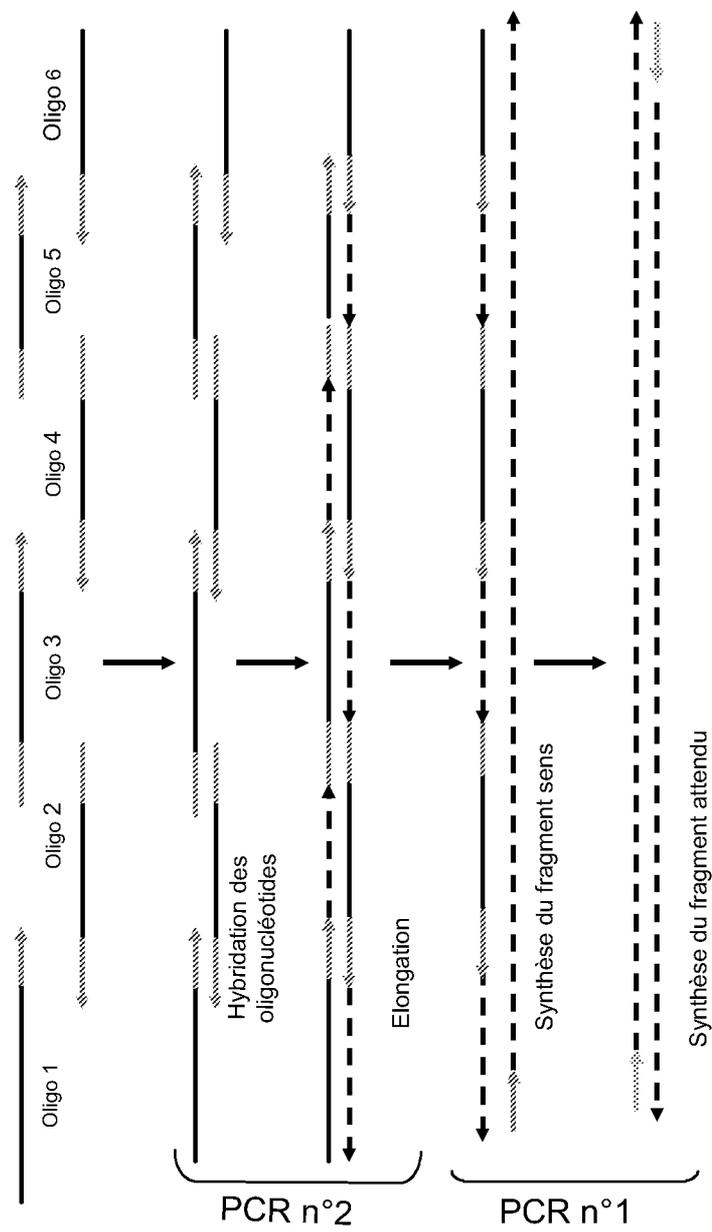
- Sens Seq. n°25=5'GCCATGGAAAAGGTGGGTC3'

Anti-sens Seq. n°28=5'CCAAACTCATGGGAGCTGCT3'

**Annexe 4.** Schémas théoriques de construction d'un insert par double PCR.

Le principe de construction d'un insert avec 6 oligonucléotides.

**Schéma de construction du plasmide**



**Annexe 5.** Quantité de sonde et d'amorces sens et anti-sens nécessaire à la réaction d'amplification de 5µl d'extrait d'ADN pour chaque micro-organisme et l'albumine humaine.

Micro-organismes	Sonde (quantité exprimée en µl par puits)	Amorce sens (quantité exprimée en µl par puits)	Amorce anti-sens (quantité exprimée en µl par puits)
<i>M. curtsii</i>	0,25	0,5	0,5
<i>M. mulieris</i>	0,25	0,5	0,5
<i>G. vaginalis</i>	0,25	0,5	0,5
<i>Lactobacillus sp.</i>	0,25	0,5	0,5
<i>U. urealyticum</i>	0,25	0,5	0,5
<i>M. hominis</i>	0,125	0,125	0,125
<i>A. vaginae</i>	0,25	0,5	0,5
<i>C. albicans</i>	0,25	0,5	0,5
Albumine humaine	0,125	0,125	0,125

## BIBLIOGRAPHIE

ANAES. 2001. Prévention anténatale du risque infectieux bactérien anténatal. Recommandations pour les professionnels de santé.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes  
5 KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and  
epidemiologic associations. Am J Med. 1983;74:14-22.

De Backer E, Verhelst R, Verstraelen Hans, Antibiotic susceptibility  
of *Atopobium vaginae*. BMC infectious diseases, March 2006.

Bradshaw CS, Morton AN, Hocking J. High recurrence rates of  
10 bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole  
therapy and factors associated with recurrence. J Infect Dis 2006;  
193:1478-86.

Bradshaw CS, Tabrizi SN, Fairley CK, Morton AN, Rudland E,  
Garland SM. The association of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis*  
15 with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy. J  
Infect Dis. 2006; 194:828-36.

Carey JC, Klebanoff MA, Hauth JC, Hillier SL, Thom EA, Ernest  
JM, Heine RP, Nugent RP, Fischer ML, Leveno KJ, Wapner R, Varner M.  
Metronidazole to prevent preterm delivery in pregnant women with  
20 asymptomatic bacterial vaginosis. National Institute of Child Health and  
Human Development Network of Maternal-Fetal Medicine Units. N Engl J  
Med. 2000 ;342:534-40.

Cotch MF, Hillier SL, Gibbs RS, Eschenbach DA. Epidemiology and  
outcomes associated with moderate to heavy *Candida* colonization during  
25 pregnancy. Vaginal Infections and Prematurity Study Group. Am J Obstet  
Gynecol. 1998;178:374-80.

Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture  
in pregnant women. Obstet Gynecol. 2001;98:79-84.

Ferris MJ, Masztal A, Aldridge KE, Fortenberry JD, Fidel PL Jr, Martin DH. Association of *Atopobium vaginae*, a recently described metronidazole resistant anaerobe, with bacterial vaginosis. BMC Infect Dis. 2004 Feb 13;4:5.

- 5 Ferris, M. J., A. Masztal, and D. H. Martin. Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of *Atopobium vaginae* in patients with bacterial vaginosis. J Clin Microbiol. 2004; 42:5892-4.

- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 2005; 353:1899-  
10 911.

Geissdorfer W, Bohmer C, Pelz K, Schoerner C, Frobenius W, Bogdan C Tuboovarian abscess caused by *Atopobium vaginae* following transvaginal oocyte recovery. J Clin Microbiol. 2003;41:2788-90.

- Goffinet F, Maillard F, Mihoubi N, Kayem G, Papiernik E, Cabrol  
15 D, Paul G. Bacterial vaginosis: prevalence and predictive value for premature delivery and neonatal infection in women with preterm labour and intact membranes. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2003;108:146-51.

- Guerra B, Ghi T, Quarta S, Morselli-Labate AM, Lazzarotto T, Pilu  
20 G, Rizzo N. Pregnancy outcome after early detection of bacterial vaginosis. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2006 Feb 2.

Guise JM, Mahon SM, Aickin M, Helfand M, Peipert JF, Westhoff C. Screening for bacterial vaginosis in pregnancy. Am J Prev Med. 2001 ;20(3 Suppl):62-72.

- 25 Hauth JC, Goldenberg RL, Andrews WW, DuBard MB, Copper RL. Reduced incidence of preterm delivery with metronidazole and erythromycin in women with bacterial vaginosis. N Engl J Med. 1995;333:1732-6.

- Hebb JK, Cohen CR, Astete SG, Bukusi EA, Totten PA. Detection of novel organisms associated with salpingitis, by use of 16S rDNA polymerase chain reaction. *J Infect Dis.* 2004;190:2109-20.
- Ison CA, Hay PE. Validation of a simplified grading of Gram stained vaginal smears for use in genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect.* 2002;78:413-5.
- Kiss H, Petricevic L, Husslein P. Prospective randomised controlled trial of an infection screening programme to reduce the rate of preterm delivery. *BMJ.* 2004;329:371.
- 10 Larsson PG, Carlsson B, Fahraeus L, Jakobsson T, Forsum U. Diagnosis of bacterial vaginosis: need for validation of microscopic image area used for scoring bacterial morphotypes. *Sex Transm Infect.* 2004;80:63-7.
- 15 Leitich H, Brunbauer M, Bodner-Adler B, Kaider A, Egarter C, Husslein P. Antibiotic treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2003;188:752-8.
- 20 Libman MD, Kramer M, Platt R; Montreal Prematurity Study Group. Comparison of Gram and Kopeloff stains in the diagnosis of bacterial vaginosis in pregnancy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54:197-201.
- McDonald H, Brocklehurst P, Parsons J. Antibiotics for treating bacterial vaginosis in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Jan 25;(1):CD000262. Review.
- 25 Morales HJ, Schorr S and J Albritton, Effect of metronidazole in patients with preterm birth in preceding pregnancy and bacterial vaginosis: a placebo-controlled, double-blind study, *Am J Obstet Gynecol* 171 (1994), pp. 345-347.

Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29:297-301.

5 Okun N, Gronau KA, Hannah ME. Antibiotics for bacterial vaginosis or *Trichomonas vaginalis* in pregnancy: a systematic review. *Obstet Gynecol.* 2005;105:857-68.

Rodriguez Jovita M, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1999;49:1573-10 6.

Schwebke JR, Hillier SL, Sobel JD, McGregor JA, Sweet RL. Validity of the vaginal gram stain for the diagnosis of bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 1996;88:573-6.

15 Schwebke JR, Lawing LF. Prevalence of *Mobiluncus* spp among women with and without bacterial vaginosis as detected by polymerase chain reaction. *Sex Transm Dis.* 2001;28:195-9.

Secor, A. M. 1997. Diagnosis and treatment of chronic vulvovaginitis. *Clin Nurse Practitioner* 1:1-6.

20 Sha BE, Chen HY, Wang QJ, Zariffard MR, Cohen MH, Spear GT. Utility of Amsel criteria, Nugent score, and quantitative PCR for *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and *Lactobacillus* sp. for diagnosis of bacterial vaginosis in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4607-12

25 Spiegel CA., Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology Reviews.* 1991; 4:485-502.

Thomason JL, Anderson RJ, Gelbart SM, Osypowski PJ, Scaglione NJ, el Tabbakh G, James JA. Simplified gram stain interpretive method for diagnosis of bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1992;167:16-9.

Thorsen P, Jensen IP, Jeune B, Ebbesen N, Arpi M, Bremmelgaard A, Moller BR. Few microorganisms associated with bacterial vaginosis may constitute the pathologic core: a population-based microbiologic study among 3596 pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178:580-7.

- 5 Ugwumadu A, Manyonda I, Reid F, Hay P. Effect of early oral clindamycin on late miscarriage and preterm delivery in asymptomatic women with abnormal vaginal flora and bacterial vaginosis: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361:983-8.

- 10 Varma R, Gupta JK. Antibiotic treatment of bacterial vaginosis in pregnancy: multiple meta-analyses and dilemmas in interpretation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;124:10-4.

- 15 Verhelst, R., H. Verstraelen, G. Claeys, G. Verschraegen, J. Delanghe, L. Van Simaey, C. De Ganck, M. Temmerman, and M. Vaneechoutte. 2004. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC.Microbiol* 2004; 4:16.

- 20 Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Van Simaey L, De Ganck C, De Backer E, Temmerman M, Vaneechoutte M. Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. *BMC Microbiol.* 2005 Oct 14;5:61.

- 25 Zariffard MR, Saifuddin M, Sha BE, Spear GT. Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for *Lactobacilli*, *Gardnerella vaginalis* and *Mycoplasma hominis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 13;34:277-81.

**Tableau. 1** Résultats de la culture bactérienne pour les 3 types de flore identifiés par le score de Nugent.

Culture	Flore normale	Flore intermédiaire	Vaginose bactérienne	Total
Micro-organisme recherché	Nombre de prélèvements positifs sur nombre de prélèvements Testés (%)			
<i>G. vaginalis</i>	6 sur 167 (3,6%)	6 sur 44 (13,6%)	15 sur 20 (75%)	27 sur 231 (12%)
<i>M. hominis</i> et <i>U. urealyticum</i>	16 sur 163 (9,8%)	6 sur 39 (15%)	4 sur 16 (25%)	26 sur 231 (9%)
<i>C. albicans</i>	30 sur 167 (18%)	17 sur 44 (38,6%)	3 sur 20 (15%)	50 sur 231 (21,6%)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5 sur 167 (3%)	1 sur 44 (2%)	0 sur 20	6 sur 231 (2,6%)

**Tableau 2.** Détection de la présence des 8 microorganismes par PCR en temps réel pour les 231 échantillons.

Micro-organismes ciblés par PCR	Nombre et pourcentage de PCR positive (seuil de positivité 10 <sup>3</sup> /ml)
<i>Lactobacillus sp.</i>	177 (77%)
<i>G. vaginalis</i>	131 (57%)
<i>A. vaginae</i>	172 (74%)
<i>M. mulieris</i>	1 (0,4%)
<i>M. curtisii</i>	41 (18%)
<i>M. hominis</i>	47 (20%)
<i>U. urealyticum</i>	32 (14%)
<i>C. albicans</i>	60 (26%)

**Tableau 3.** Analyse des concentrations bactériennes médianes obtenues par PCR quantitative pour les vaginoses bactériennes et les flores vaginales normales déterminées par le score de Nugent.

Micro-organismes	20 vaginoses bactériennes	167 flores normales	P value
	Concentration bactérienne médiane/ml (concentration minimale et maximale)		Test statistique de Mann-Whitney
<i>Lactobacillus sp.</i>	2,7.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 8.10 <sup>6</sup> )	5,6.10 <sup>7</sup> (<10 <sup>3</sup> - 5,4.10 <sup>8</sup> )	< 0.0001
<i>G. vaginalis</i>	1,1 10 <sup>9</sup> (<10 <sup>3</sup> -1,5.10 <sup>10</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 5.10 <sup>8</sup> )	< 0.0001
<i>A. vaginae</i>	1,2 10 <sup>9</sup> (<10 <sup>3</sup> - 1,2.10 <sup>10</sup> )	4,7.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 2.10 <sup>8</sup> )	< 0.0001
<i>M. mulieris</i>	<10 <sup>3</sup>	<10 <sup>3</sup>	non mesurable
<i>M. curtisii</i>	4,9.10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 1,3.10 <sup>6</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 6,2.10 <sup>4</sup> )	< 0.0001
<i>M. hominis</i>	8,5.10 <sup>2</sup> (<10 <sup>3</sup> - 1,3.10 <sup>8</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 2,2.10 <sup>8</sup> )	0.0054
<i>U. urealyticum</i>	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 3,4.10 <sup>5</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 5.10 <sup>6</sup> )	0,3344
<i>C. albicans</i>	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 1,7.10 <sup>5</sup> )	<10 <sup>3</sup> (<10 <sup>3</sup> - 7.10 <sup>6</sup> )	0,0991

**Tableau 4.** Impact de la quantification bactérienne par PCR en temps réel pour l'identification des vaginoses bactériennes.

Le groupe de flores normales et des vaginoses bactériennes définies par le score de Nugent sont utilisés comme référence.

Micro-organismes	Seuil de quantification (bactéries/ml)	FN identifiées*	VB identifiées*	Sensibilité**	Spécificité**	VPP***	VPN***
<i>A. vaginae</i>	$\geq 10^3$	116 (69%)	19 (95%)	0,95	0,31	0,14	0,98
	$\geq 10^4$	65 (39%)	19 (95%)	0,95	0,61	0,23	0,99
	$\geq 10^5$	25 (15%)	19 (95%)	0,95	0,85	0,43	0,99
	$\geq 10^6$	13 (7,8%)	19 (95%)	0,95	0,92	0,59	0,99
	$\geq 10^7$	6 (3,6%)	19 (95%)	0,95	0,96	0,76	0,99
	$\geq 10^8$	1 (0,6%)	18 (90%)	0,90	0,99	0,95	0,99
	$\geq 10^9$	0	13 (65%)	0,65	1,00	1,00	0,96
<i>G. vaginalis</i>	$\geq 10^3$	79 (47%)	19 (95%)	0,95	0,53	0,19	0,99
	$\geq 10^4$	59 (35%)	19 (95%)	0,95	0,65	0,24	0,99
	$\geq 10^5$	39 (23%)	19 (95%)	0,95	0,77	0,33	0,99
	$\geq 10^6$	25 (15%)	19 (95%)	0,95	0,85	0,43	0,99
	$\geq 10^7$	12 (7%)	18 (90%)	0,90	0,93	0,60	0,99
	$\geq 10^8$	7 (4%)	16 (80%)	0,80	0,96	0,70	0,98
	$\geq 10^9$	0	10 (50%)	0,50	1,00	1,00	0,94
<i>M. curtisii</i>	$\geq 10^3$	21 (12,6%)	13 (65%)	0,65	0,87	0,38	0,95
	$\geq 10^4$	2 (1,2%)	9 (45%)	0,45	0,99	0,82	0,94
	$\geq 10^5$	0	9 (45%)	0,45	1,00	1,00	0,94
	$\geq 10^6$	0	1 (5%)	0,05	1,00	1,00	0,90

<i>M. hominis</i>	$\geq 10^3$	22 (13%)	10 (50%)	0,50	0,87	0,31	0,94
	$\geq 10^4$	13 (7,8%)	7 (35%)	0,35	0,92	0,35	0,92
	$\geq 10^5$	6 (3,6%)	7 (35%)	0,35	0,96	0,54	0,93
	$\geq 10^6$	2 (1,2%)	6 (30%)	0,30	0,99	0,75	0,92
	$\geq 10^7$	2 (1,2%)	6 (30%)	0,30	0,99	0,75	0,92
	$\geq 10^8$	2 (1,2%)	1 (5%)	0,05	0,99	0,33	0,90
	$\geq 10^9$	1 (0,6%)	0	0	0,99	0	0,89
<i>U. urealyticum</i>	$\geq 10^3$	22 (13%)	5 (25%)	0,25	0,87	0,18	0,91
	$\geq 10^4$	17 (10%)	5 (25%)	0,25	0,90	0,23	0,91
	$\geq 10^5$	13 (7,8%)	3 (15%)	0,15	0,92	0,19	0,90
	$\geq 10^6$	7 (4,2%)	0	0	0,96	0	0,89
<i>Lactobacillus</i> spp.	$\geq 10^3$	141 (84%)	12 (60%)	0,60	0,16	0,08	0,76
	$\geq 10^4$	134 (80%)	7 (35%)	0,35	0,20	0,05	0,72
	$\geq 10^5$	116 (69%)	4 (20%)	0,20	0,30	0,03	0,76
	$\geq 10^6$	106 (63%)	4 (20%)	0,20	0,36	0,04	0,79
	$\geq 10^7$	97 (58%)	3 (15%)	0,15	0,42	0,03	0,80
	$\geq 10^8$	74 (44%)	0	0	0,55	0	1
	$\geq 10^9$	13 (7,8%)	0	0	0,92	0	1

\*Nbre de FN et nbre de VB identifiées sur 167 FN testées (%) et 20 VB testées (%)\*Nbre de FN et nbre de VB identifiées sur 167 FN testées (%) et 20 VB testées (%) respectivement.

\*\*Sensibilité et Spécificité du seuil de quantification pour l'identification des VB

\*\*\*VPP valeur prédictive positive et VPN valeur prédictive négative

**Tableau 5.** Impact de l'association des critères de quantification par PCR en temps réel d'*A. vaginae* et *G. vaginalis* pour l'identification des vaginoses bactériennes. Le groupe de flores normales et des vaginoses bactériennes définies par le score de Nugent sont utilisés comme référence.

Micro-organismes associés	Seuil de quantification de <i>G. vaginalis</i> (bactéries/ml)	FN identifiées*	VB identifiées*	Sensibilité**□	Spécificité**	VPP***	VPN***
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>7</sup> et <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	5 (3%)	18 (90%)	0,90	0,97	0,78	0,99
	≥ 10 <sup>7</sup>	5 (3%)	17(85%)	0,85	0,97	0,77	0,98
	≥ 10 <sup>8</sup>	2 (1,2%)	15 (75%)	0,75	0,99	0,88	0,97
	≥ 10 <sup>9</sup>	0	9 (45%)	0,45	1	1	0,94
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>8</sup> et <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	1 (0,6%)	17 (85%)	0,85	0,99	0,94	0,98
	≥ 10 <sup>7</sup>	1 (0,6%)	17 (85%)	0,85	0,99	0,94	0,98
	≥ 10 <sup>8</sup>	0	15 (75%)	0,75	1	1	0,97
	≥ 10 <sup>9</sup>	0	9 (45%)	0,45	1	1	0,94
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>7</sup> et/ou <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	26(15%)	20 (100%)	1	0,84	0,43	1
	≥ 10 <sup>7</sup>	13 (7,8%)	20(100%)	1	0,92	0,61	1
	≥ 10 <sup>8</sup>	11 (6,6%)	20 (100%)	1	0,93	0,64	1
	≥ 10 <sup>9</sup>	6 (3,6%)	20 (100%)	1	0,96	0,77	1
<i>A. vaginae</i> ≥ 10 <sup>8</sup> et/ou <i>G. vaginalis</i>	≥ 10 <sup>6</sup>	25(15%)	20 (100%)	1	0,85	0,44	1
	≥ 10 <sup>7</sup>	12(7,2%)	19 (95%)	0,95	0,93	0,61	0,99
	≥ 10 <sup>8</sup>	7(4,2%)	19(95%)	0,95	0,96	0,73	0,99
	≥ 10 <sup>9</sup>	1	19(95%)	0,95	0,99	0,95	0,99

\*Nbre de FN et nbre de VB identifiées sur 167 FN testées (%) et 20 VB testées (%) \*Nbre de FN et nbre de VB identifiées sur 167 FN testées (%) et 20 VB testées (%) respectivement.

\*\*Sensibilité et Spécificité du seuil de quantification pour l'identification des VB

\*\*\*VPP valeur prédictive positive et VPN valeur prédictive négative

**Tableau 6.** Suivis bactériologiques de 8 patientes présentant une vaginose bactérienne ou une flore intermédiaire par score de Nugent. Correspondance entre la classification par score de Nugent et l'identification de la VB par critères moléculaires.

Sujet	Terme du prélèvement vaginal	Classification par Score de Nugent	Traitement	BV par critères moléculaires	Terme de l'accouchement	Poids nouveau né (gramme)
1	24 SA 28 SA 38 SA	VB FN FN	Oui	oui  oui	39 SA	3420
2	27 SA 39 SA	FI FI		oui oui	40 SA	3090
3	6 SA 28 SA 32 SA	FN FI FI			40 SA	3490
4	6 SA 31 SA 37 SA 40 SA	FI FN FN FN		oui	38 SA	3580
5	26 SA 31 SA	FI FI		oui oui	38 SA	2970
6	31 SA 39 SA	FN FI		oui	39 SA	2700
7	25 SA 29 SA	VB FN	Oui	oui	37 SA	4100
8	27 SA 30 SA 32 SA	VB FN FN	Oui	oui	38 SA	2700

## REVENDICATIONS

1. Méthode de diagnostic et suivi *in vitro* de l'état de la flore bactérienne vaginale au regard de la présence d'une vaginose bactérienne, et le cas échéant pour le suivi de son traitement thérapeutique, caractérisée en  
5 ce que

- 1/ on quantifie les concentrations de bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* en

• déterminant les concentrations de séquences spécifiques desdites bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* présentes en une  
10 seule copie dans l'ADN desdites bactéries *Atopobium vaginae* et respectivement *Gardnerella vaginalis*, et d'une séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, dans l'ADN extrait d'un échantillon de sécrétion vaginale de patiente, lesdites séquences spécifiques présentant une taille inférieure à 150  
15 nucléotides,

• par co-amplification enzymatique de type PCR desdites séquences spécifiques contenues, d'une part, dans ledit ADN extrait de l'échantillon et, d'autre part, dans des échantillons de fragments d'ADN synthétiques comprenant chacun desdites séquences spécifiques desdites  
20 bactéries et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique de cellules humaines, lesdits échantillons servant de standards d'étalonnage de quantification de l'ADN,

• les détection et quantification desdits fragments amplifiés étant réalisées à l'aide de sondes marquées de séquences distinctes de celles  
25 des amorces d'amplification pour chacune desdites séquences spécifiques desdites bactéries *Atopobium vaginae* et *Gardnerella vaginalis* et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, et

- 2/ on détermine la présence d'une vaginose bactérienne ou l'échec du traitement thérapeutique en cours si les concentrations de fragments d'ADN des deux dites séquences spécifiques des bactéries *Atopobium vaginae* et respectivement *Gardnerella vaginalis* dans un échantillon de prélèvement de  
5 sécrétions vaginales de patiente contenant au moins  $10^4$  cellules humaines/ml, sont telles que l'une au moins des 2 conditions a) et b) suivantes est respectée :

a) la concentration Ca en dit fragment d'ADN d'*Atopobium vaginae* est supérieure ou égale à  $10^8$  copies/ml, et

10 b) la concentration Cg en dit fragment d'ADN de *Gardnerella vaginalis* est supérieure ou égale à  $10^9$  copies/ml.

2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que :

- a/ à l'étape 1/, on quantifie en outre les bactéries *Lactobacillus sp.* comprenant au moins les bactéries *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus*  
15 *crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri* et *Lactobacillus iners*, en

- déterminant en outre la concentration d'une séquence spécifique desdites bactéries *Lactobacillus sp.*, ladite séquence spécifique des *Lactobacillus sp.* étant présente en une seule copie dans l'ADN desdites bactéries *Lactobacillus sp.*, et de taille inférieure à 150 nucléotides,

20 • par co-amplification enzymatique de type PCR additionnelle de ladite séquence spécifique des bactéries *Lactobacillus sp.* contenue, d'une part, dans ledit ADN extrait de l'échantillon et, d'autre part, dans un échantillon de fragments d'ADN synthétique comprenant, en outre, ladite séquence spécifique desdites bactérie *Lactobacillus sp.*, ledit fragment d'ADN  
25 synthétique comprenant ladite séquence spécifique desdites bactéries *Lactobacillus sp.* servant de standard d'étalonnage de quantification,

- les détection et quantification desdits fragments amplifiés étant réalisées à l'aide de sondes marquées de séquences distinctes de celles des amorces d'amplification pour chacune desdites séquences spécifiques

desdites bactéries *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus sp.* et dite séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, et

- b/ à l'étape 2/, on détermine une vaginose bactérienne si, en outre,  
5 la concentration Cl en fragment d'ADN spécifique de dites bactéries *Lactobacillus sp.*, est inférieure ou égale à  $10^8$  copies/ml, de préférence inférieure ou égale à  $10^7$  copies/ml.

3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'on détermine une vaginose bactérienne si lesdites concentrations sont telles que  
10 les 3 conditions suivantes sont respectées :

a- concentration Ca en dit fragment d'ADN de séquence spécifique d'*Atopobium vaginae* supérieure ou égale à  $10^8$  copies/ml,

b- concentration Cg en en dit fragment d'ADN de séquence spécifique de *Gardnerella vaginalis* supérieure ou égale à  $10^9$  copies/ml, et

15 c- concentration (Cl) en dit fragment d'ADN de séquence spécifique de *Lactobacillus sp.* inférieure ou égale à  $10^7$  copies/ml.

4 Méthode selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'on réalise des réactions d'amplification et quantification par PCR en Temps Réel, en mettant en œuvre des sondes d'hydrolyse spécifiques  
20 respectivement de chacune desdites séquences spécifiques de dites bactéries et séquence spécifique d'un gène humain présent dans tout prélèvement biologique contenant des cellules humaines, dans l'échantillon à tester.

5. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que lesdites séquences spécifiques présentent une taille de 70 à 150 nucléotides, de  
25 préférence de 90 à 120 nucléotides.

6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'on met en oeuvre un grand fragment synthétique d'ADN servant de standard d'étalonnage de quantification de l'ADN, ledit grand fragment d'ADN synthétique regroupant desdites séquences spécifiques

respectivement de chacune desdites bactéries dont les concentrations sont quantifiées, et ladite séquence d'ADN humain spécifique de cellules humaines.

7. Méthode selon la revendication 1 à 6, caractérisée en ce que  
5 lesdites séquences spécifiques desdites bactéries comprennent :

- pour la bactérie *Atopobium vaginae*: le fragment des positions 248 à 334 du gène ARN 16S ribosomal de référence Genebank AY 738658.1,

- pour la bactérie *Gardnerella vaginalis*, le fragment des positions 981 à 1072 du gène *Cpn 60* de la protéine chaperonne de 60kDa de référence  
10 Genebank AF 240579.3, et

- pour la bactérie *Lactobacillus sp.*, une séquence commune aux bactéries *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* et *Lactobacillus acidophilus* au sein du gène *tuf* codant pour le facteur d'élongation aux positions 253 à 343. du gène de référence Genebank  
15 AY 562191.1.

8. Méthode selon la revendication 7, caractérisée en ce que lesdites séquences spécifiques desdites bactéries sont les séquences suivantes incluant des séquences sondes (soulignées) encadrées par des séquences amorces (en gras) ou leurs séquences complémentaires:

20 - pour *Atopobium vaginae*:

Seq. n°2 = 5'-**CCTATCCGCTCCTGATACCG**GCAGGCTTGAGTCT  
GGTAGGGGAAGATGGAATTCCAAGTG**TGAAATGCGCAGATATTTGG**  
-3'

- pour *Gardnerella vaginalis*:

25 Seq. n°3 = 5'-**GCATCTGCTAAGGATGTTGAAACATCGTTTAAGG**  
**CTACTGCAACTATTTCTGCAGCAGATCCTGAAGTTGGCGAAAAGATT**  
**GCTG-3'**

- pour *Lactobacillus sp*

Seq. n°4 = 5'-**TACATCCCAACTCCAGAACGTGATACTGACAAGCC**  
ATTCTTAATGCAGTTGAAGACGTATTTACTATCACTGGTTCGTGGTAC  
**TGTTGCTT-3'**

9. Méthode selon l'une des revendications 6 et 8, caractérisée en ce  
 5 que ledit grand fragment d'ADN comprend, comme séquence spécifique  
 d'ADN humain dans l'échantillon à tester, une séquence spécifique de  
 l'albumine.

10 Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que ladite  
 séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester comprend le  
 10 fragment des positions 16283-16423 de l'exon 12 du gène de l'albumine  
 humaine de référence Genbank M12523.1 de séquence du listage de  
 séquence suivante ou la séquence complémentaire:

Seq. n°1 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGTTTA**  
 AGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATCTCTCCCTGGC  
 15 ATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA**ACCAGCAGCTCCCAT**  
**GAGTTT-3'**

11. Méthode selon la revendication 10, caractérisée en ce que ladite  
 séquence spécifique d'ADN humain dans l'échantillon à tester comprend le  
 fragment des positions 16283-16423 de l'exon 12 du gène de l'albumine  
 20 humaine de référence Genbank M12523.1., est modifiée par insertion d'un  
 site de clivage, notamment le site XhoI (séquence entre parenthèses) en  
 dehors des séquences correspondant aux amorces (séquences en gras) et  
 séquence sonde (séquence soulignée) de séquence du listage de séquence  
 suivante ou la séquence complémentaire:

25 Seq. n°17 = 5'-**GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGTAATCATCGT**(CT  
 CGAG)TTAAGAGTAATATTGCAAAACCTGTCATGCCACACAAATCTC  
TCCCTGGCATTGTTGTCTTTGCAGATGTCAGTGAAAGAGA**ACCAGCA**  
**GCTCCCATGAGTTT-3'**

12. Méthode selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisée en  
 30 ce que l'on met en œuvre les jeux d'amorces et de sondes choisis le cas

échant parmi les séquences suivantes du listage de séquence ou respectivement leurs séquences complémentaires:

- pour *Atopobium vaginae*:

Amorce 5' : Seq. n°5 = 5'-CCCTATCCGCTCCTGATACC-3'

5 Amorce 3' : Seq. n°6 = 5'-CCAAATATCTGCGCATTTC-3'

Sonde : Seq. n°7 = 5'-GCAGGCTTGAGTCTGGTAGGGGA-3'

- pour *Gardnerella vaginalis*:

Amorce 5' : Seq. n°8 = 5'-CGCATCTGCTAAGGATGTTG-3'

Amorce 3' : Seq. n°9 = 5'-CAGCAATCTTTTCGCCAACT-3'

10 Sonde : Seq. n°10 = 5'-TGCAACTATTTCTGCAGCAGATCC-3'

- pour *Lactobacillus sp.* :

Amorce 5' : Seq. n°11 = 5'-TACATCCCAACTCCAGAACG-3'

Amorce 3' : Seq. n°12 = 5'-AAGCAACAGTACCACGACCA-3'

Sonde : Seq. n°13 = 5'-TGACAAGCCATTCTTAATGCA-3',

15 - pour l'albumine humaine :

Amorce 5' : Seq. n°14 = 5'-GCTGTCATCTTGTGGGCTGT-3'

Amorce 3' : Seq. n°15 = 3'-AAACTCATGGGAGCTGCTGGTTC-3'

Sonde : Seq. n°16 = 5'-CCTGTCATGCCACACAAATCTCTCC-3'

13. Méthode selon l'une des revendications 6 à 12, caractérisée en  
20 ce que ledit grand fragment d'ADN synthétique constitutif de l'ADN de l'échantillon standard d'étalonnage de la quantification est inséré dans un plasmide.

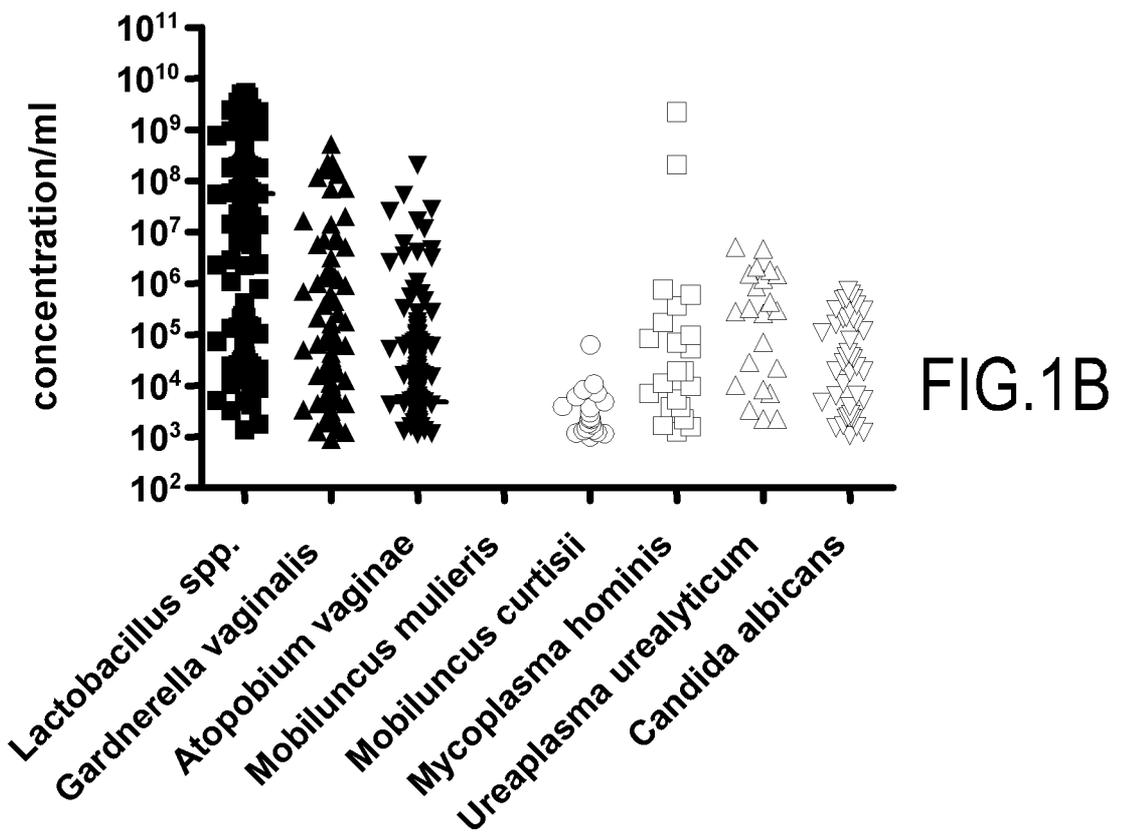
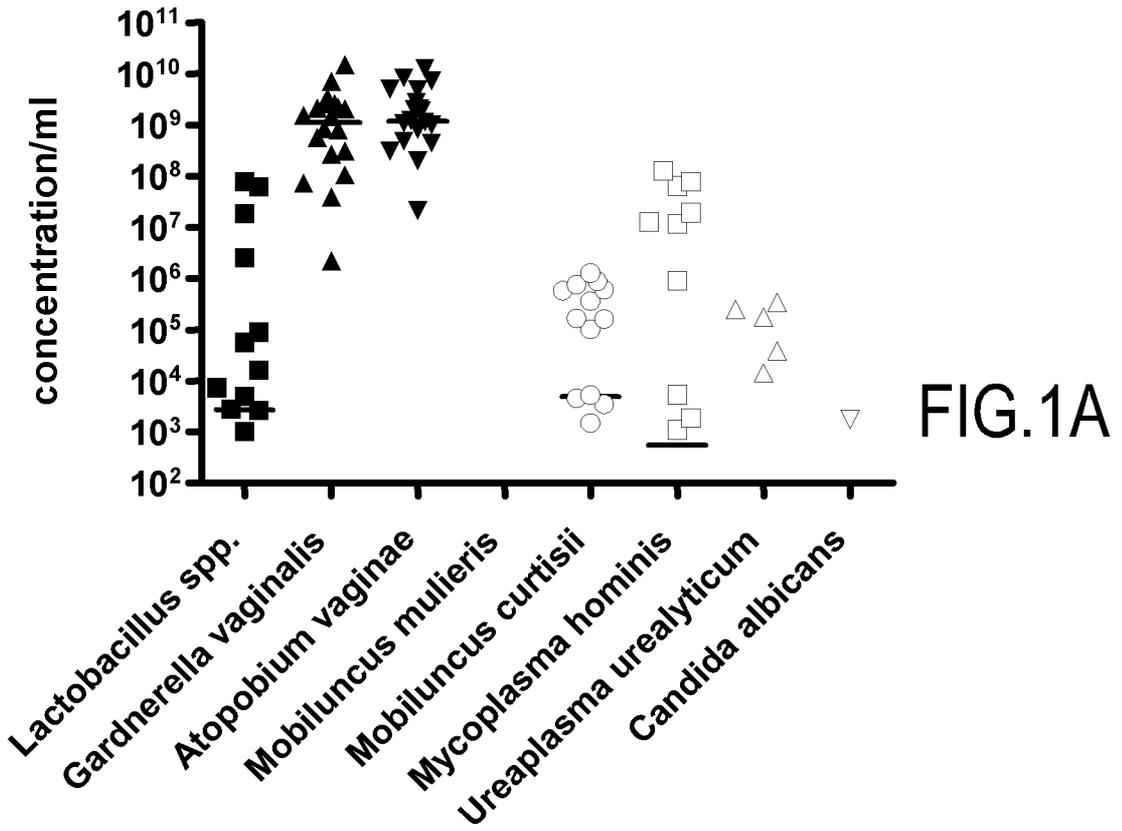
14. Trousse de diagnostic utile pour la mise en œuvre d'une méthode selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisée en ce qu'elle comprend

5 - des échantillons d'ADN standard d'étalonnage comprenant desdites séquences spécifiques de chacun desdites bactéries telles que définies dans l'une des revendications 1, 5, 7 et 8, de préférence une dite séquence spécifique de l'ADN humain telle que définie dans les revendications 1, 9, 10 et 11, et, de préférence encore, un dit grand fragment d'ADN synthétique tel que défini dans les revendications 6 et 13, ainsi que

10 - desdits jeux d'amorces spécifiques desdits fragments d'ADN synthétiques modifiés spécifiques desdites bactéries et de préférence encore, desdites sondes tels que définis dans l'une des revendications 1, 4, 8 et 12, et

- des réactifs de mise en œuvre d'une réaction d'amplification d'ADN de type PCR.

15



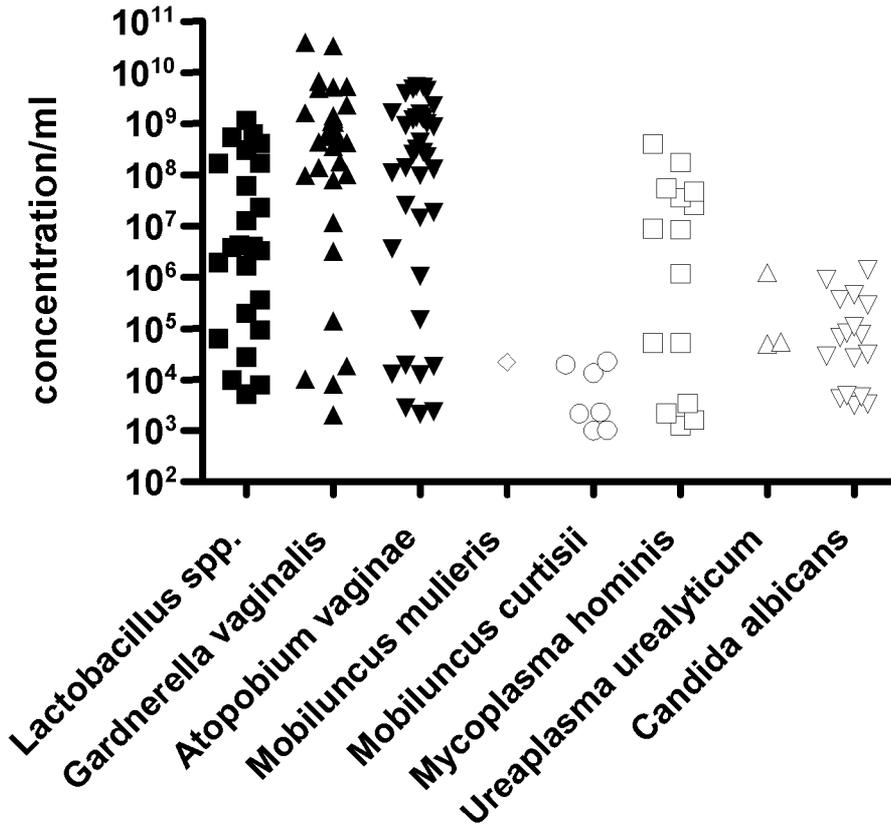


FIG. 2

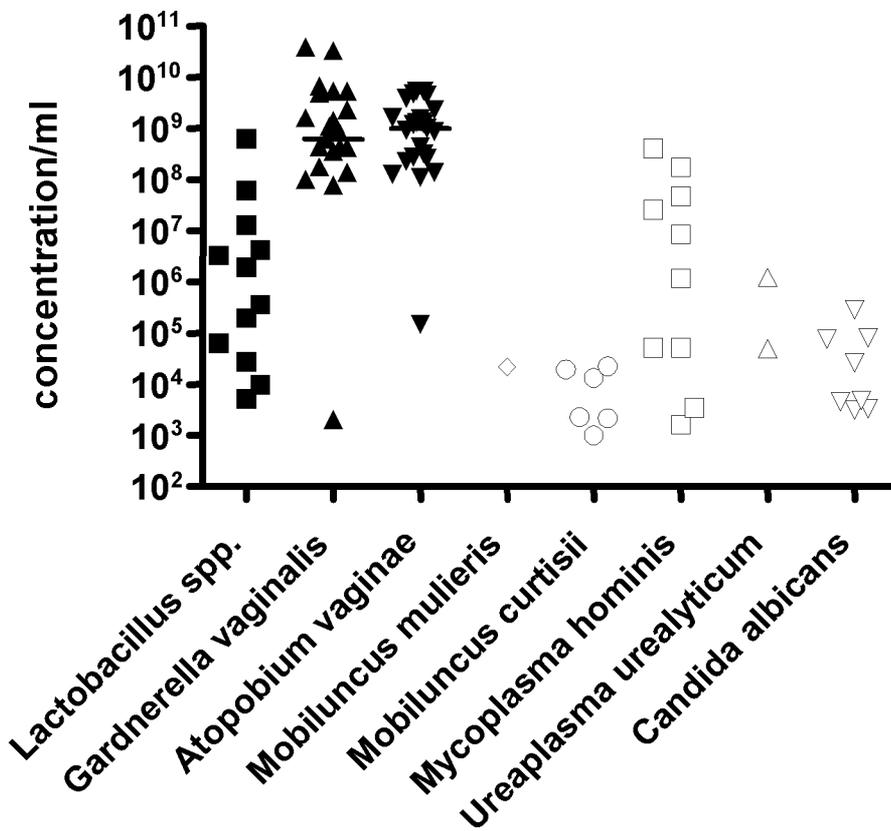


FIG. 3

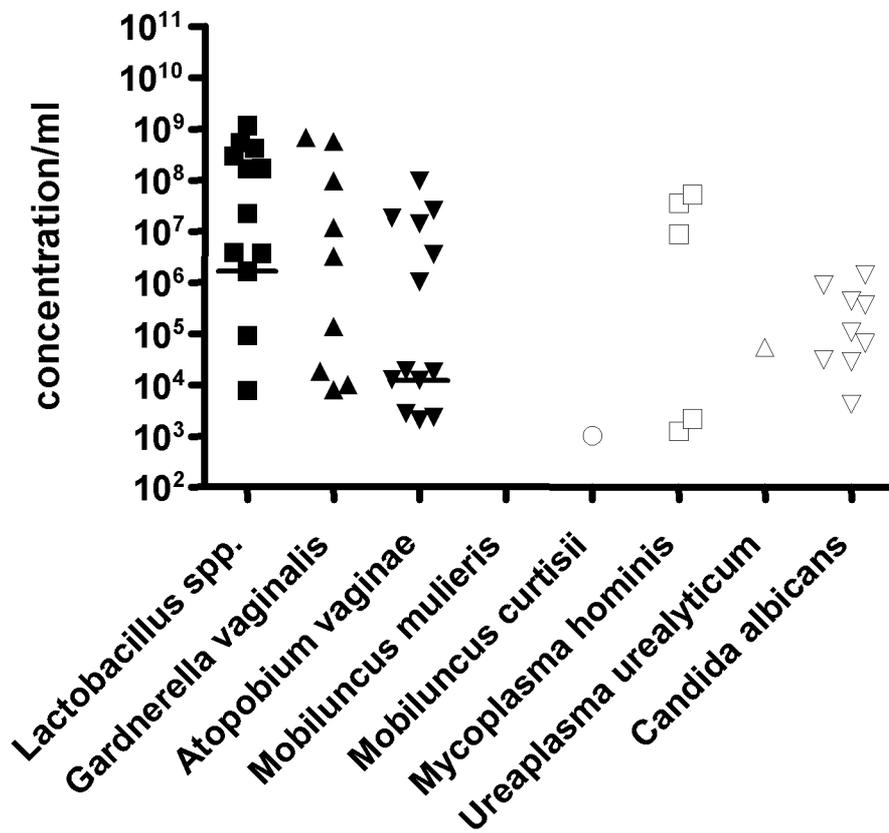


FIG.4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/FR2007/052368

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
INV. C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>BRADSHAW C S ET AL: "The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy". JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 194, no. 6, 15 September 2006 (2006-09-15), pages 828-836, XP009086643 ISSN: 0022-1899 page 829, column 2, paragraph 2 table 1 the whole document</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>* &amp; * document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  <b>15 mai 2008</b>	Date of mailing of the international search report  <b>27/05/2008</b>
---	---

Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  <b>Helliot, Bertrand</b>
---	--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2007/052368

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TABRIZI SEPEHR N ET AL: "Prevalence of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae in virginal women" SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES, LIPPINCOTT CO., PHILADELPHIA, US, vol. 33, no. 11, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 663-665, XP009086642 ISSN: 0148-5717 page 663, column 2, paragraph 3 - page 664, column 1, paragraph 1 the whole document	1-14
Y	ZARIFFARD M REZA ET AL: "Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardnerella vaginalis and Mycoplasma hominis." 13 December 2002 (2002-12-13), FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 13 DEC 2002, VOL. 34, NR. 4, PAGE(S) 277 - 281 , XP002442546 ISSN: 0928-8244 page 278, column 1, paragraph 2 page 278, column 2, paragraphs 2,3 table 1 the whole document	1-14
Y	US 2005/095603 A1 (MOKKAPATI ANUPAMA [US] ET AL) 5 May 2005 (2005-05-05) paragraphs [0056], [0057] examples 1,2 table 1 the whole document	1-14
Y	VERHELST RITA ET AL: "Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora" BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 14 October 2005 (2005-10-14), page 61, XP021002663 ISSN: 1471-2180 page 65, column 1, lines 20-26 table 1	1-14

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2007/052368

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>VERHELST RITA ET AL: "Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis" 21 April 2004 (2004-04-21), BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, PAGE(S) 16 , XP021002564 ISSN: 1471-2180 abstract table 1</p>	1-14
A	<p>SCHWIERTZ ANDREAS ET AL: "Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints?" ANNALS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIALS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1; 17 February 2006 (2006-02-17), page 4, XP021018181 ISSN: 1476-0711 the whole document table 1</p>	1-14
A	<p>FERRIS MICHAEL J ET AL: "Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of Atopobium vaginae in patients with bacterial vaginosis." December 2004 (2004-12), JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY DEC 2004, VOL. 42, NR. 12, PAGE(S) 5892 - 5894 , XP002442547 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/FR2007/052368

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2005095603 A1	05-05-2005	W0 2005047462 A2	26-05-2005

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052368

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
INV. C12Q1/68

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
C12Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche.

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>BRADSHAW C S ET AL: "The association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with bacterial vaginosis and recurrence after oral metronidazole therapy" JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, CHICAGO, IL, US, vol. 194, no. 6, 15 septembre 2006 (2006-09-15), pages 828-836, XP009086643 ISSN: 0022-1899 page 829, colonne 2, alinéa 2 tableau 1 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">----- -/--</p>	1-14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

\*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

\*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

\*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

\*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

\*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

\*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

\*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

\*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

\*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 mai 2008

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27/05/2008

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Helliot, Bertrand

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052368

### Cadre N° I Séquence(s) de nucléotides ou d'acides aminés (suite du point 1.b de la première feuille)

1. En ce qui concerne la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants:
  - a. Nature de l'élément
    - un listage de la ou des séquences
    - un ou des tableaux relatifs au listage de la ou des séquences
  - b. Type de support
    - sur papier
    - sous forme électronique
  - c. Moment du dépôt ou de la remise
    - contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
    - déposé(s) avec la demande internationale, sous forme électronique
    - remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
2.  De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listage des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, la déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
3. Commentaire complémentaires:

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052368

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>TABRIZI SEPEHR N ET AL: "Prévalence of Gardnerella vaginalis and Atopobium vaginae in virginal women" SEXUALLY TRANSMITTED DISEASES, LIPPINCOTT CO., PHILADELPHIA, US, vol. 33, no. 11, 1 novembre 2006 (2006-11-01), pages 663-665, XP009086642 ISSN: 0148-5717 page 663, colonne 2, alinéa 3 - page 664, colonne 1, alinéa 1 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>ZARIFFARD M REZA ET AL: "Detection of bacterial vaginosis-related organisms by real-time PCR for Lactobacilli, Gardnerella vaginalis and Mycoplasma hominis." 13 décembre 2002 (2002-12-13), FEMS IMMUNOLOGY AND MEDICAL MICROBIOLOGY 13 DEC 2002, VOL. 34, NR. 4, PAGE(S) 277 - 281 , XP002442546 ISSN: 0928-8244 page 278, colonne 1, alinéa 2 page 278, colonne 2, alinéas 2,3 tableau 1 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>US 2005/095603 A1 (MOKKAPATI ANUPAMA [US] ET AL) 5 mai 2005 (2005-05-05) alinéas [0056], [0057] exemples 1,2 tableau 1 le document en entier</p>	1-14
Y	<p>VERHELST RITA ET AL: "Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: Definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora" BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 14 octobre 2005 (2005-10-14), page 61, XP021002663 ISSN: 1471-2180 page 65, colonne 1, ligne 20-26 tableau 1</p>	1-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052368

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>VERHELST RITA ET AL: "Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between Atopobium vaginae, Gardnerella vaginalis and bacterial vaginosis"</p> <p>21 avril 2004 (2004-04-21), BMC MICROBIOLOGY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, PAGE(S) 16 , XPO21002564 ISSN: 1471-2180 abrégé tableau 1</p>	1-14
A	<p>SCHWIERTZ ANDREAS ET AL: "Throwing the dice for the diagnosis of vaginal complaints?"</p> <p>ANNALS OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND ANTIMICROBIALS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 17 février 2006 (2006-02-17), page 4, XPO21018181 ISSN: 1476-0711 le document en entier tableau 1</p>	1-14
A	<p>FERRIS MICHAEL J ET AL: "Use of species-directed 16S rRNA gene PCR primers for detection of Atopobium vaginae in patients with bacterial vaginosis."</p> <p>décembre 2004 (2004-12), JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY DEC 2004, VOL. 42, NR. 12, PAGE(S) 5892 - 5894 , XPO02442547 ISSN: 0095-1137 le document en entier</p>	1-14

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/052368

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 2005095603 A1	05-05-2005	WO 2005047462 A2	26-05-2005